

GENOTIPAGEM DE VARIEDADES DE MILHO CRIOULO

LARISSA NEY BASSINI¹; LILIAN MOREIRA BARROS², CAMILA PEGORARO³,
LUCIANO CARLOS DA MAIA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – larissanbassini@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lilianmbarros@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – pegorarocamilanp@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – lucianoc.maia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o primeiro grão a ultrapassar um bilhão de toneladas produzidas por ano no mundo. Desde a Revolução Verde, o milho passou a ser associado ao uso de variedades híbridas homogêneas, fornecidas por empresas de sementes e cultivado como monocultura com uso intensivo de insumos. Por outro lado, as variedades crioulas (*landraces*) são muito importantes nos países em desenvolvimento devido à maior adaptação em ambientes marginais (FENZI; COUIX 2021), além de ser fonte de calorias e de renda em determinadas regiões.

A substituição de variedades crioulas por variedades híbridas ocasiona erosão genética, ou seja, perda de variabilidade genética (GUZZON et al. 2021). Variedades crioulas são fontes de genes e alelos para os programas de melhoramento desenvolverem genótipos superiores, capazes de lidar com estresses bióticos e abióticos, intensificados pelas mudanças climáticas.

A caracterização da variabilidade genética nas populações crioulas (conservadas nos bancos de germoplasma ou mantidas pelos agricultores) é fundamental para o melhoramento genético. Informações de variabilidade genética a partir de marcadores moleculares e morfológicos permitem a seleção de genitores, elucidar a base genética que controla caracteres de importância agrônoma e gerenciar técnicas de conservação de germoplasma.

Polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), são causados por mutações pontuais que dão origem a diferentes alelos com bases alternativas em uma determinada posição do genoma. Muitas técnicas de sequenciamento e ferramentas de bioinformática são aplicadas para identificação de SNPs (JIN et al. 2016). SNPs são marcadores moleculares amplamente utilizados para avaliação da variabilidade genética e para estudos de mapeamento genético de caracteres de interesse agrônomo.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo caracterizar a variabilidade genética dentro de duas populações de milho crioulo utilizadas no Rio Grande do Sul. Para isso, marcadores SNPs foram utilizados para genotipagem.

2. METODOLOGIA

Foram genotipadas 49 plantas provenientes de duas variedades de milho crioulo, Caiano Rajado e Cateto Amarelo, cultivadas no Rio Grande do Sul. A extração de DNA de folhas de cada planta foi feita de acordo com o protocolo descrito por DOYLE; DOYLE (1987). Após verificar a quantidade do DNA no equipamento Qubit e a qualidade no equipamento Nanovue e eletroforese em gel de agarose, as amostras foram enviadas para a empresa EcoMol Consultoria para genotipagem por sequenciamento (GBS).

Para genotipagem foi construída uma biblioteca através da digestão do DNA e ligação de sequências adaptadoras. A qualidade da biblioteca foi avaliada usando o equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 (kit High Sensitivity DNA). A quantificação da biblioteca foi feita por meio de uma PCR em tempo real com o KAPA Biosystems Quantification Kit (KAPA). O sequenciamento da biblioteca foi feito na plataforma HiSeq 2500 (Illumina), com leitura única de 100pb.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o protocolo “Tassel GBSv2 SNP calling pipeline” (<https://www.maizegenetics.net/tassel>). Foi utilizado o programa Trimmomatic para limpeza das sequências. Posteriormente, foram utilizadas as etapas GBSSeqToTagDBPlugin, TagExportToFastqPlugin. Em seguida foi feito o alinhamento dos *reads* contra o genoma de referência do milho (obtido no site panzea) utilizando o programa BWA, seguidos dos scripts SAMToGBSdbPlugin e finalmente DiscoverySNPCallerPluginV2. Todas estas etapas foram executadas usando o sistema Linux.

Após obter o arquivo padrão vcf contendo os SNPs, as próximas etapas foram feitas utilizando a versão Desktop do software Tassel. Neste software foram feitas as etapas de limpeza dos dados de baixa qualidade e exclusão daqueles locos pouco informativos.

