



MARCADORES MOLECULARES ISSR APLICADOS À ESTIMAÇÃO DA DIVERSIDADE ENTRE ACESSOS DE MILHO CRIOULO PROSPECTADOS NO SEMIÁRIDO MINEIRO

ANA CAROLINA ATAIDE SILVEIRA, LUAN SOUZA DE PAULA GOMES,
JEFFERSON JOE MOREIRA ALVES, MATHEUS HENRIQUE TEIXEIRA,
DEMERSON ARRUDA SANGLARD

RESUMO

Introdução: A marca histórica da mesorregião Norte de Minas Gerais corresponde ao fenômeno das irregularidades pluviométricas, que, periodicamente, dificulta o sustento de agricultores familiares e comunidades tradicionais. No contexto de um agroecossistema funcional, ambientes marginais possuem uma lógica própria no estabelecimento de espécies e, que, não se repete em um centro de pesquisa propriamente. A diversidade existente em milho (*Zea mays* L.) deve-se, principalmente, às variedades crioulas, genótipos importantes para o melhoramento, pois são reservatórios de genes que conferem vantagens adaptativas em áreas marginais. **Objetivo:** Considerando o processo de erosão genética instaurado na agricultura de regiões semiáridas (áreas marginais), o presente trabalho teve como objetivos realizar diagnósticos locais visando o resgate e caracterização de acessos crioulos de milho, além da divulgação de práticas agrícolas alinhadas a princípios sustentáveis. **Material e Métodos:** A sequência metodológica referiu-se a três estratégias fundamentais: (i) Diagnósticos locais participativos; (ii) Resgate e quantificação da diversidade genética de milho e; (iii) Capacitação. As expedições de prospecção de acessos envolveram 07 (sete) municípios do Norte de Minas Gerais (Almenara, Capitão Enéas, Janaúba, Montes Claros, Rio Pardo de Minas, São João do Paraíso e Taiobeiras). Os materiais prospectados tiveram seus DNA's extraídos e amplificados via PCR com oligonucleotídeos ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) (Laboratório de Biotecnologia UFMG, Campus Regional Montes Claros). **Resultados:** A partir dos dados moleculares, foram estimadas as distâncias genéticas (dissimilaridades) por meio do programa computacional GENES. Os DNA's de 44 acessos de milhos crioulos resgatados foram extraídos e amplificados com 34 *primers* ISSR. Estes produziram 32 bandas monomórficas e 213 bandas polimórficas, totalizando 245 bandas amplificadas de boa qualidade. **Conclusão:** Foram identificadas 09 (nove) combinações com divergências superiores a 20%, às quais, juntamente com os demais acessos resgatados, nortearão populações-base segregantes para intentos de melhoramento genético participativo.

Palavras-chave: Áreas Marginais, Diversidade Genética, Melhoramento Participativo Milho Crioulo, Resgate.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, 90% dos produtores de milho são pequenos agricultores (DUTRA *et al.*, 2021), cujas lavouras, em geral, têm baixa produtividade de grãos e silagem. As razões da baixa produtividade dos pequenos agricultores são diversas, como o alto custo dos insumos, baixo preço dos produtos agrícolas, dificuldade de acesso ao crédito rural e à tecnologia, e alta frequência de estresses bióticos e abióticos (MACHADO; MACHADO, 2007). Soma-se a estes problemas a falta de variedades adaptadas aos diferentes tipos de estresse para ambientes locais e específicos.

De acordo com Machado (2007), o conhecimento dos agricultores sobre as variedades locais e espécies silvestres pode ser utilizado na busca por novas características e produtos de interesse para o melhoramento de plantas e biotecnologias. Uma das estratégias definidas com base no Plano de Ação Global para Segurança Alimentar da FAO, refere-se ao uso e à preservação da diversidade genética de plantas, dentro de comunidades agrícolas (FAO, 2012). O trabalho conjunto entre o setor formal e o setor informal (representado pelas comunidades rurais), no manejo da agrobiodiversidade, pode contribuir na conservação de germoplasmas adaptados aos agroecossistemas das comunidades agrícolas (BOEF; THIJSEN, 2007). Assim, as abordagens participativas tornam-se de cruciais importâncias para o desenvolvimento de trabalhos com pequenos agricultores, evitando-se a erosão genética.

