

Utilização de Marcadores Microssatélites (SSR) para Análise da Diversidade Genética e da Estrutura de Populações de Milho Pipoca (*Zea Mays* L.)

Tereza Aparecida da Silva¹, Acácio Antonio Miotto², Klayton Flávio Milani³, Marlon Matias Dacal Coan⁴, Lucas Rafael de Souza Camacho⁵, Henrique José Camargo Senhorinho⁶, José Lidércio Matias Júnior⁷ e Ronald José Barth Pinto⁸

Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR ¹teinhbio@yahoo.com.br, ²acaciomiotto@gmail.com, ³kf_milani@hotmail.com, ⁴marloncoan@gmail.com, ⁵lucascamacho88@gmail.com, ⁶hsenhorinho@hotmail.com, ⁷jr_lidercio@hotmail.com e ⁸rjbpinto@uem.br

RESUMO- Para avaliação da diversidade genética e a estrutura de 31 populações de milho pipoca do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá (UEM) utilizou-se marcadores *SSR*. Para os 30 *loci* avaliados foram identificados 127 alelos. O número de alelos por *locus* variou de 2 a 8, com um número médio de 4,23 alelos/*locus*. Considerando todos os genótipos, a média geral de *locus* polimórficos foi de 79,89% sendo que, o genótipo 7-BOZM 260 apresentou polimorfismo para todos os 30 *locus* testados (100%), portanto, podendo ser recomendado para cruzamento com plantas que apresentem características agronômicas desejáveis, no sentido de ampliar a base genética de genótipos do milho pipoca. Os *primers Umc1549* e *Umc1072* revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados. A heterozigidade média observada variou entre 0,071 e 0,3, sendo o genótipo 7-BOZM 260 o que apresentou maior proporção de plantas heterozigotas observadas (0,3). O dendrograma obtido pelo método UPGMA revelou que os genótipos 31-TATU 2 e 4-ARZM 05 083 apresentam menor similaridade genética em relação aos demais e que a realização de cruzamentos entre estes genótipos pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de heterozigose, supondo uma estratégia voltada à seleção e exploração de heterose.

Palavras-chave: dendrograma, UPGMA, iniciadores.

Introdução

O melhoramento de milho pipoca no Brasil ainda deixa a desejar e tem sido considerado um investimento importante para reduzir a importação de grãos, e para o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às diferentes regiões do país. Para obtenção de combinações híbridas superiores, Hallauer e Miranda Filho (1988) relatam a primazia por cruzamentos entre materiais de grupos heteróticos distintos. Desse modo, os estudos sobre divergência genética têm sido de grande importância em programas de melhoramento envolvendo hibridações, pois podem ser usados para selecionar genitores potencialmente promissores para gerar populações com elevada variabilidade e adaptação, que, quando cruzados, aumentam as chances de recuperarem genótipos superiores nas gerações segregantes, permitindo aos melhoristas concentrarem seus esforços em um menor número de combinações híbridas, ou seja, entre os materiais mais divergentes (RINALD et al., 2007). A caracterização genética de populações de milho pipoca, destinadas ao melhoramento, pode ser

feita usando marcadores moleculares. A análise de *loci SSR* (*Simple Sequence Repeated*; Sequências Simples Repetidas de DNA genômico; TAUTZ 1989, 1993), tem sido uma técnica de análise molecular considerada adequada para estimar a diversidade genética em genótipos de milho pipoca. O número de investigações que procuram caracterizar a diversidade genética de milho pipoca 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, a proposta do presente estudo foi analisar *loci SSR* em 31 populações de milho pipoca oriundas do banco de germoplasma da UEM, a fim de selecionar e relacionar os *loci SSR* promissores para estimativas de diversidade genética e analisar a variabilidade genética das populações.

Material e Métodos

Analisou-se 31 genótipos de milho pipoca (Tabela 1) com o uso de 15 plantas de cada genótipo para verificação da variabilidade e distância genética, totalizando 465 amostras.

