

Análise de Diversidade Genética de Linhagens de Milho Tropical e Temperado por Marcadores Microssatélites

Fernando Rafael Alves Ferreira¹, Luiz Rafael Clovis¹, Carlos Alberto Scapim¹, Henrique José Camargo Senhorinho¹, Isaac Romani¹ e Edson Bolson¹

¹Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, nando_fraf@hotmail.com, luizrafaelclovis@hotmail.com, cascapi@uem.br, hsenhorinho@yahoo.com.br, isaac_romani@yahoo.com.br, edson.bolson@yahoo.com

Resumo- Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de 12 linhagens do programa de melhoramento da *Syngenta Seeds* LTDA, utilizando marcadores microssatélite. Para extrair o DNA foram coletadas folhas jovens de 10 plantas de cada uma das linhagens no campo experimental da Syngenta. Foram selecionados 20 *primers* polimórficos. A linhagem PD412 apresentou 35% e a PD620 exibiu 5% de loci SSRs polimórficos. O PIC variou de 0,239 para o *locus Umc2292* a 0,774 para o *locus Bnlgl371* sendo a média 0,580. As linhagens PD620, SF241 e PF771 foram agrupadas no mesmo grupo, assim também as linhagens PD391 e PF128, observadas tanto no dendrograma como na estrutura *Barplot*.

Palavras-Chave: *Zea mays* L. microssatélite, diversidade genética

Introdução

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são marcadores baseados em uma metodologia simples e rápida, capazes de gerar elevado conteúdo de informação genética e aptos a serem empregados em avaliação de divergência genética. As informações adquiridas com esses marcadores podem ser utilizadas para compor grupos heteróticos distintos. Legesse et al. (2007) avaliou 56 linhagens de milho do CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*) e com o método de análise UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) foram obtidos cinco grupos de linhagens.

Existem trabalhos que relatam que quanto maior for a divergência genética entre os parentais, maior será a heterose e, conseqüentemente, a produção do híbrido (Maluf et al., 1983). Entretanto, nem sempre a correlação entre divergência genética obtida por marcadores moleculares e o desempenho do híbrido é consistente (Barbosa et al., 2003).

Diante do exposto acima o objetivo deste trabalho foi relacionar a diversidade genética de 12 linhagens do programa de melhoramento da *Syngenta Seeds* LTDA, utilizando marcadores microssatélite.

Material e Métodos

As linhagens de milho (*Zea mays* L.) utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho fazem parte do programa de melhoramento da *Syngenta Seeds* LTDA. Na designação das linhagens, as letras H, S e P referem à duração do ciclo (H: Hiperprecoce, S: Superprecoce e P: Precoce). Já as letras D e F são referentes ao grupo heterótico, dentado e flint respectivamente (Quadro 1). Em função do ciclo, as linhagens são agrupadas em três grupos: a) precoce – cujo florescimento é superior a 1000 graus dia, b) superprecoce – o florescimento ocorre entre 900 a 1000 graus e c) hiperprecoce – florescimento ocorre em período inferior a 900 graus dia.

Para extrair o DNA foram coletadas folhas jovens de 10 plantas de cada uma das linhagens apresentadas no Quadro 1 no campo experimental da *Syngenta Seeds* LTDA. Estas folhas foram acondicionadas individualmente em envelope de papel alumínio mantidas em gelo, transportadas e congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer a -80°C. O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações, quantificado por espectrofotometria diluído para uma concentração padrão de 10 ng/•L.

Para a escolha dos marcadores polimórficos, foram avaliados 300 *primers* de microssátelites (<http://www.agron.missouri.edu>) já mapeados em milho três linhagens. Para o PCR inicialmente foi utilizado o programa Touchdown PCR (DON et al.1991) e após a amplificação as amostras foram fracionadas em gel de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8) em TBE 0,5X a 60 Volts por três horas corados com brometo de etídio (0,5• g/mL).

Foram selecionados 20 *primers* polimórficos para os três DNAs testados. Também foram escolhidos pelo menos um *primer* presente em cada um dos dez grupos de ligação do milho. Os marcadores foram analisados como sendo um caráter fenotípico distinto e independente dos demais. Conseqüentemente, bandas em comum entre linhagens representam similaridades genéticas, enquanto que bandas não comuns representam diferenças genéticas.

