

Estudo da Diversidade Genética Entre Linhagens de Milho Tropical Utilizando Marcadores Moleculares Fluorescentes.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

GUIMARÃES C.T., Padilha L., SOUZA I.R.P., VIEIRA M.G.G.C., PARENTONI S.N., PACHECO C.A.P., SANTOS M.X., GAMA E.E.G., MEIRELLES W.F. e PAIVA E.

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 Sete Lagoas MG 35701-970 claudia@cnpms.embrapa.br

Palavras chave: diversidade genética, milho, AFLP, SSR

Introdução

Para a exploração adequada do germoplasma em um programa de melhoramento o conhecimento da diversidade genética entre as linhagens elite é de fundamental importância. Ela pode ser avaliada por dados de pedigree, fenotípicos, pela capacidade combinatória em cruzamentos dialélicos e por dados moleculares. Dentre as técnicas moleculares, os AFLPs e SSRs têm sido amplamente utilizados nos estudos de divergência genéticas entre materiais por serem precisos, facilmente reproduzíveis e passíveis de automatização. Segundo Fossati et al. (2001), ambas as técnicas são igualmente efetivas para definição das relações genéticas em videira, embora Teulat et al. (2000) sugiram que para a população de coqueiro, melhores resoluções das similaridades genéticas foram obtidas com AFLP, quando comparado com o SSR. Os SSRs, no entanto, são muito interessantes para revelar informações adicionais sobre diferenças nas combinações alélicas entre e dentro das populações, ressaltando regiões genômicas onde as composições alélicas seriam mais raras ou mais diversas. Lima et al. (2002) afirmam que os AFLPs podem ser mais informativos do que dados de pedigree para avaliar a variabilidade genética entre genótipos de cana-de-açúcar, caracterizados pela complexidade da natureza poliplóide do genoma e pela base genética relativamente estreita entre as cultivares. Para genótipos de milho, Senior et al. (1998) utilizaram 70 locos SSR para a validação de pedigrees e alocaram 94 linhagens elite, representando a diversidade do *Corn belt dent* e *Southern dent*, em nove grupos correspondentes aos principais grupos heteróticos já definidos. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a técnica semi-automatizada de AFLP e SSR para a determinação de relações genéticas entre 35 linhagens elite de milho tropical, englobando materiais com endosperma duro, dentado e de alta qualidade protéica.

Material e Métodos

As análises moleculares de 35 linhagens elites utilizadas no programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1) foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada. O DNA foi extraído de dez plântulas, representando cada linhagem, por meio da metodologia

descrita por Saghai-Marroof et al. (1984).

Para a amplificação dos locos SSRs foram utilizados 25 *primers* marcados com fluorescência (6-FAM, HEX e NED). As reações de PCR foram feitas isoladamente para cada fluorescência e os ciclos de amplificação foram realizados em duas condições para temperatura de anelamento dos *primer*, dependendo da especificidade do mesmo: *i*) realizado por 30 ciclos de 67°C/ 20 s ou *ii*) 68°C/ 20 s com redução de 1°C/ ciclo durante 9 ciclos, seguidos por 25 ciclos a 60°C/ 20 s. Aos produtos finais das reações de PCR, foi acrescentado o padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems), seguindo-se a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, a 2000 v por 3 h, no seqüenciador ABI Prism 377.

Para a técnica de AFLP, as reações de restrição com as enzimas *EcoRI* e *MseI* e a ligação de adaptadores ao DNA foram realizadas com o AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen – Life Technologies). Na reação de amplificação pré-seletiva foram utilizados *primers* com um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' e os ciclos de amplificação foram realizados com uma etapa de desnaturação a 92°C por 2 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 20 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 minutos, finalizados por uma etapa de extensão a 60°C por 30 minutos. Foram utilizadas 11 combinações de *primers* com três nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. A reação de amplificação seletiva foi realizada com 0,5 µM do *primer MseI* e 0,05 µM de cada um dos três *primers EcoRI* marcados com as diferentes fluorescências. As etapas de amplificação englobaram 10 ciclos a 94°C por 20 s, 66°C por 30 s com redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 2 minutos, seguidos de 20 ciclos a 94°C por 20 s, 56°C por 30 s, 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 60°C por 30 minutos. Os fragmentos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, no seqüenciador ABI Prism 377, sendo adicionado a cada amostra o marcador de peso molecular GS-500 ROX (Applied Biosystems)

Os dados foram extraídos do gel com o auxílio do programa Genescan 2.1 e, para os SSRs os polimorfismos foram avaliados automaticamente pelo programa Genotyper 2.0. Para o AFLP, foi feita avaliação visual dos géis e dos eletroferogramas, com a anotação manual dos resultados, sendo tabulados como dados binários onde o valor 1 (um) foi atribuído para a presença do alelo e o 0 (zero) para a sua ausência. O complemento dos coeficientes de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR foram utilizados para o cálculo das distâncias genéticas entre as 35 linhagens e o agrupamento das mesmas foi realizado pelo método UPGMA utilizando o programa Statistica versão 4.3.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada loco foi calculado segundo a fórmula (Weir, 1996): $PIC = 1 - \sum (p_i)^2$, onde p_i é a frequência do i -ésimo alelo para as 35 linhagens. Para a comparação dos dados obtidos pelos marcadores SSR e AFLP foi calculado o índice de marca (IM), de acordo com Powell et al. (1996) citados por Bohn et al. (1999) e Prasad et al. (2000) onde, $IM = (PIC \times \text{proporção de bandas polimórficas} \times \text{número de locos observados por combinação de primer})$. A correlação entre os dados de AFLP e de SSR foi avaliada utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) pelo programa Statistica versão 4.3.

