

Diversidade genética entre populações de milho-doce

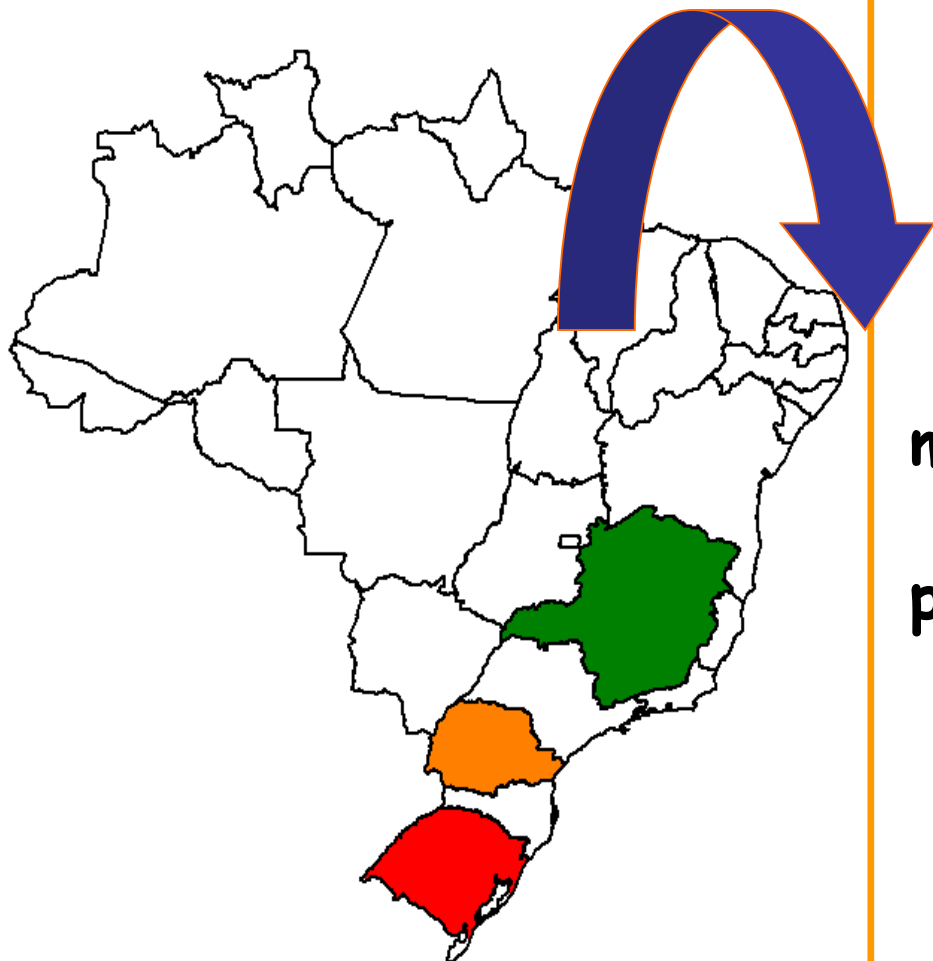
Dra. Ana Daniela Lopes

Pós-doutoranda em Biotecnologia aplicada à agricultura

MILHO

- Origem: América
- Adaptabilidade a diversos ambientes
- 160 milhões de hectares
- Cultivado em praticamente todas as regiões do mundo, nos hemisférios norte e sul
- Climas úmidos e regiões secas





- Cultiva-se 15,12 milhões hectares de milho
- Como um dos maiores produtores de milho do mundo, é natural que o Brasil apresente potencial para a produção de milhos especiais, entre eles o milho doce
- Milho Doce = 35 mil de hectares (GO, MG)

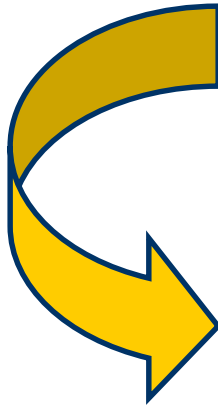
MILHO DOCE



Teor de açúcar



Amido no endosperma



Enrugados e translúcidos

Milho doce = uma espécie distinta, usada como fonte de alimento pelos índios norte-americanos durante a era pré-colombiana



Milho doce = produto de uma mutação de origem relativamente recente, provinda do milho comum



Alelos mutantes de endosperma de milho doce

Alelos	Símbolo	Enzima	Fenótipo
<i>Amylose-extender 1</i>	<i>ae</i>	Starch branching enzyme lib	Doce
<i>Brittle 1</i>	<i>bt1</i>	Starch granule bound phospho-oligosaccharide synthase	Superdoce
<i>Brittle 2</i>	<i>bt2</i>	ADH-glucose pyrophosphorylase	Superdoce
<i>Dull 1</i>	<i>du1</i>	Soluble starch synthase	Doce
<i>Shrunken 2</i>	<i>sh2</i>	ADH-glicose fosforilase	Superdoce
<i>Sugary</i>	<i>su1</i>	Starch debranching isoamylase	Doce
<i>Sugary enhancer</i>	<i>se1</i>	Desconhecido	Superdoce

Pode ser utilizado como:

- **Conserva (enlatado)**
- **Congelado na forma de espigas ou grãos**
- **Desidratado**
- **Consumido *in natura***
- **Colhido antes da polinização e usado como *baby corn* (minimilho)**
- **Após a colheita, utilizado para silagem**
- **Não viável no preparo de alguns pratos – curau e pamonha**

O Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças
juntamente com o Centro Nacional de Pesquisa de
Milho e Sorgo



Desenvolveram e
lançaram, em 1984, três
cultivares de milho doce:
Superdoce, Doce-de-ouro
e Doce-cristal



Posteriormente,
lançaram dois novos
híbridos simples, Lili e
Docemel

Programa de melhoramento de milho doce - UEM

Objetivo: obtenção de híbridos de linhagens

A primeira consiste na obtenção de linhagens de híbridos comerciais por meio de autofecundações sucessivas, acasalamentos entre irmãos e indutores de haploidia

A segunda parte do programa visa a transferência dos alelos *sugary-1* e *shrunk-2* de materiais comerciais de milho doce para linhagens de milho normal por meio de retrocruzamentos

