

**Avaliação da Diversidade Genética e da Estrutura de Populações de Milho Doce  
Estimada por Marcadores Microssatélites**

Ana Daniela Lopes<sup>1</sup>, Lucas Rafael de Souza Camacho<sup>2</sup>, Marlon Mathias Dacal Coan<sup>3</sup>, Acácio Antonio Miotto<sup>4</sup>, Klayton Flávio Milani<sup>5</sup>, Henrique José Camargo Senhorinho<sup>6</sup>, Vitor Hugo Domenes Tolentino<sup>7</sup> e José Lidércio Matias Junior<sup>8</sup>

<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, <sup>1</sup>anadani\_bio@hotmail.com, <sup>2</sup>lucascamacho88@gmail.com, <sup>3</sup>marloncoan@gmail.com, <sup>4</sup>acaciomiotto@gmail.com, <sup>5</sup>kf\_milani@hotmail.com, <sup>6</sup>hsenhorinho@hotmail.com, <sup>7</sup>vitortolentino@hotmail.com e <sup>8</sup>jr\_lidercio@hotmail.com

**RESUMO** - O sucesso de qualquer programa de pré-melhoramento ou de conservação, é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para monitorar a variabilidade genética existente, dentre eles, pode-se destacar os microssatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeated*). O número de investigações que procuram caracterizar a diversidade genética de milho doce no Brasil ainda pode ser considerado como restrito frente ao número de variedades em potencial disponíveis para serem usadas por programas de melhoramento. Por isso, os objetivos do presente estudo foram: *a)* determinar a diversidade genética existente entre 22 genótipos de milho doce pertencentes ao banco de germoplasma do programa de melhoramento de milho doce da UEM; *b)* selecionar os locos microssatélites promissores para estimativas de diversidade genética; *c)* analisar a estrutura genética dos genótipos. Para isso, cerca de 40 sementes de cada genótipo de milho doce foram semeadas em vasos plásticos contendo terra previamente adubada. Suas folhas foram coletadas e levadas ao laboratório. Assim, fez-se o isolamento do DNA genômico, a quantificação, amplificação e identificação, determinando os alelos de cada loco microssatélites. A análise dos marcadores microssatélites nos 22 genótipos de milho doce revelou que esses são efetivos para detectar a divergência genética no milho doce. Os locos Umc2205, Umc1066 e Umc1857 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, podendo, portanto, ser apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho doce. A maior diferenciação genética foi observada no loco Umc1470, sendo este o mais adequado para ser usado para diferenciar os 22 genótipos referente a frequência diferencial dos alelos. Com base na distância genética, foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA. O dendrograma resultante dessa análise permitiu formar 4 grupos distintos.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., milho doce, marcadores microssatélites, divergência genética.

### **Introdução**

O milho doce (*Zea mays* L.) é classificado como especial e destina-se exclusivamente ao consumo humano. É utilizado principalmente como milho verde, tanto “in natura” como para processamento pelas indústrias de produtos vegetais em conserva. O milho doce é caracterizado por apresentar grãos com alto teor de açúcares e pouco amido no endosperma. Estas características tornam os grãos vítreos, devido à cristalização dos açúcares, e enrugados devido à menor proporção de amido no endosperma.

Com a expansão do mercado de milho doce para a indústria de enlatamento de milho verde e maior preocupação com sua qualidade (ARAGÃO et al., 2003), é fundamental que empresas governamentais e privadas desenvolvam programas de melhoramento para produção de cultivares de milho doce adaptadas ao clima de cada região (SCAPIM et al., 1995), que apresentem endosperma com conversão reduzida de açúcar em amido (FORNASIERI FILHO, 1992).

No sentido de atender aos pré-requisitos, tanto da qualidade como da produtividade, em 2005, na Universidade Estadual de Maringá-PR, foi iniciado um programa de melhoramento genético para milho doce o qual tem por objetivo final a obtenção de híbridos de linhagens.