Resultados e Discussão

Para os 25 locos SSR avaliados entre as 35 linhagens, foram obtidos 293 alelos, variando de três a 25 alelos amplificados por loco. A combinação de 11 *primers* AFLP

gerou um total de 260 fragmentos, sendo 158 polimórficos, com uma média de 14 bandas polimórficas por combinação de *primer*.

O AFLP se destacou em relação ao SSR em termos de número de fragmentos amplificados por experimento, o que refletiu num maior índice de marca para o AFLP, cujo valor de 5,59 foi, aproximadamente, sete vezes superior ao observado para os SSRs (0,76). A maior eficiência dos marcadores AFLP se deve à detecção de várias bandas polimórficas em uma única reação de amplificação (Pejic et al., 1998), uma vez que a técnica explora simultaneamente os polimorfismos de restrição e de amplificação. Assim, cada combinação de *primer* AFLP amplifica vários locos, já para os SSRs, cada *primer* amplifica os vários alelos de um único loco. Por outro lado, o conteúdo de informação polimórfica dos locos (PIC) foi superior para o AFLP (0,39) quando comparado ao SSR (0,76) quando comparado ao AFLP (0,39). Tais resultados concordam com os dados de Pejic et al. (1998) em milho, que encontraram valores muito próximos de PIC para os marcadores SSR (0,72) e AFLP (0,34).

De forma semelhante ao observado por Fossati et al. (2001) em videira, os índices de diversidade obtidos pelos marcadores AFLP e SSR apresentaram uma elevada correlação ($r = 0,82$), confirmando a eficiência de ambos os marcadores no estudo da variabilidade genética entre linhagens divergentes quanto as características do endosperma. Os dendrogramas gerados utilizando os índices calculados com base nos dados de SSR e AFLP evidenciaram os principais grupos de linhagens dentadas, duras e QPMs (Figuras 1 e 2). Todavia, o dendrograma gerado pelo AFLP parece ter definido melhor tanto o agrupamento das linhagens em função das características do endosperma e da qualidade protéica, quanto a formação de subgrupos envolvendo linhagens mais proximamente relacionadas com base nos dados de pedigree. A superioridade do AFLP em detectar tais associações genéticas pode ter sido em função da sua melhor capacidade de amostragem do genoma, concordando assim com Teulat et al. (2000) que afirmaram ser o AFLP mais apropriado para estudos de diversidade genética quando comparado aos SSRs.

No presente trabalho foi confirmado que os marcadores SSR foram mais informativos ao detectarem diferentes alelos por loco e que os marcadores AFLP foram mais eficientes na geração de dados por combinação de *primers*. Embora os marcadores AFLP e SSR tenham sido eficientes para agrupar as linhagens em função das características de endosperma e da qualidade protéica dos grãos, o AFLP explorou melhor as relações de parentesco genético entre as linhagens, se mostrando mais adequado para análises de diversidade genética.

Literatura Citada

- Bohn, M.; Utz, h.f.; melchinger, a.e. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. **Crop Science**, Madison, v.39, n.1, p.228-237. 1999.
- Fossati, T.; Labra, M.; Castiglione, S.; Failla, O.; Scienza, A.; Sala, F. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.2-3, p.200-205. 2001.
- lima, m.l.a.; garcia, a.a.f.; oliveira, k.m.; matsuoaka, s.; arizono, h.; souza jr., c.l.; souza, a.p. Analysis of genetic similarity by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, n.1-2, p.30-38. 2002.
- Pejic, I.; Ajmone-Marsan, P.; Morgante, M.; Kozumplik, V.; Castiglioni, P.; Taramino, G.; Motto,

- M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n.8, p.1248-1255. 1998.
- Prasad, m.; varshney, r.k.; roy, j.k.; balya, h.s.; gupta, p.k. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.3-4, p.584-592. 2000.
- Saghai-Marooif, M.A.; Soliman, k.m.; jorgensen, r.a.; allard, r.w. Ribossomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromossomal location, and population dynamics. **Proceeding of National Academic Science USA**, New York, v. 81, p.8014-8018. 1984.
- Senior, m.l.; murphy, j.p.; goodman, m.m.; stuber, c.w. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1088-1098, 1998.
- Teulat, B.; Aldam, C.; Trehin, r.; Lebrun, p.; barker, j.h.a.; arnold, g.m.; karp, a.; baudouin, l. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.5, p.764-771. 2000.
- Weir, B.S. **Genetic data analysis II**. 2.ed. rev. and exp. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

Tabela 1. Informações relativas ao pedigree, tipo de endosperma e qualidade protéica dos grãos de 35 linhagens de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo 2001 (comunicação pessoal).