Dez indivíduos de cada linhagem foram analisados. Depois da amplificação, foi construída uma matriz com base na visualização das bandas encontradas nos géis.

A distância genética entre populações (Nei, 1972) foi estimada através de estatística descritiva pelo meio do programa GenAIEx 6.41 (Peakall e Smouse, 2006). O conteúdo de informações polimórficas (PIC) foi calculado utilizando o programa Power

Marker versão 3.25 (Liu e Muse, 2005) com base na distancia genética de Nei (1972).

A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrogramas construídos pela matriz de distâncias de Nei e pelo critério de agrupamento UPGMA (Sneath e Sokal, 1973), utilizando o programa Mega 5.05 (Tamura et al., 2011).

O programa STRUCTURE v. 2.3.2. (Pritchard et al. 2000), foi utilizado para gerar o modelo de separação de grupos (clusters) e atribuir indivíduos a um número K de clusters com base na estimativa Bayesiana para um dado número de dados X. Um gráfico dos coeficientes de associação para os genótipos e indivíduos foi gerado usando o programa DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Resultados e Discussão

O número de alelos amplificados para as diferentes linhagens variou de dois a seis alelos. O maior número de alelos foi verificado nos *loci Bnlg1371 e Umc1137*, para estes *loci* foram amplificados seis alelos.

O número de microssatélites polimórficos para as 12 linhagens de milho foi variável. Sendo que a linhagem PD412 apresentou 35% de SSRs polimórficos, seguida das linhagens HD128, SD462, PD391 com 20% de SSRs polimórficos. A proporção de SSR polimórficos para as linhagens PD317, PF128, PF771 e HD733, foi de 15%. Já as linhagens SF076, SF241 e HF001 exibiram 10% de polimorfismo nos *loci* SSRs, e a menor proporção de SSRs polimórficos foi detectada para linhagem PD620 com 5% de *loci* SSRs polimórficos.

A ocorrência de alelos nulos foi observada para os *primers* dos microssatélites *Bnlg2191* nas linhagens HD128, SD462 e em alguns indivíduos (amostra 2, 3 e 10) da linhagem PF128, e no *loci Bnlg2190* para a linhagem PF128. A confirmação da existência de alelo nulo nas referidas linhagens foi determinada, e só foi considerada, após três ampliações sem resultados.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,239 para o *locus Umc2292* a 0,774 para o *locus Bnlg1371*. A média foi de 0,580, valor semelhante ao encontrado por Terra et al (2011) e Bered et al (2005) (Quadro 2). Dos 20 *loci* analisados, 16 foram considerados altamente informativos, (PIC>0,5) de acordo com Botstein et al. (1980).

A análise das medidas de distância genética foi realizada pelo método de Nei (1972). De acordo com a matriz de distancia construída, detectou-se a maior distancia

genética entre as linhagens HD128 e PD620 (2,342) e a menor entre SF241 e PF771 (0,455).

O baixo valor de distância genética para as linhagens SF241 e PF771 confirma a base genética bastante similar, pois ambas têm a mesma origem. Por outro lado valores elevados indicam bastante divergência em relação a procedência dos materiais. Com base nas distâncias de Nei, foi realizada a análise de agrupamento pelo método UPGMA e um dendrograma foi construído (Figura 1). A separação em grupos nesse tipo de gráfico é feita de maneira subjetiva, escolhendo-se um ponto de corte na escala de distância.

O software STRUCTURE, utilizado para inferir sobre a estrutura da população, que abrange a heterogeneidade na distribuição dos genótipos e do grau de endogamia dentro de populações e entre estas, identificou 6 grupos genéticos dentro das 12 linhagens de milho. A determinação da formação dos grupos é realizada a partir do valor de ΔK , sendo que o maior valor observado foi de $\Delta K = 17.531,682$. indicando a formação de 6 grupos heteróticos.

A Figura 2 permite inferir que as 12 linhagens de milho representam acessos isolados uma vez que os seis grupos tem uma formação sólida com pouca miscigenação, sendo que a linhagem HD733 está representada por um só grupo.