O sucesso de qualquer programa de pré-melhoramento ou de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. A caracterização genética de populações de milho doce, destinadas ao melhoramento, pode ser feita usando características agronômicas (marcadores morfológicos) e/ou usando marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para monitorar a variabilidade genética existente (PARKER et al., 1998). Dentre esses marcadores pode-se destacar os microssatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeated*; Sequências Simples Repetidas em Tandem), como um dos mais polimórficos e informativos, sendo portanto considerada uma técnica de análise molecular adequada para estimar a diversidade genética.

No entanto, o número de investigações que procuram caracterizar a diversidade genética de milho doce no Brasil ainda pode ser considerado como restrito frente ao número de variedades em potencial disponíveis para serem usadas por programas de melhoramento. Por isso, os objetivos do presente estudo foram: *a)* determinar a diversidade genética existente entre 22 genótipos de milho doce pertencentes ao banco de germoplasma do programa de melhoramento de milho doce da UEM; *b)* selecionar os locos microssatélites promissores para estimativas de diversidade genética; *c)* analisar a estrutura genética dos genótipos.

### **Material e Métodos**

A amostra foi composta por vinte e dois genótipos de milho doce. Deste total, treze foram fornecidos pelo Banco de Germoplasma de Milho da Embrapa Milho e Sorgo, seis do Programa de Melhoramento de Milho Doce do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, dois da Empresa de Melhoramento Syngenta Seeds e um do Centro

Nacional de Pesquisa de Hortaliças.

Cerca de 40 sementes de cada genótipo de milho doce foram semeadas em vasos plásticos contendo terra previamente adubada. Os vasos foram mantidos fora da casa de vegetação sob variação de temperatura. Aproximadamente 30 dias após a semeadura foram coletadas folhas jovens de 15 a 18 plantas de cada genótipo totalizando 326 amostras. A coleta foi realizada mediante a utilização de uma tesoura de maneira que a raiz fosse desprezada. As plantas foram utilizadas imediatamente após a coleta. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa Aplicada à Agricultura (Nupagri), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá.

O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações. A integridade e quantidade das moléculas de DNA foram verificadas por meio de um fluorímetro (Quibit - Quant-iT™ Assay Kits – Invitrogen). A quantificação foi conduzida utilizando 1µL de cada amostra. As amostras de DNA apresentaram concentrações variáveis e quantidade de DNA suficiente (em média 180ng/µL). As amostras de DNA, para uso nas reações de amplificação, foram diluídas em água Mili-Q autoclavada para uma concentração de 10 ng/µL<sup>-1</sup>. Após este processo foram estocadas em tubos de 1,5mL e armazenadas em 4°C até o momento da amplificação.

Um total de 257 locos microssatélites já mapeados para o milho comum foram testados em amostras de milho doce. O objetivo desse procedimento foi selecionar os *primers* que proporcionaram maior polimorfismo para serem utilizados nas análises de diversidade genética dos diferentes genótipos. A seleção dos locos microssatélites foi realizada utilizando-se quatro amostras de DNA dos 22 genótipos de milho doce, escolhidas aleatoriamente e analisadas em gel de agarose 4% preparado com 50% de agarose MS8 e 50% de agarose comum. Este procedimento foi realizado para verificar a complementaridade e reprodutibilidade dos *primers*. As condições de amplificação foram baseadas no programa *Touchdown PCR* (DON et al., 1991).

Para analisar a diversidade genética nas populações de milho doce, cada fragmento de DNA amplificado e identificado como uma banda no gel foi considerado como um fenótipo distinto e independente dos demais, determinando os alelos de cada loco microssatélites. A partir do padrão de bandas obtido para cada loco de microssatélites foram calculados os índices de diversidade em cada população estudada.