Linagem	Pedigree/ População de origem	Tipo de Endosperma	Linagem	Pedigree/ População de origem	Tipo de Endosperma
L1	BR105	Duro	L19	CMS 456 (26 QPM)	dentado/ QPM
L2	BR105	duro	L20	BR105	duro
L3	CMS14	duro	L21	CMS14	duro
L4	Sintético - BR106	dentado	L22	CMS12	duro
L5	BR106	dentado	L23	CMS 453 (QPM)	duro/ QPM
L6	Sintético - BR106	dentado	L24	CMS03	duro
L7	CMS28	dentado	L25	BR106	dentado
L8	CMS28	dentado	L26	BR105	duro
L9	CMS 455 (QPM)	duro/ QPM	L27	CMS50	duro
L10	BR105	duro	L28	CMS50 x CMS14	Duro
L11	CMS14	duro	L29	BR105	Duro
L12	CMS14	duro	L30	híbrido comercial	dentado
L13	BR106	dentado	L31	CMS 455 (QPM)	duro/ QPM
L14	BR106	dentado	L32	CMS03 x BR105	duro
L15	Sintético 14	duro	L33	CMS 453 (QPM)	duro/ QPM
L16	CMS 455 (QPM)	duro/ QPM	L34	BR106	dentado
L17	BR106	dentado	L35	CMS28	dentado
L18	CMS 456 (QPM)	dentado/ QPM			

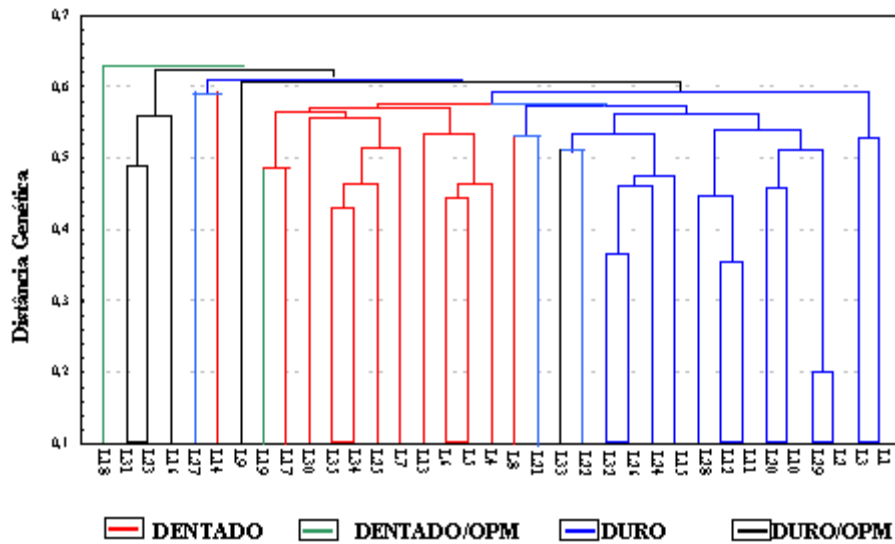


Figura 1. Dendrograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA com base no complemento dos índices de similaridade de Jaccard, calculado utilizando marcadores AFLP.

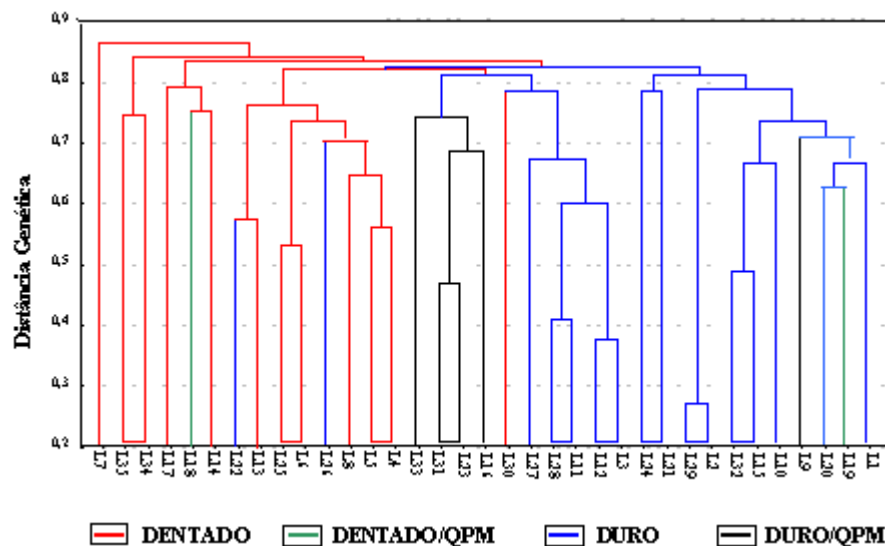


Figura 2. Dendrograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA com base no complemento dos índices de similaridade de Nei e Li, calculado utilizando marcadores SSR.