As linhagens PD620, SF241 e PF771 formaram um grupo apesar de a linhagem PD620 não ter a mesma origem (Stiff Stalk Sintetic) que as linhagens SF241 e PF771 (Pop Suwan) podendo também ser constatado no dendrograma uma maior similaridade. Assim também as linhagens PD391 e PF128 estão agrupados no mesmo grupo tanto na estrutura *Barplot* quanto no dendrograma.

Conclusões

As linhagens PD620, SF241 e PF771 formaram um grupo constatado no dendrograma e na estrutura *Barplot*;

As linhagens PD391 e PF128 estão agrupados no mesmo grupo tanto na estrutura *Barplot* quanto no dendrograma;

A linhagem HD733 formou um grupo único na estrutura *Barplot*.

Literatura Citada

BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; BENCHIMOL, L.L.; GARCIA, A.A.F.;

SOUZA, C.L.; SOUZA, A.P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. *Euphytica*, 130:87-99, 2003.

Bered, F.; Terra, T.F.; Spellmeier, M.; Barbosa Neto, J.F. Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5: 418-425, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331, 1980.

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 Res.* v.19, p.4008-4008, 1991.

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

LEGESSE, B.W. et al. Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. *Hereditas*, 144:10-17, 2007.

Liu, K.; Muse, S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21:2128–2129, 2005.

MALUF, W.R., FERREIRA, P.E., MIRANDA, J.E.C. Genetic divergence in tomatoes and its relationship with heterosis for yield in F1 hybrids. *Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto*. V.3, p.453-460, 1983.;

Peakall, R.; Smouse, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6: 288-295, 2006.

Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959, 2000.

ROSENBERG, N.A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138, 2004.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numerical Taxonomy*. Freeman: San Francisco, 1973. 573 p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739, 2011.

Terra, T. de F.; Wiethölter, P.; Almeida, C.C. de; Anjos e Silva, S.D. dos; Bered, F.; Sereno, M.J.C. de M.; Barbosa Neto, J.F. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. *Ciência Rural*, 41:205-211, 2011.

Quadro 1. Dados das linhagens utilizadas.

Nº de REF.	LINHAGEM	CICLO	GRUPO	ORIGEM
1	HD128	Hiperprecoce	Dentado	Southern dent
2	HF001	Hiperprecoce	Flint	B73
3	HD733	Hiperprecoce	Dentado	Southern dent
4	SF076	Superprecoce	Flint	Lancaster
5	SF241	Superprecoce	Flint	Pop Suwan
6	PD620	Precoce	Dentado	Stiff Stalk Sintetic
7	PD412	Precoce	Dentado	Stiff Stalk Sintetic
8	SD462	Precoce	Dentado	Tuxpeno
9	PD391	Precoce	Dentado	Tuxpeno
10	PF128	Precoce	Flint	No Stiff Stalk Sintetic
11	PD317	Precoce	Dentado	Tuxpeno
12	PF771	Precoce	Flint	Pop Suwan

Quadro 2. Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC)

<i>Microsatelite</i>	PIC
Bnlg1367	0,671
Bnlg1927	0,639
Mmc0001	0,588
Mmc0111	0,736
Mmc0181	0,559
Bnlg1371	0,774
Bnlg2191	0,394
Umc1152	0,495
Umc1549	0,561
Umc2047	0,521
Umc2165	0,661
Umc1636	0,477
Umc1757	0,702
Umc1069	0,564
Umc2292	0,239
Umc1071	0,577
Umc2214	0,664
UMC1137	0,699
Umc2308	0,505
Bnlg2190	0,576
Média	0,580