O grau de diversidade genética entre os clusters foi estimado usando o software ARLEQUIN v3.5.1.2. A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrogramas

construídos pela matriz de distâncias de Nei e pelo critério de agrupamento UPGMA, e para isto utilizou-se o programa Mega 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

### **Resultados e Discussão**

No total foram analisados 257 locos microssatélites, dos quais, 97 não amplificaram, sendo obtida, portanto, uma eficiência de 62,3% na amplificação dos locos. A não amplificação de 37,7% dos locos analisados pode estar relacionada à ocorrência de mutações nas regiões flanqueadoras dos locos, ou seja, nos locais onde os *primers* pareiam. Dentre os 160 locos que amplificaram, 45 foram polimórficos nos 22 genótipos de milho doce analisados, ou seja, apresentaram mais de um alelo por loco, conferindo um polimorfismo de 28% (Figura 1). Dos 45 locos polimórficos 30 foram selecionados para a análise de diversidade genética. Vale ressaltar que esses 30 locos estão distribuídos nos dez cromossomos do milho e que a maioria deles (sete) está localizada no cromossomo 8. A análise dos marcadores microssatélites nos 22 genótipos de milho doce revelou que esses são efetivos para detectar a divergência genética no milho doce.

Com relação ao número de alelos, identificou-se um total de 86 alelos nos 30 locos analisados. O número de alelos variou de 2 a 5 (Figura 2), com uma média de 2,87 alelos por loco polimórfico, sendo o loco *Umc2205* o mais polimórfico, enquanto que o número efetivo de alelos detectados neste estudo variou de 1,09 para o loco *Umc1470* a 2,67, para os locos *Umc1857* e *Umc2205*.

De acordo com Wietholter et al. (2008), um fator que pode estar relacionado à estas diferenças no número de alelos, é a origem das variedades estudadas. A origem próxima e o curto período de diferenciação podem levar a baixos níveis de variação alélica. Além disso, os locos microssatélites usados podem ter apresentado pouco polimorfismo no grupo de genótipos analisados.

A distribuição das frequências alélicas nos 30 locos microssatélites nas 22 populações indica que os locos *Umc2205*, *Umc1066* e *Umc1857* revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados no presente estudo, podendo, portanto, ser apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho doce. A avaliação das frequências alélicas permite concluir que está ocorrendo um forte processo de fixação de alelos em determinados genótipos de milho doce, especialmente nos genótipos Tropical Plus, Milho doce bônus F<sub>1</sub>, Lili e Aruba.

Quanto à estrutura genética populacional, o loco *Umc1470* é o mais adequado para ser

usado na discriminação dos 22 genótipos no que refere à frequência diferencial dos alelos.

A distância genética de Nei, calculada entre pares de genótipos, variaram de 0,103 (Doce do Hawai x CNPH-1) a 0,645 (Amarelo Doce x Lili). O valor elevado para a distância genética entre este par de genótipos, por exemplo, pode indicar que a procedência dos materiais é bastante divergente. Por outro lado, as baixas distâncias genéticas em alguns pares de genótipos (Doce do Hawai x CNPH-1), sugerem que estes apresentam valores de identidade genética bastante similares. O segundo par de genótipos mais divergentes é 8 (Tuc blanco dulce EEAOC) e 20 (Lili), distantes em 0.608.

Os valores estimados para a diversidade genética entre os genótipos podem ser úteis para direcionar cruzamentos promissores, no sentido de selecionar a característica de interesse, mantendo ou ampliando a diversidade genética em locos, que, em princípio, são considerados neutros, como os locos microssatélites. Assim, é possível que os locos microssatélites possam ser apontados como marcadores moleculares promissores e adequados para acompanhar e direcionar a seleção de características desejáveis em genótipos de milho doce.

Com base na distância genética, foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA (Unweighted pair-group method using an arithmetic average). O dendrograma resultante dessa análise é apresentado na Figura 3. A separação em grupos nesse tipo de gráfico é feita de maneira subjetiva, escolhendo-se um ponto de corte na escala de distância. Procedendo-se assim, ou seja, adotando o nível de corte na escala de distância igual a 0,17 foram obtidos quatro grupos: grupo 1, formado pelos genótipos Doce do Hawai, CNPH-1, Milho doce 1, Doce de Ouro, Amarelo doce, Doce opaco, Branco doce, Doce Cubano, Doce UNB-1, Milho, Doce Flor da Serra, Doce Cristal, Tea dulce EEAOC e Tuc blanco dulce EEAOC; o 2 formado pelos genótipos Tropical Plus, Garden, RB6324, Superdoce e Aruba; o 3 formado pelos genótipos BR427 III e Milho doce bônus F<sub>1</sub>, e o 4 pelo híbrido Lili.