Os resultados obtidos foram apresentados em tabelas. Para visualizar a dispersão dos genótipos, os dados foram submetidos à análise de componentes principais. Essa análise foi conduzida no programa R (R CORE TEAM 2020).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o tratamento inicial foram detectados 2464 locos SNPs para os 49 genótipos (Tabela 1). Deste total, 950 SNPs (38,55%) foram não polimórficos entre os genótipos, por isso foram eliminados da análise. Os SNPs restantes (1514 – 61,44%) foram submetidos a uma segunda análise para filtrar e excluir aqueles locos inadequados. Para isso foram considerados os SNPs que apresentam leitura em $\geq 95\%$ dos genótipos, isto é, cada loco pode ter dados perdidos em no máximo 5% dos genótipos avaliados.

Tabela 1. Total de locos SNPs após tratamento inicial dos dados brutos da genotipagem por sequenciamento.

Cromossomo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Locos	351	303	168	192	360	373	182	129	116	290	2464

Depois de fazer a limpeza dos dados, 343 SNPs foram mantidos para análise final (Tabela 2). Os cromossomos 3 e 9 tiveram as menores quantidades de SNPs enquanto os cromossomos 5, 10 e 6 os maiores números de SNPs. Em um estudo desenvolvido por MCLEAN-RODRÍGUEZ et al. (2021), com variedades crioulas de milho, foi demonstrada a presença de SNPs em todos os cromossomos, com densidade variável de acordo com o cromossomo, similar ao observado neste estudo.

Tabela 2. Total de locos (SNPs) após limpeza dos dados.

Cromossomo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Locos	31	38	13	25	46	68	43	10	12	57	343

Visando estimar a variabilidade genética, os dados foram submetidos à análise de componentes principais. Foi possível verificar a dispersão dos genótipos, o que indica a presença de variabilidade genética dentro das variedades estudadas (Figura 1). Esse resultado pode ser explicado pelo fato que o milho é uma espécie alógama, ou seja, variedades crioulas fazem polinização cruzada, resultando em indivíduos heterozigotos, com elevada variabilidade genética (ARCA et al 2020).

Também é possível observar que, de maneira geral, plantas da mesma variedade são mais parecidas entre si (Figura 1). Esse comportamento demonstra que as variedades apresentam características próprias. As variedades crioulas de milho são cultivadas de forma ampla e independente em todas regiões do Brasil, com relevante importância socioeconômica para o sistema de agricultura familiar. Como resultado, diferentes variedades são desenvolvidas e selecionadas para diferentes ambientes e com características morfológicas específicas (CARVALHO et al. 2004), o que pode explicar a diferença observada entre as variedades estudadas.

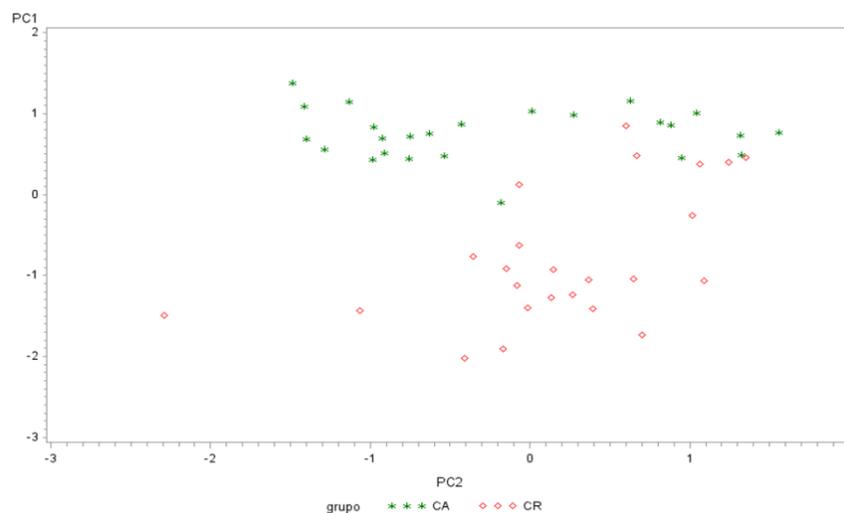


Figura 1. Análise de componentes principais com base nos SNPs polimórficos entre plantas das variedades de milho crioulo. CA – Cateto Amarelo; CR – Caiano Rajado.