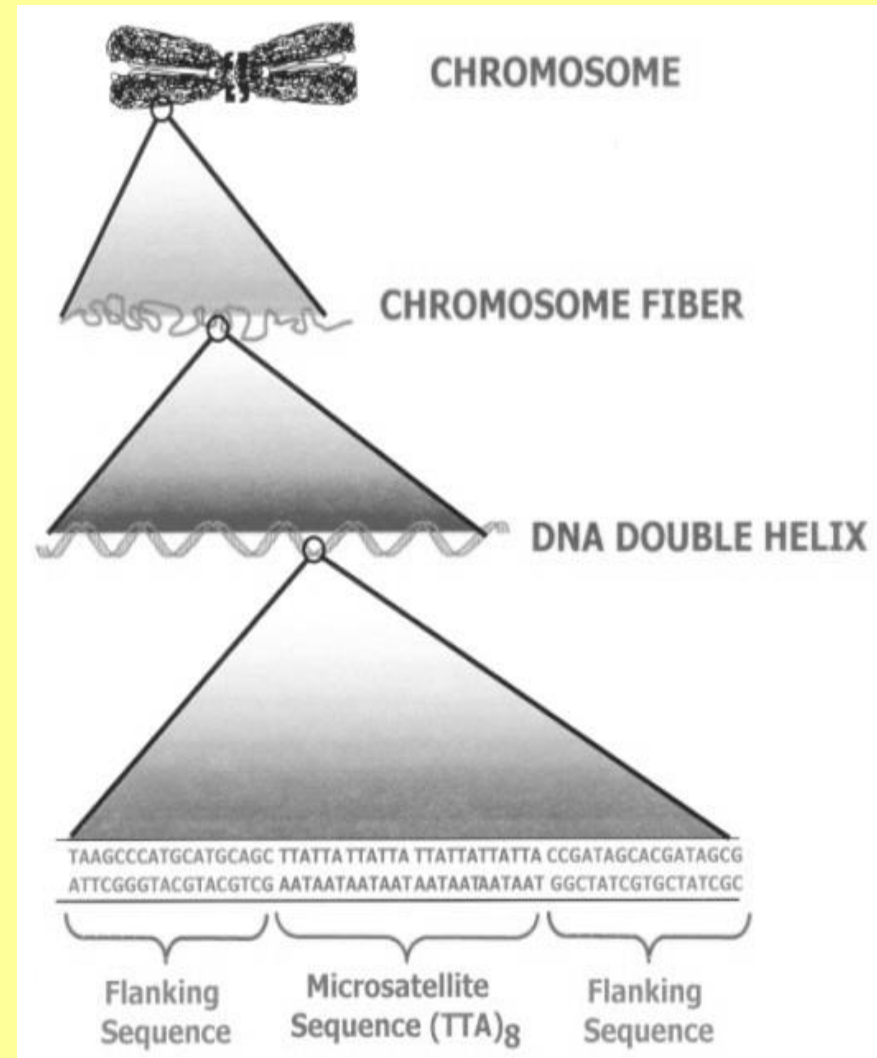
A close-up photograph of several ears of corn. The image highlights the diversity of corn varieties through different colors and textures. On the left, a large ear of yellow corn is shown with a distinct, wavy, braided texture. To its right, a cob of red corn is visible. In the upper right, another ear of yellow corn is partially seen. On the far right, a multi-colored corn cob features a mix of yellow, red, and dark purple kernels. The background is filled with more ears of corn, creating a rich, textured composition.

VARIABILIDADE DO MILHO

Microssatélites

Definição

- Repetições de di, tri ou tetranucleotídeos;
- Sequências curtas (1 a 6 bases) repetidas em tandem;
- Multialélicos - alta heterozigosidade;
- Multialélicos - altamente informativos;
- Presentes em procariotos e eucariotos



Microsatélites

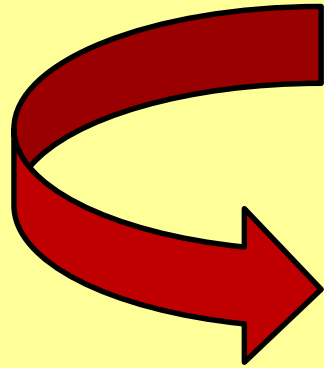
Vantagens

- Codominantes;
- Reprodutibilidade e Simplicidade;
- Cobertura extensiva e aleatória do genoma;
- Presentes em regiões codificantes e não codificantes;
- Altamente polimórficos