A mesorregião Norte de Minas Gerais, predominantemente semiárida, abrange uma população superior a dois milhões de habitantes, distribuídos em 140 municípios, o que equivale a 10,46% da área brasileira com este clima (IBGE, 2010). A agricultura familiar nestas localizações também está vulnerável a todas as questões supracitadas, tendo ainda, como condição agravante, o uso de sementes inapropriadas aos seus agroecossistemas específicos. Isso significa que eles não possuem equivalência ambiental às estações experimentais de empresas, onde as sementes são efetuadas para os procedimentos de melhoramento genético. Neste sentido, uma estratégia para gerar a independência do pequeno agricultor com relação às sementes comerciais, é fazer com que ele mesmo ou suas comunidades as produzam de forma contextualizada e holística (abrangente), adaptadas para as realidades de suas próprias localidades (CGIAR, 1999). Este trabalho teve como objetivo a recuperação das escassas variedades locais de milho, fidedignamente reconhecidas como "crioulas".

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas expedições em comunidades rurais de seis municípios do Norte de Minas Gerais: Almenara ('Associação de Pequenos Produtores Rurais da Agricultura Familiar de Almenara'); Capitão Enéas ('Associação Comunitária Rural de Poção'); Janaúba ('Associação Comunitária Evangelho Unido em Cristo'); Rio Pardo de Minas ('Associação de Mulheres de Olhos D'água Unidas pela Amizade'); São João do Paraíso ('Associação das Trabalhadoras Rurais do Paraguai'); Taiobeiras ('Associação da Comunidade de Atanásio'). Adotaram-se as estratégias holísticas propostas por Machado e Machado (2007), levando-se em consideração as agrobiodiversidades locais. As expedições foram relevantes para alcançar relatos de paradeiros, costumes, experiências, observações empíricas e posteriores repasses de sementes, muitas vezes de agricultores que não pertencentes às associações propriamente.

Amostras de tecidos foliares de cada variedade foram armazenadas em ultrafreezer (-75°C). As análises moleculares envolveram extrações de DNA por método baseado em Doyle e Doyle (1990) visando amplificações via PCR (Polymerase Chain Reaction).

Foram utilizados oligonucleotídeos (primers) ISSR (Inter Simple Sequences Repeats), de escolhas randomizadas, oriundos da coleção UCB (University of British Columbia, Canada) (Termociclador Biocycler Gradient). As reações foram programadas em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (46°C a 59°C / 1 min) e extensão (72°C/2 minutos)]; e uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. Logo após essas ciclagens, o aparelho conservou as reações a 4°C, até a retirada das amostras. Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese horizontal com géis de agarose 1,5% (m/v), imersos em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). No momento da aplicação, foram adicionados, à cada amostra, 3 µL do corante tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5 µL de GelRed™ (Sambrook *et al.*, 1989). Os géis foram submetidos a uma carga de 120 V, por 3 h. Findadas as eletroforeses, os géis foram analisados por meio de um sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX Sti). Os padrões de bandeamentos foram convertidos em matrizes de dados binários, considerando-se a presença (1) e a ausência (0) de bandas aferidas nos géis. O coeficiente para o cálculo de similaridade genética foi o de coincidências simples. As análises foram executadas com o auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2006). Todos os procedimentos de manutenção de populações segregantes e análises moleculares foram realizados nas dependências do Laboratório de Biotecnologia, localizado no Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias - CPCA, *Campus* Regional Montes Claros da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Os plantios para multiplicações de sementes ocorreram em telados anexos ao CPCA e área a campo integrante da Fazenda Experimental Professor Hamilton de Abreu Navarro (FEHAN), no próprio *campus* Montes Claros da UFMG.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por sementes focou em materiais fidedignamente considerados como tradicionais (crioulos), os quais estão exemplificados na Figura 1. Porém, muitas vezes, os relatos e colaborações resultavam em sementes comerciais que já haviam sido produzidas por técnicas de melhoramento convencional, ou seja, genótipos advindos de empresas públicas ou privadas. Foram caracterizadas todas as 44 variedades de milho crioulo resgatadas nos âmbito deste projeto, envolvendo os 34 oligonucleotídeos ISSR identificados como polimórficos. As análises de distâncias genéticas foram realizadas a partir das amplificações das 44 variedades de milhos crioulos resgatadas, divididas em dois grupos de 22 acessos por circunstância da potencial vantagem fenotípica ("nível de tolerância a veranicos" e "produção na ausência de insumos"). Os 34 oligonucleotídeos ISSR utilizados produziram 32 bandas monomórficas e 213 bandas polimórficas, totalizando 245 bandas amplificadas, o que está exemplificado na Figura 2.

