

Caracterização Molecular e Determinação da Diversidade Genética entre Linhagens de Milho Tropical

FELIPE C.M. IANI, LILIAN PADILHA, ISABEL R.P. SOUZA, SIDNEY N. PARENTONI, ELTO E.G. GAMA, PAULO E.O. GUIMARÃES, CLESO A.P. PACHECO, WALTER F. MEIRELLES, EDILSON PAIVA e CLAUDIA T. GUIMARÃES¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 151, Rod MG 424 km 65, Sete Lagoas, MG 35701-970
e-mail: claudia@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: *fingerprinting*, *Zea mays* L., marcadores microssatélites, SSR

INTRODUÇÃO

O avanço genético de espécies cultivadas como o milho é alcançado por meio do melhoramento genético onde características desejáveis e herdáveis são selecionadas e devidamente combinadas. A base do melhoramento é a variabilidade genética, que precisa ser caracterizada e organizada dentro do germoplasma-elite de forma a gerar combinações híbridas superiores. A cultura do milho beneficia-se do fato de que a maioria dos materiais comercializados é constituída por híbridos, oferecendo uma barreira natural à utilização das sementes em plantios subseqüentes (Padilha, 2002). Tais híbridos apresentam elevada capacidade produtiva devido ao vigor, uma vez que são formados a partir de cruzamentos de linhagens pertencentes a grupos heteróticos distintos. Estes grupos são definidos com base na capacidade combinatória, cujo procedimento para alocação de linhagens é baseado nos dados de produção em cruzamentos dialélicos. Considerando que a formação dos grupos heteróticos demanda tempo, espaço e mão-de-obra, a utilização da divergência genética obtida por meio de dados moleculares permitiria uma análise mais rápida, buscando maximizar a eficiência na formação de híbridos.

A caracterização precisa dos materiais genéticos é também de fundamental importância para o melhoramento, uma vez que grandes investimentos são requeridos para a geração de cultivares superiores, mais adaptados e mais tolerantes a estresses. Uma grande conquista foi a instituição da Lei de Proteção de Cultivares (LPC), regulamentando o direito da cobrança de *royalties* pelas empresas que investem no desenvolvimento de cultivares (BRASIL, 1998). Entretanto, a proteção de cultivares é feita por meio de descritores morfológicos, bioquímicos ou moleculares que sejam herdados geneticamente, de fácil identificação e estáveis. Embora os marcadores moleculares apresentem vantagens como descritores, eles ainda não são reconhecidos como uma metodologia oficial.

A aplicação de técnicas moleculares na caracterização de cultivares e em análises de diversidade genética pode ser considerada uma grande contribuição da biotecnologia para o agronegócio. Dentre os vários tipos de marcadores moleculares existentes, os microssatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas) podem ser considerados os marcadores mais polimórficos disponíveis e com grande potencial de utilização em estudos genéticos. Tendo em vista a importância estratégica do programa de melhoramento de milho tropical da Embrapa Milho e Sorgo, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade genética entre linhagens-elite utilizando marcadores SSR e obter um perfil genético detalhado das mesmas para fins de proteção de cultivares.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 48 linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo abrangendo diferentes tipos de endosperma: duro, dentado e QPM (**Tabela 1**). O DNA genômico foi extraído de folhas de plântulas, sendo amostrados conjuntos de dez indivíduos para representar cada linhagem, utilizando o protocolo descrito por Saghai-Marroof et al. (1984).

TABELA 1. Identificação das 48 linhagens-elite de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, suas respectivas origens e tipo de endosperma.