Microsatélites

Vantagens

Alto polimorfismo

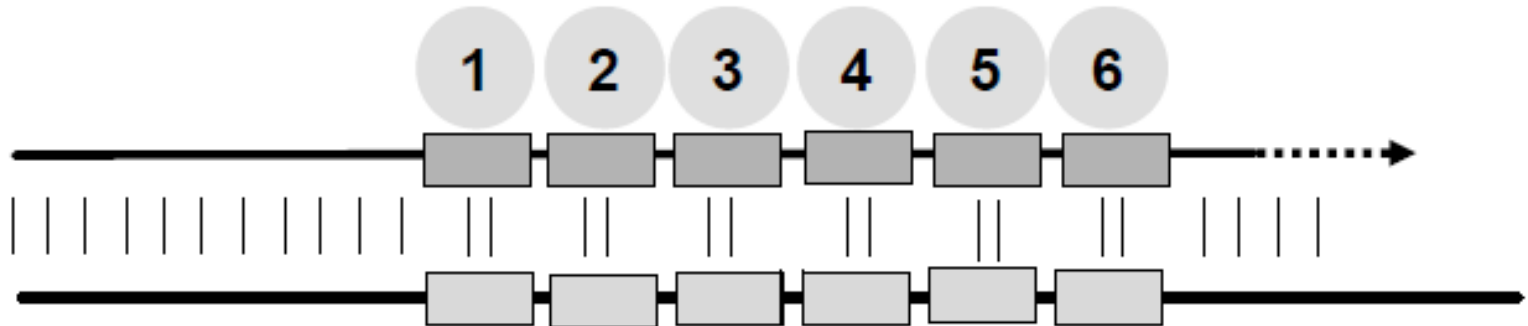


Altas taxas de
mutação

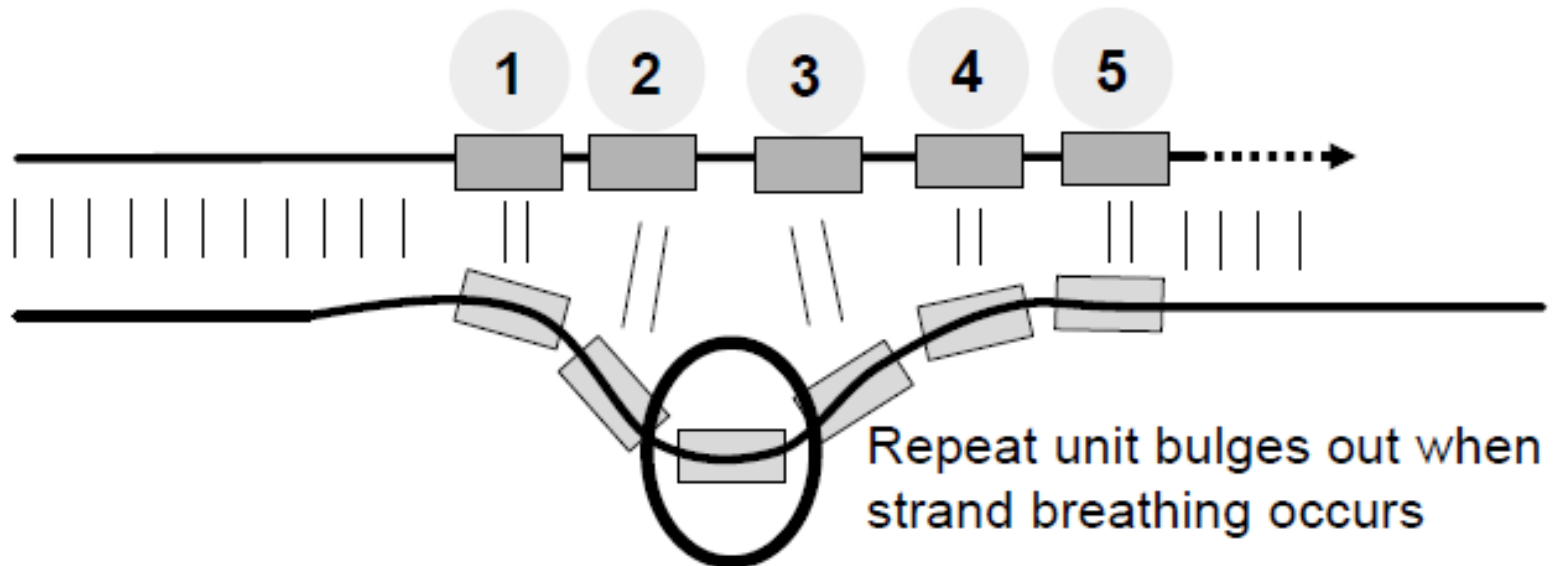
Crossing-over
desigual

Slippage

Normal STR Allele Replication



Slipped Strand Mismatching Model

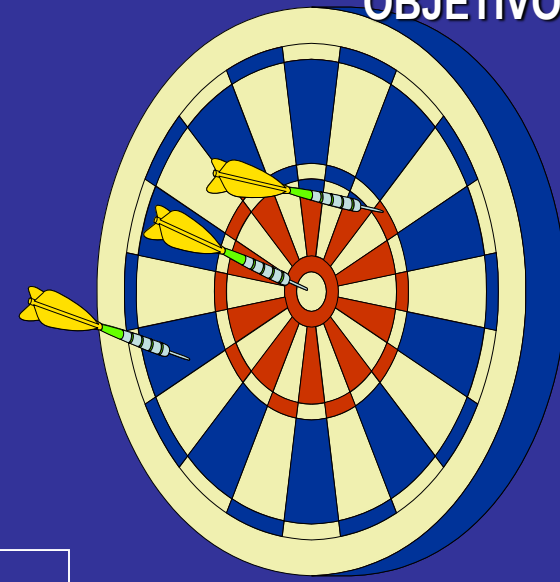


Microssatélites

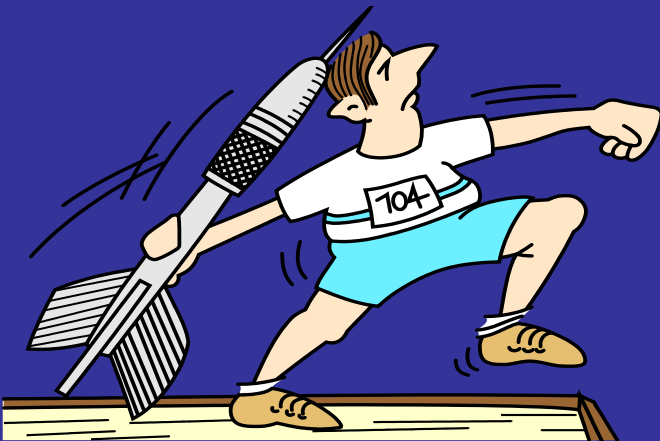
Aplicações

- Mapeamento genômico;
- Estimar e entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais;
- Identificar variedades e avaliar germoplasma;
- Estudar o fluxo gênico entre populações e processos de hibridização natural

a) selecionar e relacionar os locos microssatélites promissores para estimativas de diversidade genética



b) analisar a estrutura dos genótipos

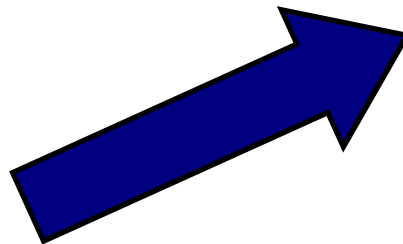


c) determinar a diversidade genética existente entre 22 genótipos de milho doce

Genótipos	
1. Doce do Hawai	16. BR401 - Doce de Ouro
2. BR402 - Doce Cristal	17. RB6324
3. PR030 - Doce Flor da Serra	18. Tropical
4. MG161 - Branco Doce	19. Milho doce bônus F1
5. Doce Cubano	20. Lili
6. Doce UNB1	21. Aruba
7. Tuc Blanco Dulce EEAOC	22. Garden
8. Teea Dulce EEAOC	
9. BR427 III	
10. Doce Opaco	
11. MG162 - Amarelo Doce	
12. Milho Doce 2	
13. Milho Doce 1	
14. CNPH 1	
15. BR400 - Superdoce	

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

→ Procedimentos de Hoisington et al. (1994) - algumas modificações;



QUANTIFICAÇÃO DO DNA

→ Fluorímetro Qubit

→ [] final para a amplificação 10 ng/ μ L



AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Testes com 257 locos de Milho comum



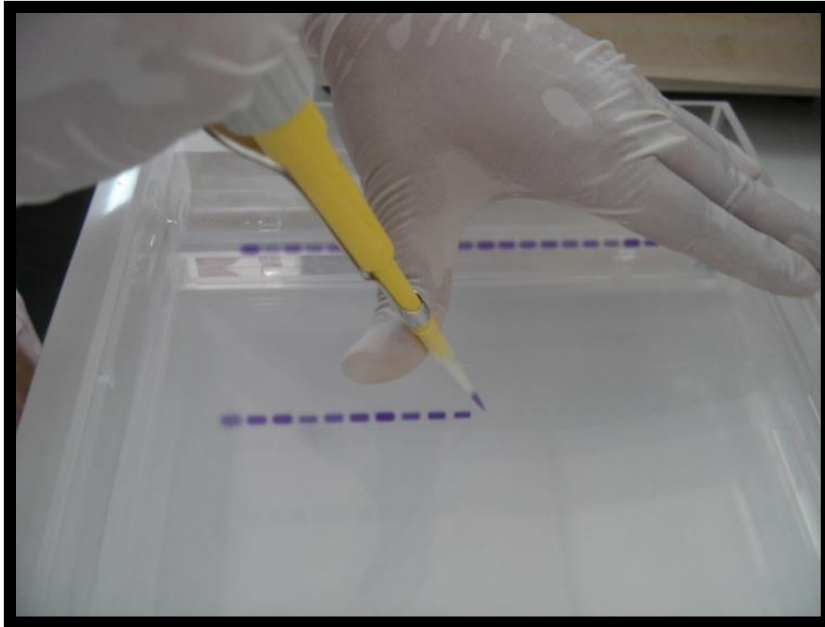
Programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991)