O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações, que consistiram em: a) adicionar menor volume de tampão CTAB e de solução clorofórmio: álcool isoamílico (800•L ao invés de 1mL; devido à um menor volume de sobrenadante recuperado); b) substituir o octanol por álcool isoamílico na purificação com clorofórmio: álcool isoamílico; c) acrescentar duas purificações com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); d) acrescentar duas precipitações do DNA com isopropanol (uma sem e outra com sal); e) adicionar menor volume de RNase (2•L ao invés de 10•L); f) acrescentar uma purificação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1); g) acrescentar duas lavagens com etanol 70%.

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o equipamento Qubit fluorometer e após a diluição a concentração do DNA utilizada para amplificação foi de 10ng μL^{-1} .

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia da Polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2mL. Para a amplificação do DNA e seleção dos *primers* foram utilizados: 25ng de DNA de três amostras, com 2,0 μL de tampão de reação 10X, 2,5mM de MgCl_2 , 0,8 μM de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen), e 0,4 μM de *primers* F e R específicos para um volume final de 20•L.

A seleção dos microssatélites foi feita utilizando-se três amostras de DNA das progênies, escolhidas ao acaso, e analisadas em gel de agarose Metaphor ou MS-8 para verificar a complementaridade e reprodutibilidade dos *primers*. Os microssatélites utilizados

foram obtidos a partir do *site Maize DB* acessado em: <http://www.maizegdb.org/ssr.php>.

Para a amplificação dos microssatélites, foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (DON et al. 1991). Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 4%, usando 50% de agarose comum e 50% agarose Metaphor (CAMBREX) e tampão TBE 0,5X (44,5mM Tris, 44,5mM ácido bórico, e 1mM EDTA). A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 60V durante, aproximadamente, quatro horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução com brometo de etídio contendo 0,5mg mL⁻¹ ou SYBR® Safe DNA gel stain e a imagem capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5. O tamanho dos fragmentos amplificados foi definido pelo marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen).

Para analisar a diversidade genética nas populações de milho pipoca, 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 *locus* SSR.

Foi determinada a heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada de Nei (H_e), o número de alelos em cada um dos *loci* SSR, o número médio de alelos por *locus*, número efetivo de alelos e a porcentagem de alelos polimórficos, para cada população.

Para complementar os dados populacionais, foi realizada a análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000). O número de *clusters* foi inferido pelo método proposto por Evanno et al. (2005).

A distância genética entre os acessos foi estimada pela distância modificada de Rogers (1972), calculada por meio do programa *Tools for Population Genetic Analyses*. A partir das distâncias genéticas de Rogers, foi construído um dendrograma por meio da análise de agrupamento (*cluster*) UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*), com o programa Mega 5.05 (TAMURA et al., 2011).

Resultados e Discussão

O método de extração de DNA descrito por Hoisington et al. (1994), com modificações, foi adequado para produzir DNA de qualidade e em quantidade suficiente para estudar a estrutura de população e divergência genética das 465 plantas dos 31 genótipos.

Dos 159 *primers* microssatélites isolados para milho comum e testados para milho pipoca, 13 não amplificaram nos 31 genótipos de milho pipoca. Dos 146 *primers* microssatélites que amplificaram o DNA, 42 foram considerados polimórficos para os 31 genótipos, e utilizou-se 30 desses *primers* para o estudo da variabilidade genética.