Linhagem	Origem	Tipo de Endosperma	Linhagem	Origem	Tipo de Endosperma
L1017	BR105	Duro	L724	BR106	Dentado
L1154	BR105	Duro	L726	BR105	Duro
L13	CMS14	Duro	L504611-1	CMS50 x CMS14	Duro
L1611	BR106	Dentado	L504611-28-2	CMS50 x CMS14	Duro
L20	BR106	Dentado	L512388	BR105	Duro
L2283	BR106	Dentado	L514040	Sintético Híbridos	Dentado
L2841	CMS28	Dentado	L53c	CMS455 Pool 25	Duro – QPM
L2891	CMS28	Dentado	L723726-45	CMS03 x BR105	Duro
L37	CMS455 Pool 25	Duro – QPM	L876518	CMS453 Pop 65	Duro – QPM
L1011	BR105	Duro	L968	CMS28	Dentado
L11	CMS14	Duro	L1187	BR105	Duro
L111301	CMS14	Duro	L1199	BR105	Duro
L16	BR106	Dentado	L1612841-102-2	BR106 x CMS28	Dentado
L26	BR106	Dentado	L202841-1-1-2	BR106 x CMS28	Dentado
L3	SINT P	Duro	L262841-1-4-1	BR106 x CMS28	Dentado
L4	CMS455 Pool 25	Duro – QPM	L262841-1-8-2	BR106 x CMS28	Dentado
L420	BR106	Dentado	L3111301-1-4	SINT P x CMS14	Duro
L44	CMS456 Pool 26	Dentado – QPM	L45532	CMS455 Pool 25	Duro – QPM
L45611	CMS456 Pool 26	Dentado – QPM	L513330-01	SINT P	Duro
L527	BR105	Duro	L51502020	CMS50 x BR106	Dentado
L57	CMS14	Duro	L845	CMS28	Dentado
L64	CMS12	Duro	L723	CMS03	Duro
L65	CMS453 Pop 65	Duro – QPM	TR6dM25	Sintético Híbridos	Semi-dentado
PF963173	Passo Fundo Sint. Subtropical		PF973239	Passo Fundo Sint. Subtropical	

Foram utilizados 66 pares de *primers* SSR cujas informações estão disponíveis no *Maize Genetics and Genomics DataBase* (www.maizegdb.org). O *primer forward* de cada par foi marcado com uma das três fluorescências: azul (6-FAM), verde (HEX) e amarelo (NED). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo 30 ng de DNA; 1,0 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 2,0 mM de MgCl₂, 125 µM de cada um dos dNTPs, 0,6 µM de cada um dos *primers* e 1 U da enzima Taq polimerase. Os ciclos da reação de PCR e a análise dos fragmentos amplificados no seqüenciador ABI Prism 377 seguiram o protocolo descrito por Padilha (2002). Os programas Genscan 2.1 e Genotyper 2.0 (Applied Biosystems) foram utilizados para extração dos dados dos géis e conversão em planilhas contendo o tamanho em pares de base (pb) para cada alelo.

Para cada loco de microssatélite, a presença do alelo em homozigose foi codificada como 2, a sua ausência como 0 e a presença em heterozigose como 1. A ausência de amplificação foi confirmada duas vezes sendo esses considerados como alelos nulos em

homozigose. As frequências alélicas foram calculadas a partir destes dados e foram utilizadas para avaliar o conteúdo de informação de cada loco, por meio do índice de diversidade genética ou PIC, segundo a fórmula: $PIC = 1 - \sum(p_i)^2$, sendo p_i a frequência de cada alelo dentro do loco. O índice de similaridade genética foi calculado para cada par de linhagens como a proporção dos alelos compartilhados para todos os locos / $2 \times n^\circ$ de locos avaliados utilizando o programa GQMol (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm). A análise de diversidade foi realizada com o complemento do índice de similaridade entre cada par de linhagens, utilizando o método hierárquico UPGMA (*Unweight Pair-Group Method Arithmetic Average*) com auxílio do programa Statistica versão 4.2 (StatSoft Inc., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 66 *primers* SSR amostraram de maneira ampla o genoma do milho, totalizando 680 alelos entre as 48 linhagens de milho avaliadas. Os locos apresentaram uma média de 10 alelos variando de 2 (umc1359) a 21 (umc1035). Os alelos amplificados apresentaram tamanhos entre 50 e 400 pb, sendo que um *primer* apresentou um alelo maior que 500 pb (bnlg109) e outros dois apresentaram alelos menores que 50 pb (umc2011 e bnlg105). Os *primers* utilizados, suas respectivas posições no genoma, amplitude alélica, fluorescência e PIC estão apresentados na **Tabela 2**.

O valor médio do PIC ou heterozigosidade esperada foi de 0,78 variando entre 0,93 e 0,08. Devido aos elevados índices de PIC e ao grande número de alelos raros espera-se que um número pequeno de *primers* seja suficiente para a diferenciação das 48 linhagens. Este valor de PIC (0,78) foi próximo ao obtido por Padilha (2002), avaliando 35 linhagens de milho tropical com 25 *primers* SSR (0,76). Tais valores foram superiores ao obtido por Smith et al. (1997), 0,62, utilizando 131 *primers* SSR em 58 linhagens e quatro híbridos de milho de origem temperada. Liu et al. (2003), utilizando 94 *primers* SSR na genotipagem de 260 linhagens milho de origem tropical e temperada, incluindo linhagens dos Estados Unidos, Europa, Canadá, África do Sul e Tailândia, obtiveram uma heterozigosidade esperada média de 0,82. Tendo em vista que o referido trabalho é o que melhor representa o germoplasma elite de milho já publicado e comparando-se os índices de heterozigosidade média com o presente resultado, pode-se considerar que as 48 linhagens de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo representam em torno de 95% da diversidade genética observada utilizando marcadores SSR.