Foram selecionados 30 locos

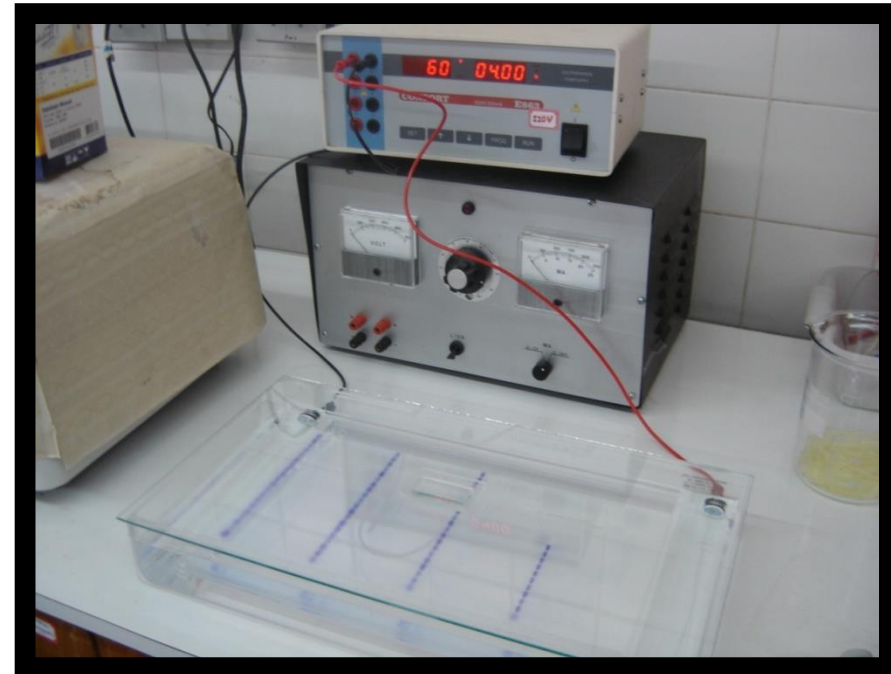


CORRIDA ELETROFORÉTICA

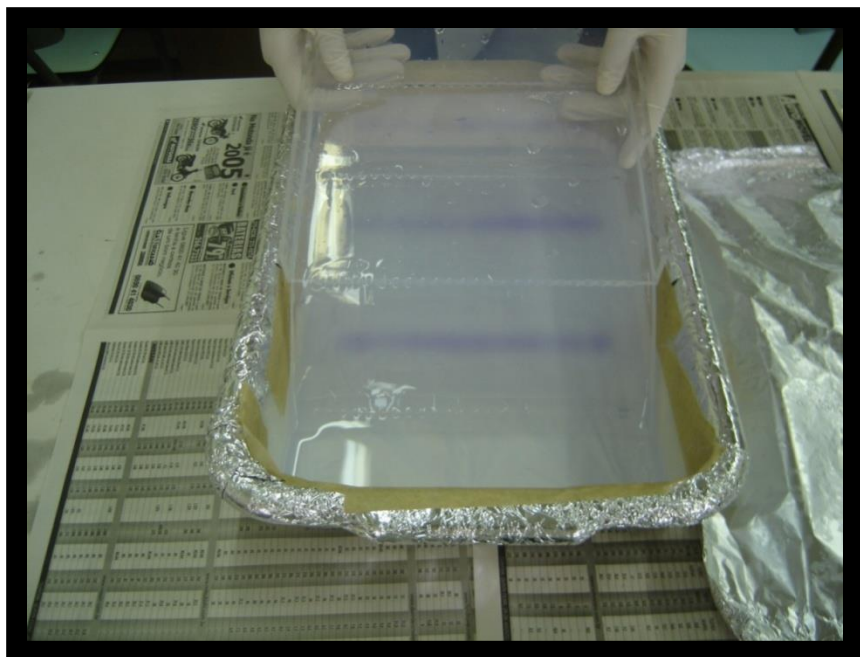


- Separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose 4% (50% agarose normal e 50% agarose MS8), utilizando tampão TBE 0,5X

- Eletroforese a 60V, por aproximadamente 4 horas



- Gel foi corado em solução de Brometo de Etídio ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$);
- A imagem foi capturada com transluminador L-PIX HE, Loccus biotecnologia

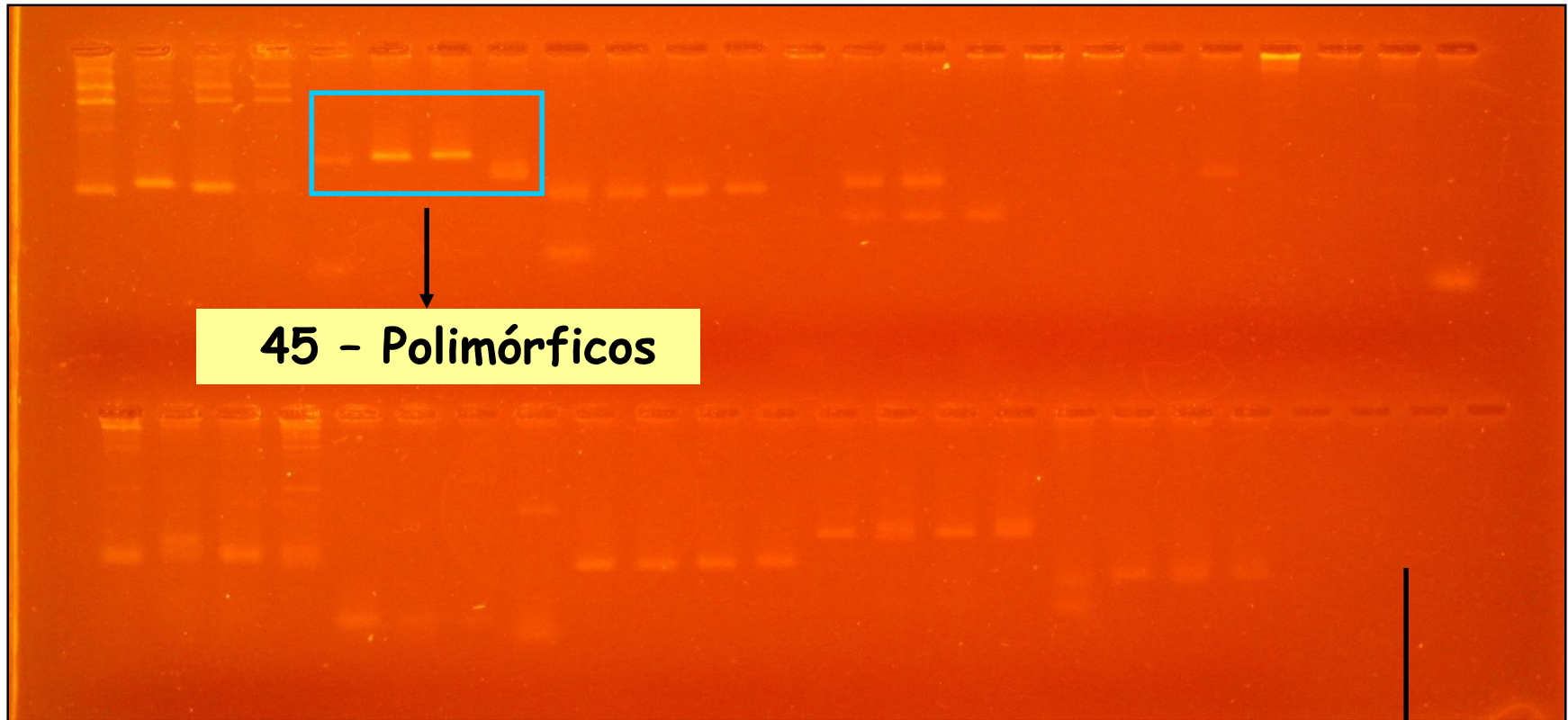


ANÁLISE DE DADOS

- *GenAIEx 6.41*
- *Power Marker versão 3.25*
- *Mega 5.05*
- **STRUCTURE**
- *Arlequin 3.5*