Dentre os 30 *primers* polimórficos utilizados para a análise dos 30 *loci* SSR, 9 apresentaram 4 alelos (*Umc1137*, *Umc1071*, *Umc1415*, *Umc1549*, *Bnlg2295*, *Umc1072*, *Mmc0501*, *Umc1524* e *Umc2164*); 7 apresentaram 3 alelos (*Umc2401*, *Umc2108*, *Umc2118*, *Umc2059*, *Umc1363*, *Umc2302* e *Umc2165*); 6 apresentaram 5 alelos (*Umc2246*, *Umc1755*, *Umc2166*, *Umc1118*, *Umc1642* e *Umc1635*); 3 apresentaram 2 alelos (*Umc1125*, *Umc1336* e *Umc1847*); 3 apresentaram 6 alelos (*Mmc0271*, *Umc1065*, *Umc2205*) e 2 apresentaram 8 alelos (*Bnlg1175* e *Umc1653*). Estes 30 *primers* identificaram 127 alelos, e o número de alelos por *locus* variou de 2 a 8, com uma média de 4,23 alelos/*locus* polimórfico.

Para a maior parte dos *loci*, a heterozigiosidade média observada (H_o) foi menor que heterozigiosidade média esperada (H_e), exceto para os *Loci*: *Umc1125* ($H_o=0,312$ $H_e=0,301$), *Umc1415* ($H_o=0,056$; $H_e=0,050$), *Umc1549* ($H_o=0,766$; $H_e=0,463$) e *Umc1072* ($H_o=0,987$; $H_e=0,563$). O *locus Umc2108* apresentou a menor H_o , 0,027, enquanto os maiores valores para H_o e H_e foram evidentes no *locus Umc1072* ($H_o=0,978$ e $H_e=0,563$).

Os *primers Umc1549* e *Umc1072* revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, além de apresentarem valores de heterozigiosidade observada acima de 70% (0,766 e 0,987, respectivamente) sendo apontados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho pipoca.

O nível de divergência genética calculada pelo coeficiente de distância genética de Rogers (1972) entre os 31 genótipos nos 30 *loci* SSR está no dendrograma da Figura 1.

O dendrograma obtido pelo método UPGMA revelou a presença de um grupo inicial formado por 18 genótipos. Dentre esses, os cinco acessos provenientes da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) ficaram alocados neste primeiro grupo, sendo eles: 18-UNB-2U C1; 19-UNB-2U C2; 20-UENFV-Explosivo C4; 21-UNB-2U C3 e 29-UNB-2U C0. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Amaral Junior et al. (2011), que trabalhou com marcadores moleculares ISSR e acessos de milho comum, pipoca, doce, teosinte e *Tripsacum*, alocando esses mesmos cinco acessos no grupo três de seu dendrograma.

Dos nove acessos provenientes do CIMMYT, seis fazem parte do primeiro grupo, sendo eles: 2-ARZM 13 050; 3-URUG 298; 5-PARA 172; 6-ARZM 07 049; 7-BOZM 260 e 8-BOYA 462. Os acessos 1-CHZM 130134 e 4-ARZM 05083 ficaram alocados sozinhos nos grupos três e seis respectivamente, e o acesso 26-PARA 170 ficou alocado no grupo quatro. No segundo grupo foram reunidos os acessos 14-SE 013; 15-Viçosa e 16-RS-20, estes três acessos também ficaram reunidos no mesmo *cluster* pelo método de Evanno et al. (2005).

No quinto grupo se encontram os acessos brasileiros comerciais 9-IAC-125, 10-IAC-112, 11-Jade e 12-Zélia e 13-Argentina. Os genótipos Jade e Zélia são híbridos triplos desenvolvidos pela empresa DuPont do Brasil S.A. Pioneer sementes, a partir de mesclas entre germoplasma temperado e tropical. O híbrido IAC-112 foi desenvolvido por Eduardo Sawazaki no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e se originou da combinação de linhagens da variedade SAM, com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani e Viçosa Amarelo. A variedade SAM foi introduzida pelo IAC, em 1941, sendo proveniente de *South American*, raça de origem Argentina e melhorada nos Estados Unidos da América. O genótipo IAC-125 é um híbrido *topcross* também proveniente do IAC.