As informações relacionadas com o padrão de amplificação dos 66 *primers* SSR, incluindo os valores de frequências alélicas foram armazenadas em um banco de dados, que será o ponto de referência para os cálculos das probabilidades de identidade e de exclusão. Tais dados poderão ser utilizados na elaboração de descritores moleculares objetivando a sua inclusão nos processos de caracterização e proteção de cultivares de milho.

A partir do dendrograma, gerado com base nos dados moleculares, foi possível verificar uma grande coerência dos agrupamentos formados e o pedigree das linhagens (**Figura 1**). As distâncias genéticas abaixo de 0,40 evidenciaram linhagens selecionadas a partir de um mesmo cruzamento, como observado para as linhagens L504611-1 e L504611-2 que são originadas do cruzamento entre as linhagens L5046 e L11, e para as linhagens L262841-1-4-1 e L262841-1-8-2 que são derivadas do cruzamento entre L26 e L2841. Um terceiro agrupamento abaixo de 0,40 foi verificado entre as linhagens L968 e L845, que se justifica pelo fato das duas serem oriundas da mesma população de melhoramento CMS28. A linhagem L111301 é derivada do cruzamento entre a L11 e a L13, apresentando uma similaridade genética maior com a L13.

TABELA 2. Características dos 66 *primers* SSR amplificados, suas respectivas posições no genoma do milho (bin), números de alelos e PIC (conteúdo de informação de polimorfismo).

<i>Primer</i>	Bin	Nº de alelos	PIC	<i>Primer</i>	Bin	Nº de alelos	PIC
umc1071	1.01	6	0,4204	umc1019	5.06	16	0,9047
bnlg109	1.02	10	0,8431	umc1537	5.07	4	0,5321
bnlg182	1.03	11	0,8574	umc1792	5.08	4	0,5888
phi109275	1.03	8	0,7355	bnlg1371	6.01	15	0,9086
umc1035	1.06	21	0,9368	bnlg249	6.01	14	0,8676
bnlg1025	1.07	8	0,4941	bnlg153	6.01	17	0,7765
umc1671	1.10	4	0,5857	umc1887	6.03-6.04	5	0,6450
umc1862	1.11	4	0,5614	mmc0241	6.05	6	0,7042
bnlg1338	2.01	11	0,8639	bnlg345	6.06	14	0,8294
bnlg125	2.03	17	0,9004	phi089	6.08	6	0,6986
phi109642	2.03-2.04	5	0,5575	mmc0171	7.00-7.01	15	0,8372
bnlg381	2.04	14	0,8735	umc1066	7.01	3	0,4555
bnlg166	2.04	14	0,8926	dupssr11	7.02-7.03	12	0,7945
umc1875	2.06	12	0,8314	bnlg155	7.03	14	0,6641
mmc0191	2.07-2.08	11	0,7398	umc1015	7.03	10	0,8296
umc1970	3.01	7	0,7467	umc1359	7.04-7.05	2	0,0799
bnlg1325	3.02	12	0,8882	umc1786	8.01	9	0,7439
phi374118	3.02	5	0,6591	umc1872	8.02	5	0,6419
umc1148	3.07	15	0,8958	bnlg669	8.03	11	0,7899
umc2008	3.09	10	0,5983	bnlg666	8.05	17	0,9145
umc1008	4.00	10	0,8763	bnlg1031	8.06	13	0,8756
umc1759	4.01	7	0,5701	umc2014	8.07	17	0,9082
umc1963	4.04	4	0,5464	dupssr14	8.09	10	0,8001
bnlg2291	4.06	11	0,8804	umc1033	9.02	20	0,9158
bnlg1621	4.06	13	0,8898	phi061	9.03	6	0,6200
umc2011	4.10	15	0,8854	umc1771	9.04	6	0,6916
umc1222	4.10	14	0,8594	bnlg1588	9.07	10	0,7422
umc1781	5.01	5	0,6022	phi054	10.03	8	0,8277
bnlg105	5.02	12	0,8921	phi084	10.04	5	0,7268
bnlg1063	5.03	19	0,9277	bnlg594	10.06	10	0,7344
phi113	5.03-5.04	6	0,6897	umc1084	10.07	7	0,6393
umc1221	5.04	10	0,7333	umc2018	10.01-10.02	7	0,7316
mmc282	5.05	13	0,8987	Média		10	0,7765