TESTE DE PRIMERS



45 - Polimórficos

97 - Não amplificaram

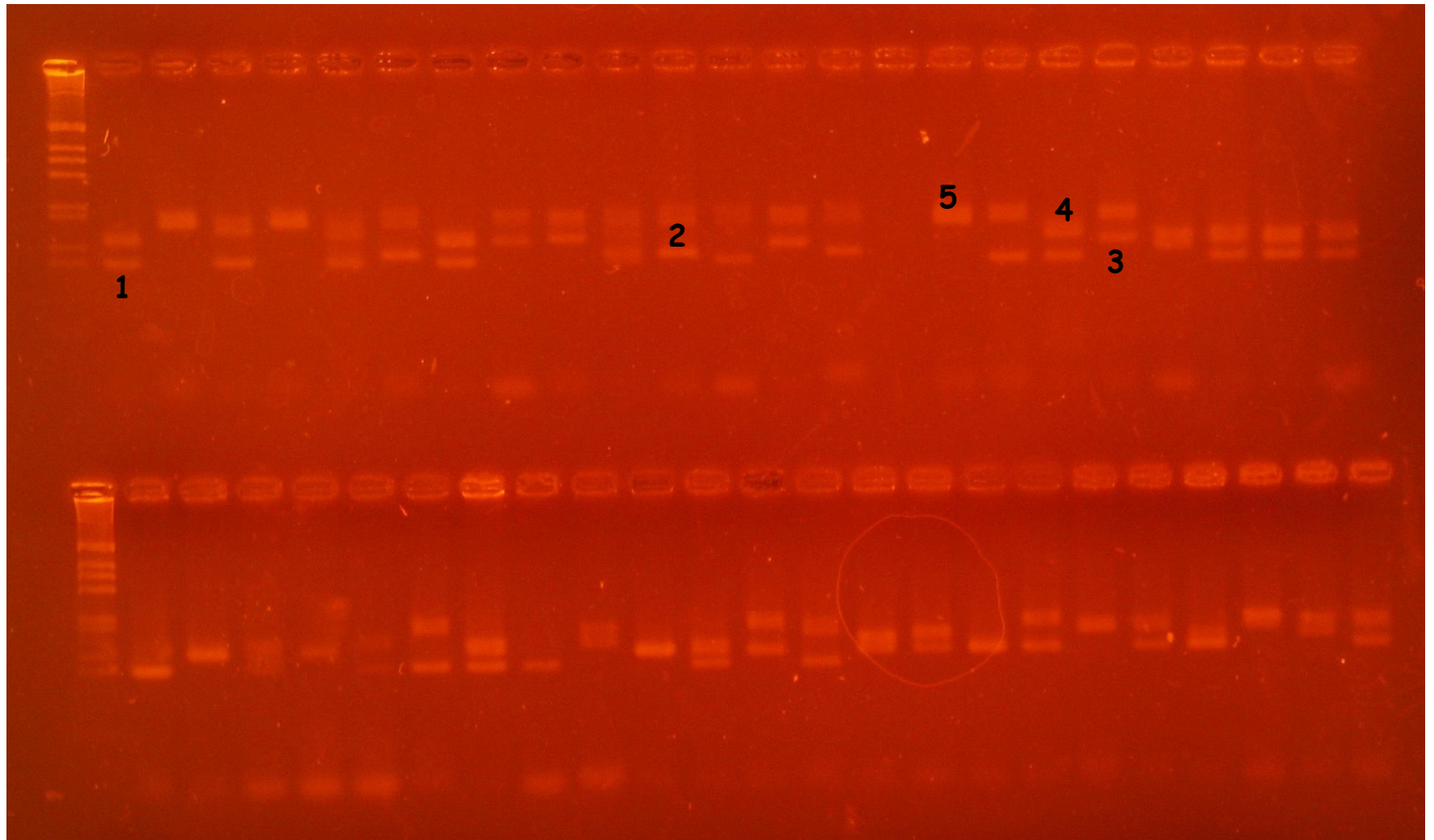
Locos	N. de alelos
Dupssr14	2
Dupssr6	2
Umc1137	3
Umc1524	3
Umc2164	4
Umc2280	4
Umc1075	3
Umc1904	2
Umc1506	3
Umc1415	3
Umc2319	2
Umc2205	5
Umc1066	4
Umc1757	3
Umc2198	2

Locos	N. de alelos
Umc2278	3
Umc1639	3
Bnlgl927	3
Umc1857	4
Bnlgl1063	3
Umc1003	3
Umc1470	3
Umc2294	3
Umc2080	2
Umc1363	3
Umc1636	3
Umc1607	2
Umc1272	2
Umc1913	2
Umc2085	2

Total de alelos: 86

**Número médio
de alelos: 2,87**

UMC2205





FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

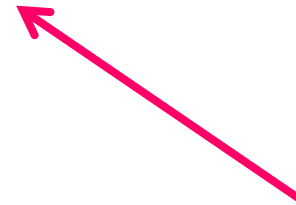
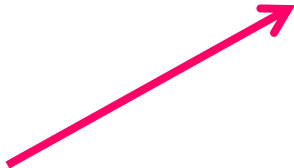
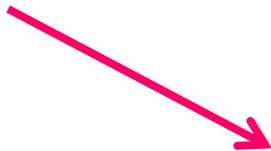
TROPICAL

MILHO DOCE
BÔNUS F_1

FIXAÇÃO DE
ALELOS

LILI

ARUBA





Alelos privativos



Diversidade
de genes
 $H_e > 0,50$

Locos	H_o	H_e
Dupssr14	0,06	0,27
Dupssr6	0,15	0,33
Umc1137	0,23	0,41
Umc1524	0,22	0,26
Umc2164	0,22	0,48
Umc2280	0,29	0,47
Umc1075	0,07	0,37
Umc1904	0,24	0,28
Umc1506	0,32	0,47
Umc1415	0,18	0,17
Umc2319	0,05	0,18
Umc2205	0,49	0,58
Umc1066	0,30	0,41
Umc1757	0,23	0,38
Umc2198	0,11	0,14
Umc2278	0,09	0,35
Umc1639	0,07	0,29
Bnlg1927	0,16	0,39
Umc1857	0,43	0,58
Bnlg1063	0,19	0,35
Umc1003	0,11	0,35
Umc1470	0,05	0,11
Umc2294	0,03	0,29
Umc2080	0,17	0,23
Umc1363	0,30	0,37
Umc1636	0,23	0,33
Umc1607	0,00	0,19
Umc1272	0,01	0,25
Umc1913	0,00	0,23
Umc2085	0,01	0,21
Média	0,16	0,32

$H_e = 0,65$

Rupp et al. (2009)

$H_e = 0,57$

$< H_0$

8 locos em homozigose

Genótipos	H_0
Doce do Hawaii	0,18
Doce Flor da Serra	0,19
BR-402 - Doce Cristal	0,16
MG161 Branco Doce	0,14
Doce UNB-1	0,16
Doce Cubano	0,14
TEEA Dulce EEAO	0,14
Tuc Blanco Dulce EEAO	0,15
BR427 III	0,19
Doce Opaco	0,14
MG162-Amarelo Doce	0,16
Milho Doce 2	0,18
Milho Doce 1	0,19
CNPH-1	0,14
Doce de Ouro	0,17
BR-400 - Superdoce	0,16
Tropical	0,12
RB6324	0,27
Milho doce bônus F1	0,19
Lili	0,15
Superdoce Aruba	0,16
Milho doce Garden	0,16



Genótipos	H_e
Doce do Hawaii	0,36
Doce Flor da Serra	0,35
BR-402 - Doce Cristal	0,40
MG161 Branco Doce	0,35
Doce UNB-1	0,34
Doce Cubano	0,36
TEEA Dulce EEAOC	0,32
Tuc Blanco Dulce EEAOC	0,35
BR427 III	0,31
Doce Opaco	0,33
MG162-Amarelo Doce	0,37
Milho Doce 2	0,36
Milho Doce 1	0,39
CNPH-1	0,31
Doce de Ouro	0,37
BR-400 - Superdoce	0,33
Tropical	0,27
RB6324	0,29
Milho doce bônus F1	0,26
Lili	0,18
Superdoce Aruba	0,25
Milho doce Garden	0,27
Média	0,32*

↑ Heterozigosidade

Promissores para
seleção continuada
de progênes

$$H_o < H_e$$



Genótipos	%P
Doce do Hawaii	96,67
Doce Flor da Serra	90,00
BR-402 - Doce Cristal	93,33
MG161 Branco Doce	90,00
Doce UNB-1	93,33
Doce Cubano	90,00
TEEA Dulce EEAOC	83,33
Tuc Blanco Dulce EEAOC	80,00
BR427 III	83,33
Doce Opaco	83,33
MG162-Amarelo Doce	90,00
Milho Doce 2	80,00
Milho Doce 1	90,00
CNPH-1	80,00
Doce de Ouro	90,00
BR-400 - Superdoce	80,00
Tropical	73,33
RB6324	76,67
Milho doce bônus F1	66,67
Lili	53,33
Superdoce Aruba	63,33
Milho doce Garden	70,00
Média	81,67