Pelo método UPGMA os acessos 28-TATU 1 e 31-TATU 2 foram alocados em grupos distintos. Ambos são oriundos da UEM, e foram disponibilizados por produtores rurais da região Oeste do Paraná. Eles apresentam algumas distinções, como a cor do endosperma, que no acesso 28-TATU 1 é preto e roxo e no acesso 31-TATU 2 é branco, porém, utilizando a metodologia de Evanno et al. (2005), ambos ficaram alocados no mesmo *cluster*.

Conclusões

Os *primers Umc1549* e *Umc1072* revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, além de apresentarem valores de heterozigidade observada acima de 70%, sendo apontados como promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho pipoca.

A maior diferenciação genética foi no *locus Umc2118*, sendo este o mais adequado para diferenciar os 31 genótipos no que refere a frequência diferencial dos alelos.

O genótipo 7-BOZM 260 apresentou heterozigidade observada alta, e pode ser considerado promissor para seleção continuada de progênies. Este também revelou maior proporção de *locus* polimórficos (100%), sendo recomendado para cruzamento com plantas que apresentem características agronômicas desejáveis visando a ampliação da base genética.

Os genótipos 4-ARZM 05 083 e 31-TATU 2 são os mais divergentes geneticamente, a realização de cruzamentos entre estes genótipos pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de heterozigose, supondo uma estratégia voltada à seleção e exploração de heterose.

Literatura Citada

AMARAL JUNIOR, A.T.; OLIVEIRA, E.C.; GONSALVES, L.S.A.; CANDIDO, L.S.; SILVA, T.R.C.; VITORAZZI, C.; SCAPIM, C.A. Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology. v.10, p.15462-15469, 2011.

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.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology.* v.14: p.2611-2620, 2005.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. Quantitative genetics in maize breeding. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1988. 468 p.

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

PRITCHARD, J.K.; STEPHEENS, M.; DONNELLY, P. Interference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* v.155, p.945-959, 2000.

RINALDI, D.A.; PIPOLO, V.C.; GRAGE, A.C.; RUAS, C.F.; JUNIOR, N.S.F.; SOUZA, A.; SOUZA, S.G.H.; GARBUGLIO, D.D. Correlação entre heterose e divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho-pipoca. *Bragantia*, v.66, n.2, p.183-192, 2007.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: Measures of genetic similarity and genetic distance. In: Studies in genetics. VII. Austin, University of Texas, p. 145-153, 1972.

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.* n. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research.* n.17, v.16, p.6463-647, 1989.

TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *In: PENA, S. D. J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLIN, J. T.; JEFFREYS, A. J. DNA fingerprinting: state of the science.* Birkhauser, Basel: Switzerland., 1993. p. 21-28.

Tabela 1. Genótipos avaliados, características fenotípicas e procedência dos materiais.