De maneira geral as linhagens foram agrupadas em função do tipo de endosperma, duro ou dentado. Embora as linhagens de alta qualidade protéica ou QPMs tenham ficado dispersas ao longo dendrograma, houve uma tendência de aproximação destas às linhagens normais de mesmo tipo de endosperma, mesmo que a uma distância acima de 0,70. Um exemplo pode ser citado com relação às linhagens L44 e L420, onde a primeira é QPM e a segunda é normal, mas ambas são pertencentes ao tipo de endosperma dentado. Resultados semelhantes foram reportados por Padilha (2002), validando a técnica de marcadores SSR para a análise da diversidade genética entre linhagens de milho. A ampla variabilidade genética revelada entre e dentro de grupos pode ser utilizada como ferramenta adicional para sua exploração tanto na reciclagem de linhagens quanto na obtenção de híbridos.

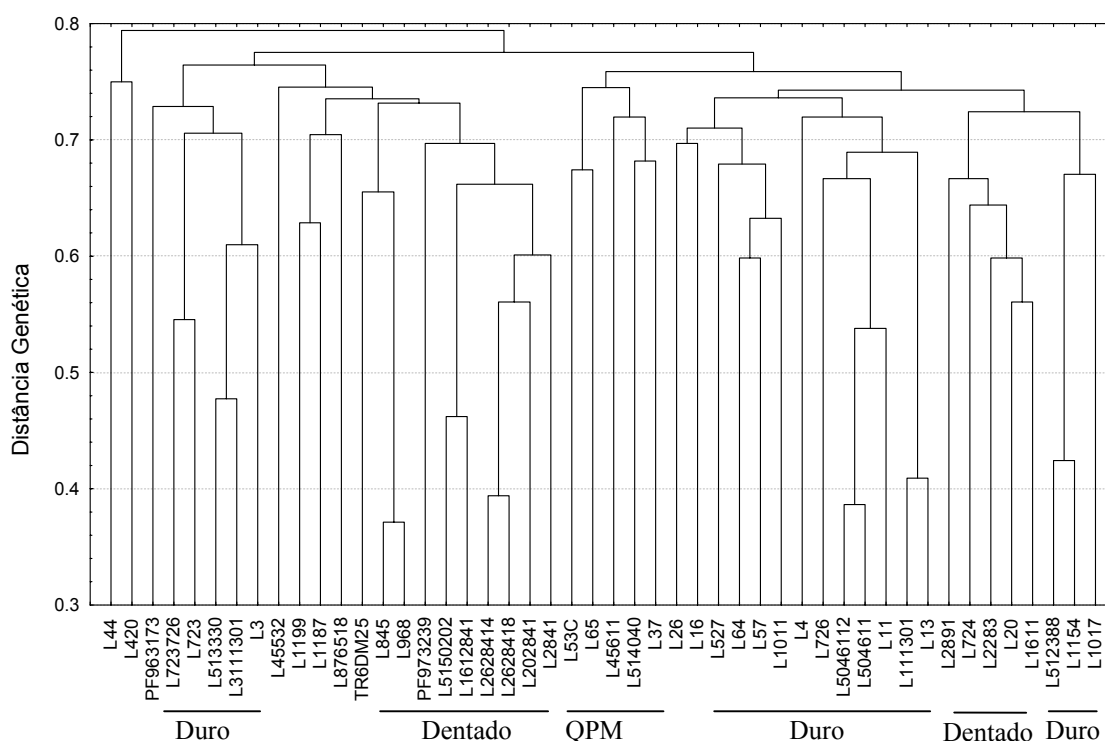


FIGURA 1. Dendrograma das 48 linhagens-elite de milho utilizando o método do UPGMA com base nos dados de marcadores SSR.

CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites foram eficientes na caracterização das linhagens de milho, podendo ser utilizados como descritores moleculares nos processos de proteção de cultivares e na avaliação da pureza genética em linhagens e lotes de sementes.

Observou-se a existência de uma grande diversidade genética no germoplasma-elite do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, que pode ser explorada visando à obtenção de cruzamentos superiores.

LITERATURA CITADA

- BRASIL. Lei n. 9.456, 25 abr. 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal. p. 15-30. 1997
- LIU, K.; GOODMAN, M.; MUSE, S.; SMITH, J. S.; BUCLER, E.; DOEBLEY, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, v. 165, p. 2117-2128, 2003.
- PADILHA, L. Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2002.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.A.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 8014-8018, 1984.
- SMITH, J. S.C.; CHIN, E. C. L.; H; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.*, v. 95, p. 163-173, 1997.