Riqueza gênica

**Variação alélica
em 29 dos 30
locos**

**Terra et al.
(2011) 64%**

Locos	PIC	Locos	PIC
Dupssr14	0,37	Umc2278	0,46
Dupssr6	0,37	Umc1639	0,38
Umc1137	0,55	Bnlg1927	0,46
Umc1524	0,30	Umc1857	0,68
Umc2164	0,59	Bnlg1063	0,44
Umc2280	0,59	Umc1003	0,43
Umc1075	0,37	Umc1470	0,22
Umc1904	0,29	Umc2294	0,39
Umc1506	0,54	Umc2080	0,37
Umc1415	0,34	Umc1363	0,39
Umc2319	0,19	Umc1636	0,38
Umc2205	0,71	Umc1607	0,29
Umc1066	0,42	Umc1272	0,38
Umc1757	0,45	Umc1913	0,37
Umc2198	0,32	Umc2085	0,33

Altamente informativos

Moderadamente informativos

Pouco informativos *

↓ Valores de PIC - alta frequência de um ou dois alelos



Umc2329

↑ Valores de PIC - discriminar germoplasma em estudos futuros



Umc2205 e Umc1857*

Locos	F_{IS}	Locos	F_{IS}
Dupssr14	0,780	Umc2278	0,743
Dupssr6	0,551	Umc1639	0,759
Umc1137	0,433	Bnlgl927	0,587
Umc1524	0,148	Umc1857	0,266
Umc2164	0,532	Bnlgl1063	0,452
Umc2280	0,387	Umc1003	0,691
Umc1075	0,798	Umc1470	0,553
Umc1904	0,152	Umc2294	0,881
Umc1506	0,319	Umc2080	0,259
Umc1415	-0,043	Umc1363	0,175
Umc2319	0,707	Umc1636	0,279
Umc2205	0,149	Umc1607	1,000
Umc1066	0,271	Umc1272	0,952
Umc1757	0,384	Umc1913	0,987
Umc2198	0,203	Umc2085	0,949

Excesso de homozigotos

↑ Valores F_{IS}



Tendência de fixação de determinados alelos

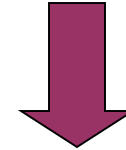


Alvo de seleção direcionada

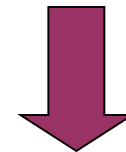
1. O limiar da intensidade da banda pode ter sido muito estrito para permitir a detecção de alelos fracos
2. Locos heterozigotos carregando um alelo nulo foram considerados como homozigotos
3. Resolução insuficiente impedindo pequenas diferenças no tamanho do alelo desde a detecção
4. Locos com números menores de alelos ou com distribuição de frequência distorcida
5. Acasalamentos positivos entre indivíduos
6. Seleção favorecendo homozigotos

Locos	F_{IT}	Locos	F_{IT}
Duppsr14	0,877	Umc2278	0,833
Dupssr6	0,696	Umc1639	0,856
Umc1137	0,630	Bnlg1927	0,695
Umc1524	0,382	Umc1857	0,414
Umc2164	0,655	Bnlg1063	0,662
Umc2280	0,551	Umc1003	0,792
Umc1075	0,839	Umc1470	0,867
Umc1904	0,317	Umc2294	0,937
Umc1506	0,472	Umc2080	0,653
Umc1415	0,562	Umc1363	0,439
Umc2319	0,749	Umc1636	0,529
Umc2205	0,341	Umc1607	1,000
Umc1066	0,412	Umc1272	0,977
Umc1757	0,575	Umc1913	0,995
Umc2198	0,704	Umc2085	0,980

Média: 0,680



**Endogamia global
determinada por
cruzamentos não
causais**



**Resultado de
eventos de
autopolinização
em processos
de seleção**

Locos	Fst	Locos	Fst
Duppsr14	0,443	Umc2278	0,352
Dupssr6	0,323	Umc1639	0,406
Umc1137	0,346	Bnlg1927	0,262
Umc1524	0,274	Umc1857	0,202
Umc2164	0,262	Bnlg1063	0,383
Umc2280	0,268	Umc1003	0,327
Umc1075	0,203	Umc1470	0,702*
Umc1904	0,195	Umc2294	0,471
Umc1506	0,224	Umc2080	0,531
Umc1415	0,580	Umc1363	0,321
Umc2319	0,143	Umc1636	0,347
Umc2205	0,225	Umc1607	0,611
Umc1066	0,193	Umc1272	0,531
Umc1757	0,310	Umc1913	0,610
Umc2198	0,629	Umc2085	0,599

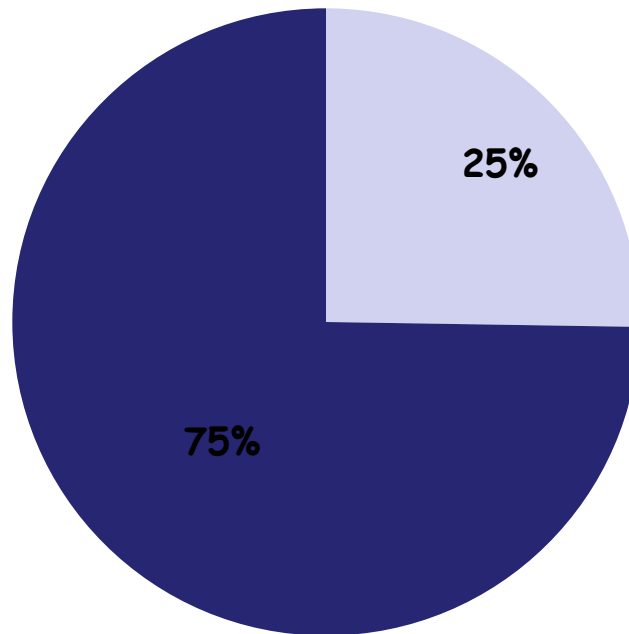
Média: 0,376

**Responsáveis pelos
níveis de variabilidade
genética estimada**

**Eventos casuais de
recombinações
genéticas ou somáticas**

**Estruturação
populacional**

AMOVA



* Bered et al. (2005) - milho doce = 88%

* Terra et al. (2011) - milho doce, milho comum e teosinte = 64,5%

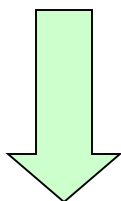
Sistema de reprodução da planta, área de distribuição. Espécies polinizadas pelo vento (milho) tendem a ter uma alta variabilidade dentro da população e baixa entre

Quando se analisa locos microssatélites deve-se considerar o fato destes marcadores revelarem, por uma característica intrínseca dos mesmos, alta heterozigosidade dentro das populações, o que acaba produzindo baixa diferenciação entre elas



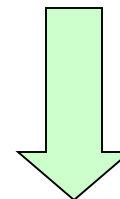
MATRIZ DE SIMILARIDADE (NEI, 1972)