A falta de informações sobre a genealogia dos materiais acarreta um papel de grande importância aos agrupamentos obtidos por uso de marcadores moleculares, especialmente por apontar informações em variantes pouco caracterizadas geneticamente, como é o caso do milho doce.

### **Literatura Citada**

ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; ALVES, E.; CATANEO, A.C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. Revista Brasileira de Sementes, 25: 43-48, 2003.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19:4008-4008, 1991.

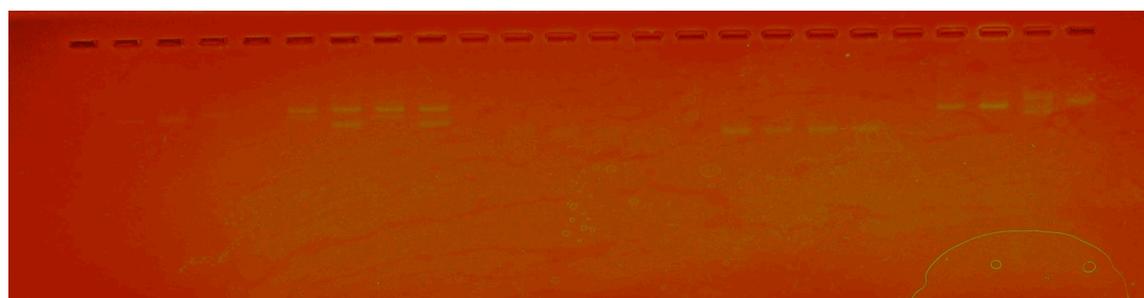
FORNASIERI FILHO, D. A cultura do milho. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico: CIMMYT, 1994, 50p.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79:361-382, 1998.

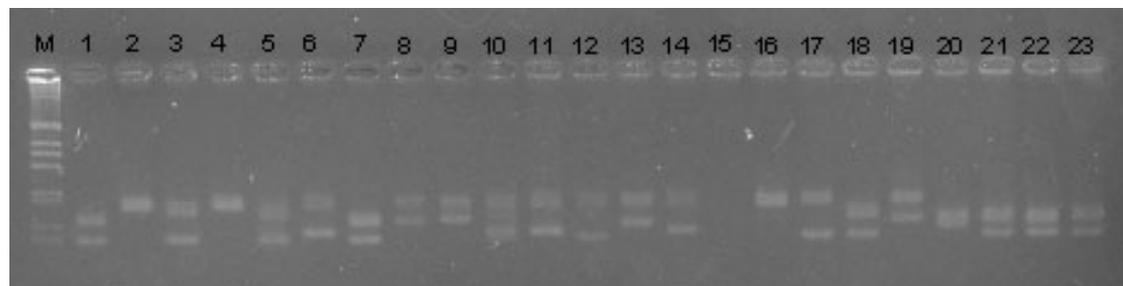
SCAPIM, C.A.; CRUZ, C.D.; ARAÚJO, J.M. Cruzamentos dialélicos entre sete cultivares de milho doce. *Horticultura Brasileira*, 13:19-21, 1995.

WIETHÖLTER, P. et al. Genetic variability in corn landraces from Southern Brazil. *Maydica*, 53:151-159, 2008.