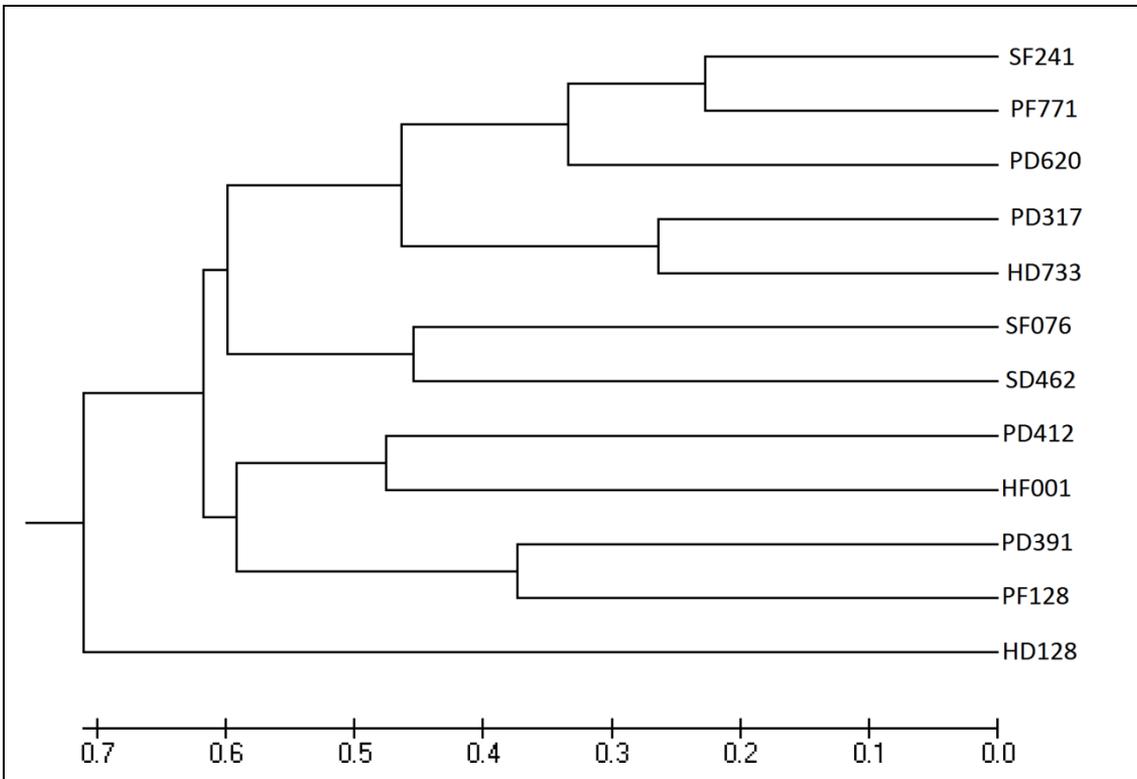


Figura 1 – Dendrograma de similaridade entre as 12 linhagens de milho do Quadro 1. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa MEGA 5.05.

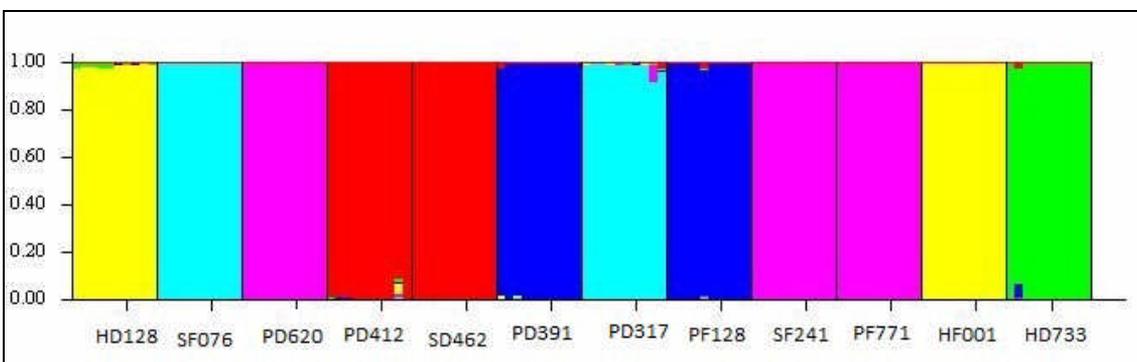


Figura 2. Estrutura *Barplot* populacional baseada em 20 locos microssatélites para as 12 linhagens de milho mostrando a distribuição das populações dentro dos K *clusters*. Genótipos e indivíduos estão representados na linha vertical, e cada agrupamento genético está representado por uma cor distinta. O gráfico foi obtido usando o software DISTRUCT.