Doce do Hawai
CNPH-1



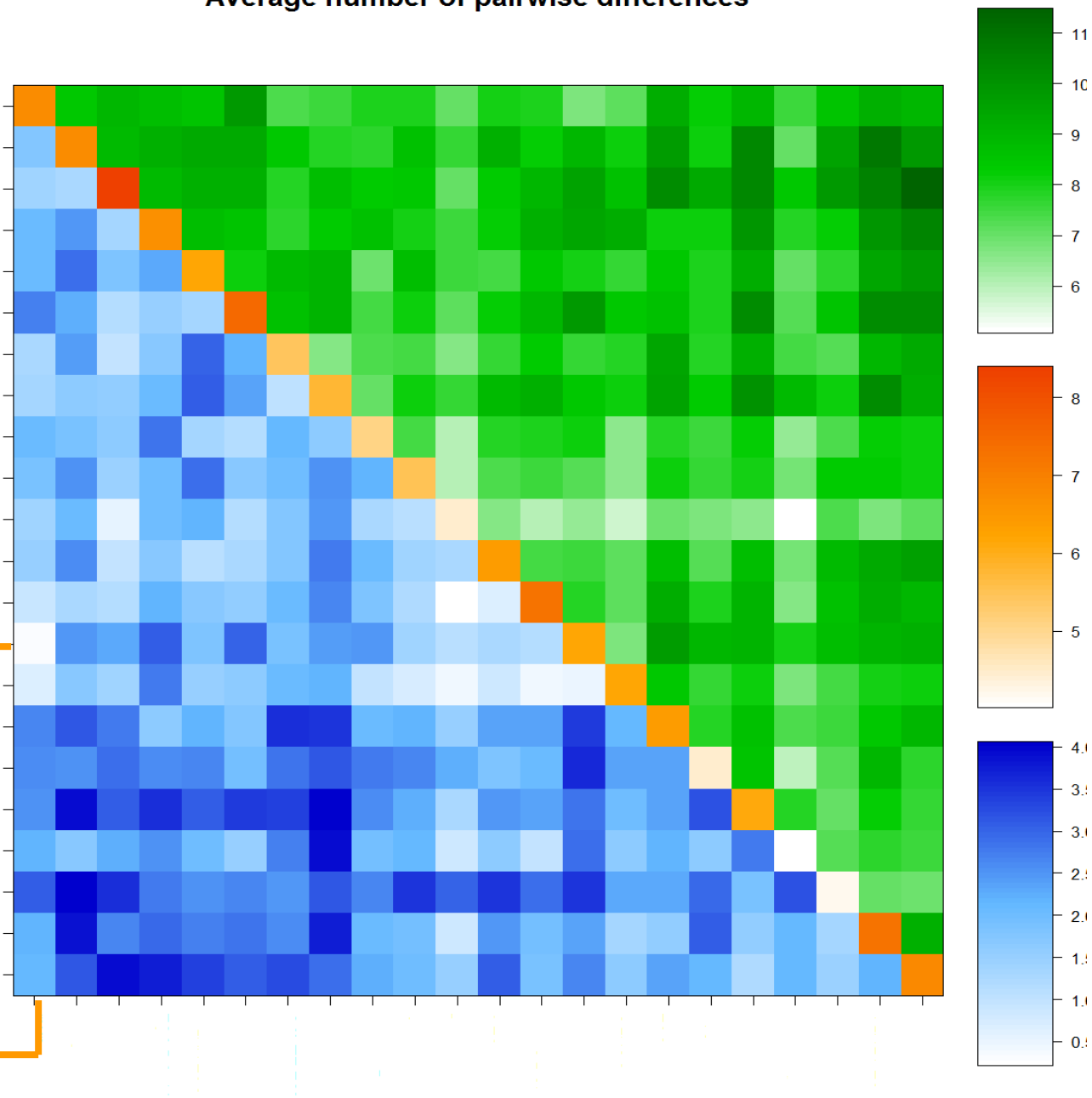
Mais similares= 0,103

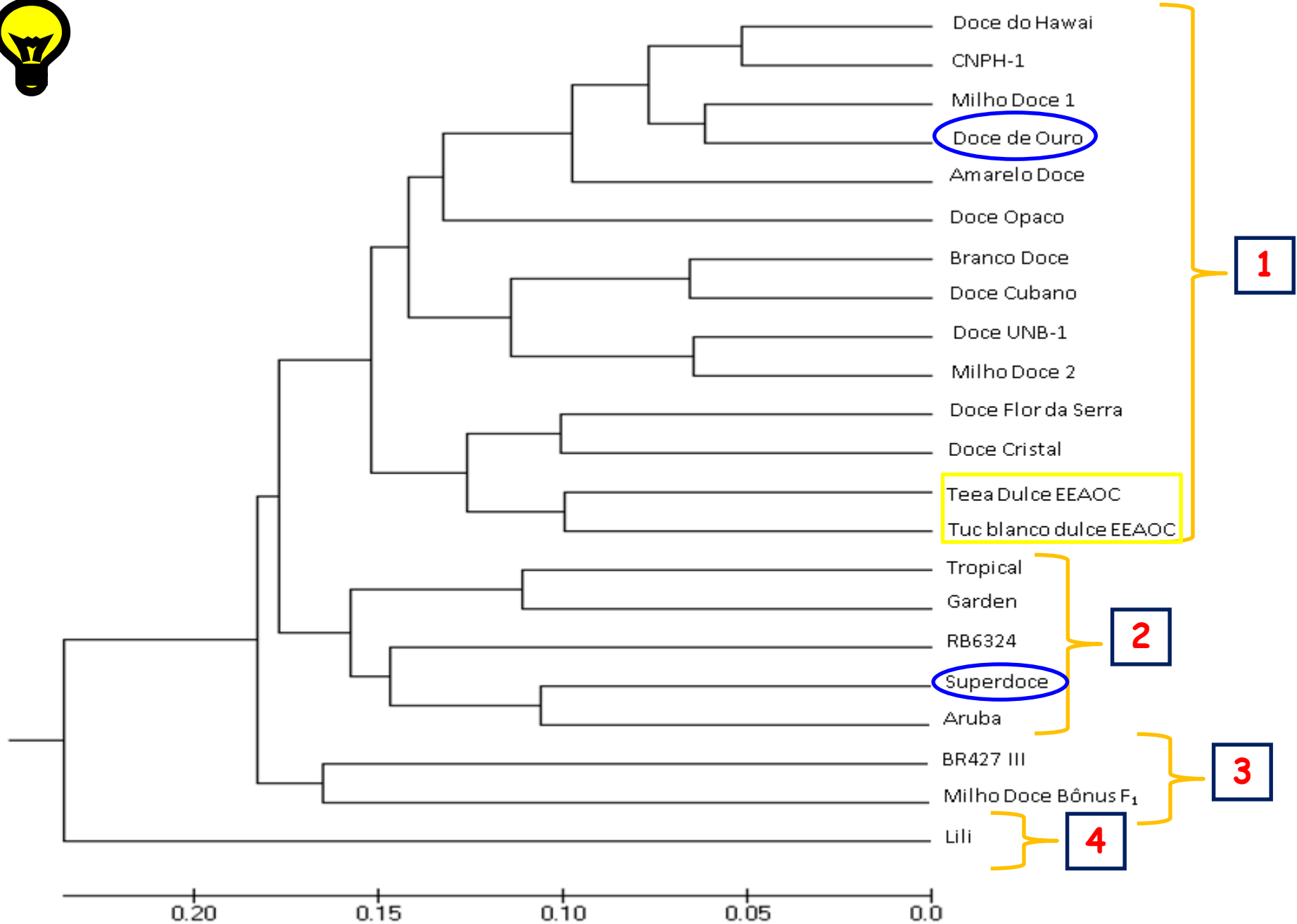
Amarelo doce
Lili



Mais divergentes= 0,645

Average number of pairwise differences





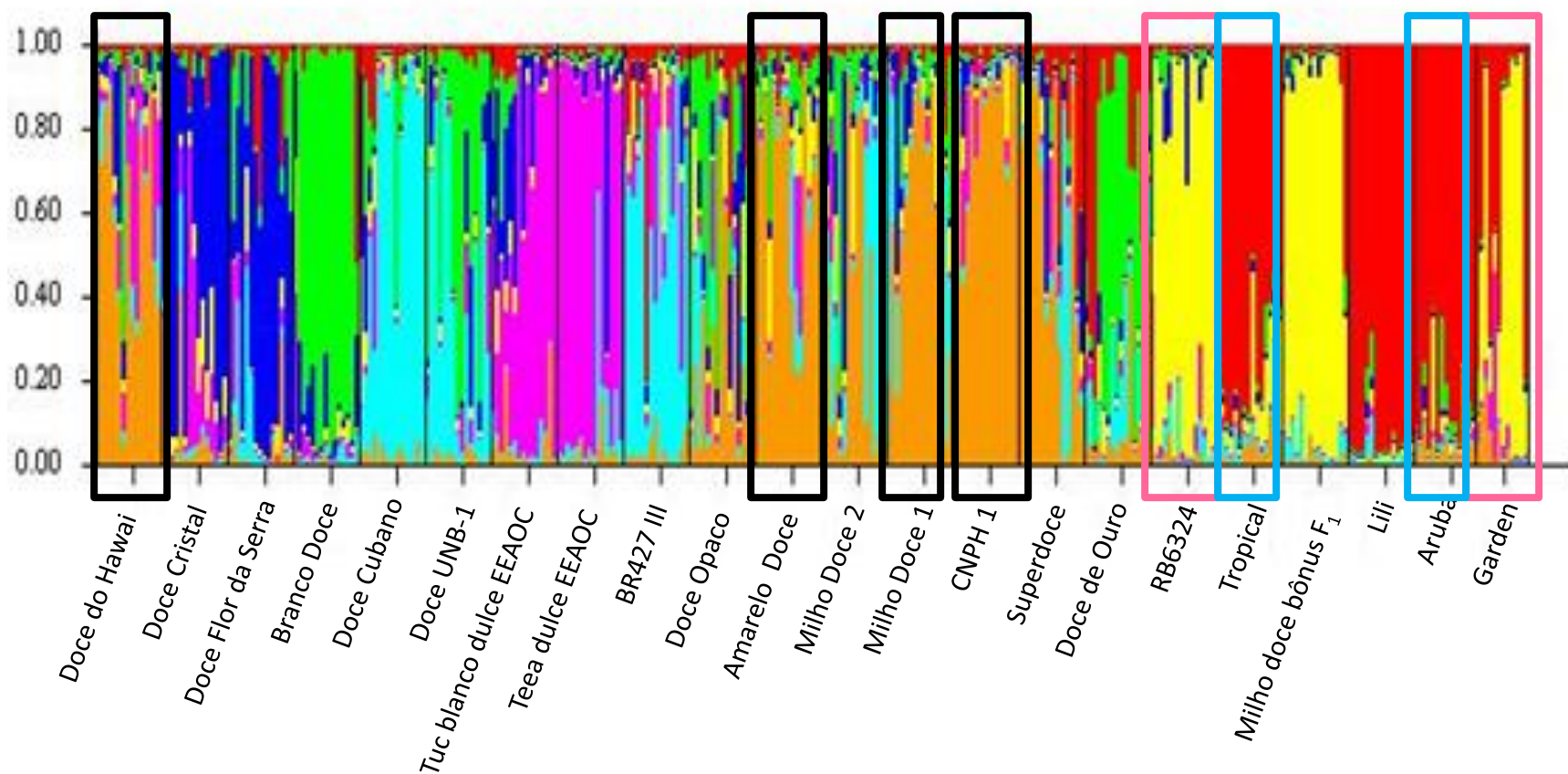


STRUCTURE

K	Delta K
2	-
3	4,962451
4	0,328354
5	0,323224
6	0,542609
7	6,229519
8	-

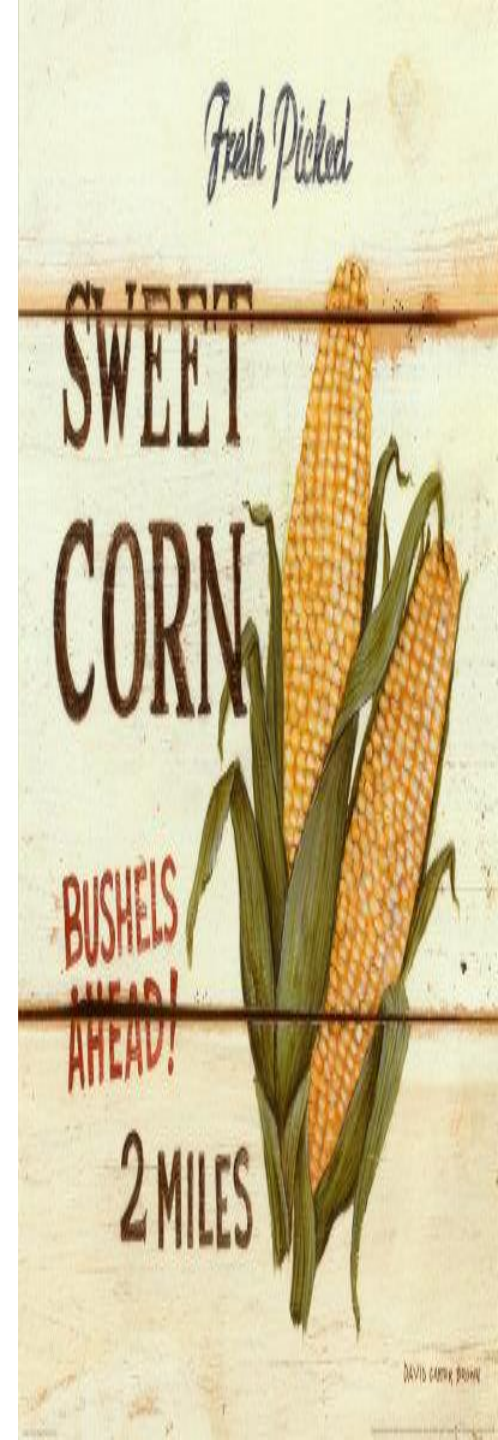


STRUCTURE



CONCLUSÕES

- * A análise dos marcadores microssatélites revelou que esses são efetivos para detectar a diversidade genética no milho doce
- * Os locos Umc2205, Umc1066 e Umc1857 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, podendo, portanto, serem apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismo em genótipos de milho doce
- * A maior diferenciação genética foi detectada no loco Umc1470, sendo este o mais adequado para ser usado na diferenciação dos 22 genótipos no que refere a frequência diferencial dos alelo



* O genótipo Doce Cristal apresentou heterozigosidade alta, e pode ser considerado promissor para seleção continuada de progênies

* Os 22 genótipos de milho doce analisados são diferenciados para os 30 locos microssatélites analisados, formando populações geneticamente estruturadas

* 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

OBRIGADA!



REFERÊNCIAS

- 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.
- PATTO, M.C.V. et al. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, 137:63-72, 2004.
- MORALES, M.; DECKER, V.; ORNELLA, L. Analysis of genetic diversity in Argentinian heterotic maize populations using molecular markers. **Ciencia e investigación agraria**, 37(1):151-160, 2010.
- LIU, K.J.; GOODMAN, M.; MUSE, S.; SMITH, J.S.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, 165:2117-2128, 2003.
- SOUZA, S.G.H.; CARPENTIERI-PIPOLO V.; RUAS, C. DE F.; CARVALHO, V. DE. P.; RUAS, P. M; GERAGE, A. C. Comparative Analysis of Genetic Diversity Among the Maize Inbred Lines (*Zea mays* L.) Obtained by RAPD and SSR Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 51:183-192, 2008.
- 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.