A variabilidade genética presente nas populações crioulas é uma fonte sustentável de alelos. Esse *pool* gênico é útil para o desafio futuro que pode ser imposto por estresses abióticos, causados pelas mudanças climáticas (SOLIMAN et al. 2021). O milho apresenta ampla variabilidade genética, entretanto, menos de 5% dessa variabilidade é explorada nos programas de melhoramento. As variedades crioulas tem uso limitado pois são pouco caracterizadas, geneticamente heterogêneas com baixo desempenho agrônômico (ARCA et al 2020). Por isso, estudos de caracterização da variabilidade genética são muito importantes.

4. CONCLUSÕES

A presença de locos SNPs polimórficos entre as plantas genotipadas, assim como a dispersão dos genótipos na análise de componentes principais,

indicam a ocorrência de variabilidade genética entre as variedades e entre as plantas da mesma variedade. Essa variabilidade genética pode ser utilizada para o desenvolvimento de variedades superiores. Os marcadores identificados neste estudo serão utilizados para o mapeamento genético de características de importância agrônômica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCA, M.; MARY-HUARD, T.; GOUESNARD, B.; BÉRARD, A.; BAULAND, C.; COMBES, V.; MADUR, D.; CHARCOSSET, A.; NICOLAS, S.D. Deciphering the Genetic Diversity of Landraces With High-Throughput SNP Genotyping of DNA Bulks: Methodology and Application to the Maize 50k Array. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, n. 568699. 2021.

CARVALHO, V.P.; RUAS, C.F.; FERREIRA, J.M.; MOREIRA, R.M.P.; RUAS, P.M. Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPDMarkers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27(2), p. 228-236. 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Gaithersburg, v.12, p.13-15, 1987.

FENZI, M., COUIX, N. Growing maize landraces in industrialized countries: from the search for seeds to the emergence of new practices and values. **International Journal of Agricultural Sustainability**. 2021

GUZZON, F., ARANDIA RIOS, L.W., CAVIEDES CEPEDA, G.M., CÉSPEDES POLO, M., CHAVEZ CABRERA, A., MURIEL FIGUEROA, J., MEDINA HOYOS, A.E., JARA CALVO, T.W., MOLNAR, T.L., NARRO LEÓN, L.A., NARRO LEÓN, T.P., MEJÍA KERGUELÉN, S.L., OSPINA ROJAS, J.G., VÁZQUEZ, G., PRECIADO-ORTIZ, R.E., ZAMBRANO, J.L., PALACIOS ROJAS, N., PIXLEY, K.V. Conservation and Use of Latin American Maize Diversity: Pillar of Nutrition Security and Cultural Heritage of Humanity. **Agronomy**, v. 11, n. 1, 172, 2021

JIN, Y., LIU, S., YUAN, Z., YANG, Y., TAN, S., LIU, Z. Catfish genomic studies: progress and perspectives. In: MacKenzie, S., Jentoft, S. **Genomics in Aquaculture**. Editora Academic Press. 2016. 4, 73-104.

MCLEAN-RODRÍGUEZ, F.D., COSTICH, D.E., CAMACHO-VILLA, T.C., PÈ M.E., DELL'ACQUA, M. Genetic diversity and selection signatures in maize landraces compared across 50 years of in situ and ex situ conservation. **Heredity**, v. 126, p. 913–928, 2021.

R CORE TEAM 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

SOLIMAN, E.; EL-SHAZLY, H.H.; BÖRNER, A.; BADR, A. Genetic diversity of a global collection of maize genetic resources in relation to their subspecies assignments, geographic origin, and drought tolerance. **Breeding Science**. v. 71(3), p. 313–325. 2021.