Genótipo	Dias para Florescimento	Peso de 100 sementes (g)	Cariopse		Procedência
			Pericarpo	Endosperma	
1- CHZM 13 0134	50	11,09	marrom	AM/AL *	CIMMYT
2- ARZM 13 050	63	16,22	Incolor	Branco e Amarelo	CIMMYT
3- URUG 298	59	7,83	Vermelha	Laranja	CIMMYT
4- ARZM 05 083	76	9,76	Incolor	Branca	CIMMYT
5- PARA 172	69	12,14	Incolor	Branco e Amarelo	CIMMYT
6-ARZM 07 049	70	16,47	Incolor	Laranja	CIMMYT
7- BOZM 260	61	12,86	Incolor	Branco	CIMMYT
8- BOYA 462	82	16,54	Incolor	Incolor e Preto/roxa	CIMMYT
9- IAC-125	-	15,00	Incolor	Laranja	IAC
10- IAC-112	-	13,30	Incolor	Laranja	IAC
11- JADE	-	17,83	Incolor	Laranja	Pioneer Hi-bred
Continuação Tabela 1					
12- Zélia	-	13,72	Incolor	Laranja	Pioneer Hi-bred
13- ARGENTINA	-	-	Incolor	AM/AL *	UEM
14- SE 013	-	-	Incolor	Branco e Amarelo	UEM
15- Viçosa	62	14,64	Amarela	Laranja	UFV
16- RS-20	59	10,75	Incolor	Laranja	IPAGRO/AGROESTE
17- BELJA-FLOR	56	15,69	Incolor	Laranja	UFV
18- UNB-2UC1	59	14,77	Incolor	Laranja	UENF
19- UNB-2UC2	56	15,18	Incolor	Laranja	UENF
20- UENFV-Explosivo C4	56	15,68	Incolor	Laranja	UENF
21- UNB-2UC3	56	15,63	Incolor	Laranja	UENF
22- PA 091	-	-	Incolor	Amarelo	UEM
23- PR-023	68	16,80	Incolor	Laranja	UEM
24- BRS ANGELA	74	10,52	Incolor	Branco	Embrapa
25- SAM	-	14,49	Incolor	Laranja	Sul-americana/EUA
26- PARA 170	85	6,55	Incolor e marrom	Branco	CIMMYT
27- COLOMBIANA	-	11,66	Incolor	Laranja	UEM
28- TATU 1	-	8,70	Incolor	Preto/Roxo	UEM
29- UNB-2U C0	60	14,30	Incolor	Laranja	UENF
30- UFVM2-Barão Viçosa	62	12,18	Incolor	Laranja	UFV
31- TATU 2	-	8,00	Incolor	Branco	UEM

*AM=Amarelo e AL=Alaranjado

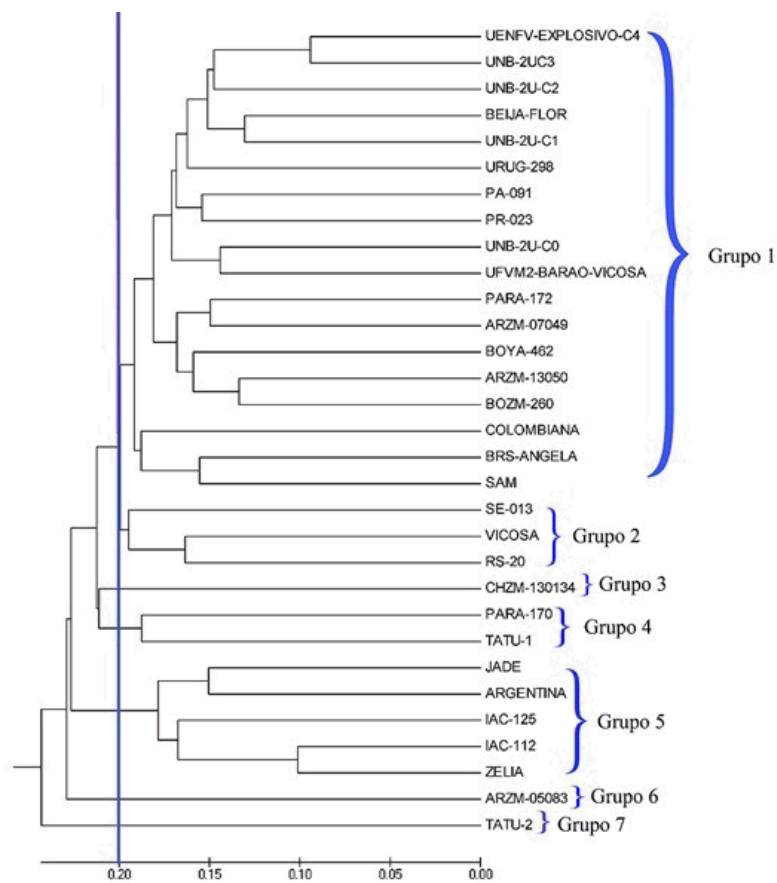


Figura 1 - Distância genética entre os 31 genótipos de milho pipoca (Rogers, 1972). A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa Mega 5.05.