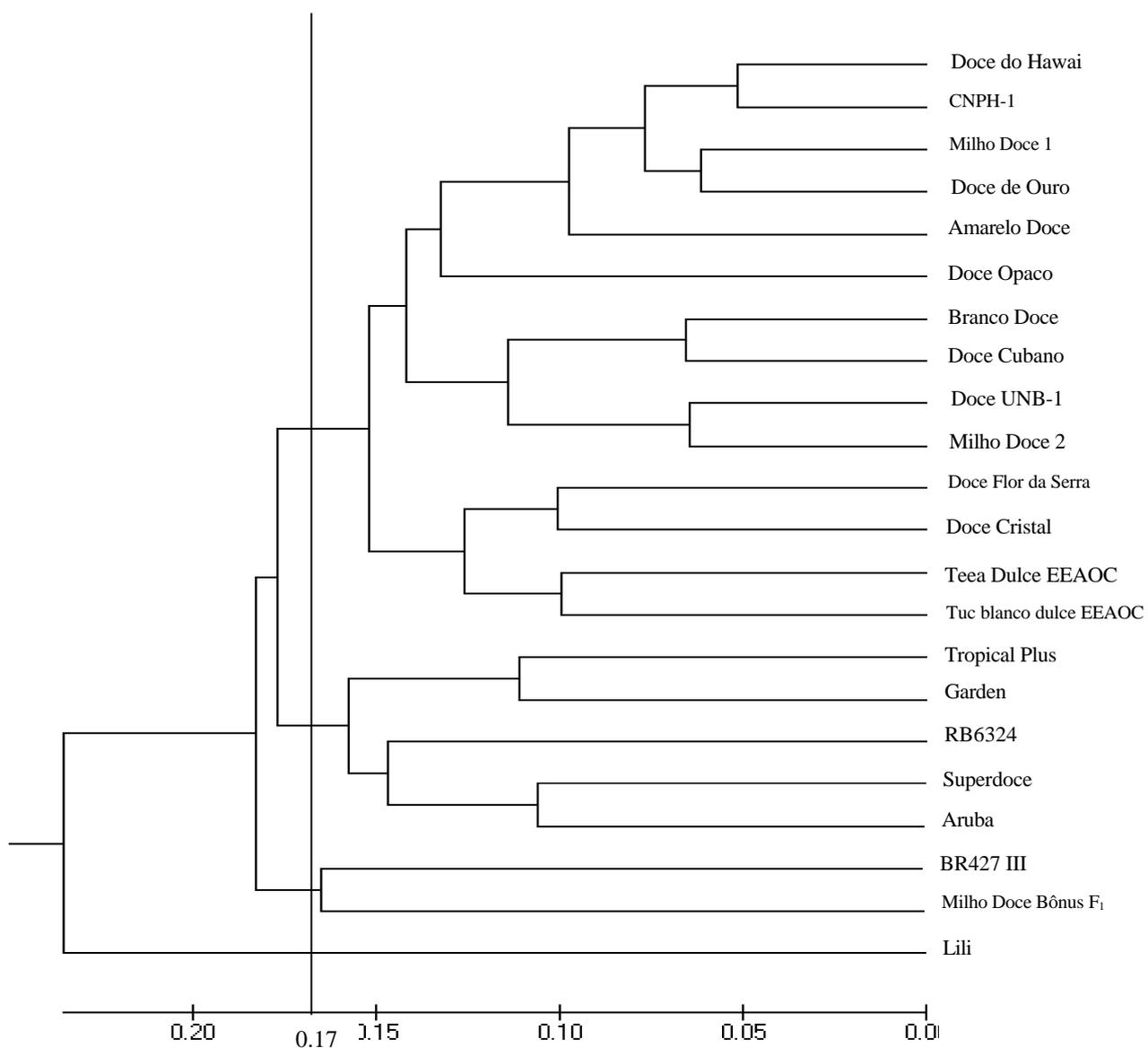


**Figura 1.** Teste de primer

s. Gel de agarose 4% preparado com 50% de agarose MS8 e 50% de agarose comum evidenciando o polimorfismo de 5 locos testados.



**Figura 2.** Amplificação do DNA genômico de 23 indivíduos dos diferentes genótipos de milho doce, utilizando o primer Umc2205 (M - Ladder 100pb).



**Figura 3.** Dendrograma resultante da análise de agrupamentos de 22 genótipos de milho doce com base na distância genética de Nei. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa MEGA 5.05.