A quantidade de bandas variou de 15 [(GA) 8C] a 3 [(GA) 8YT], com média de 7,2 por oligonucleotídeo. Do total de bandas amplificadas, 86,94% revelaram polimorfismo, sugerindo uma elevada variabilidade genética entre as 44 variedades de milhos crioulos resgatadas, em relação aos dados geralmente encontrados no melhoramento convencional (CARVALHO *et al.*, 2002; DANDOLINI *et al.*, 2008; MUNHOZ *et al.*, 2009). Os oligonucleotídeos em que prevalece a seqüência de bases GA amplificaram o maior número de fragmentos polimórficos (dados não apresentados).

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se as matrizes de distâncias genéticas relativas em porcentagem. A partir dos dados, identificou-se as variedades mais divergentes entre si (menos similares). A diferenciação genética observada neste trabalho é bastante superior à maioria dos estudos de diversidade, sejam eles envolvendo animais, plantas e

microorganismos; executados com a mesma coleção de oligonucleotídeos da University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) (SOUZA *et al.*, 2008; GEORGE *et al.*, 2009; ANAND *et al.*, 2010; RIZKALLA, *et al.*, 2012; GHAZALLI *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*; 2015).



Figura 1 - Exemplos de aspectos de sementes de variedades de milhos crioulos resgatadas (nomenclatura informada na coleta) e caracterizadas quanto à diversidade genética. Fonte: Do autor.

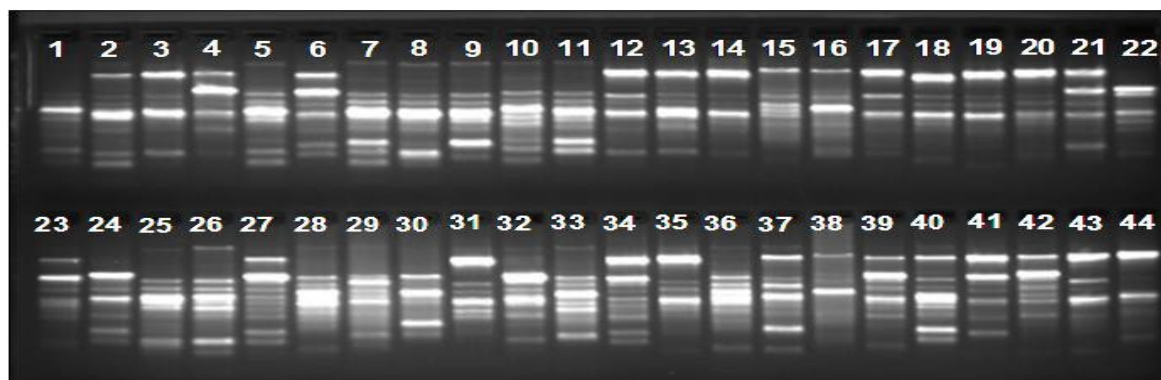


Figura 2 - Amplificações via PCR dos genomas de 44 variedades crioulas de milho, obtidas deste trabalho. As seqüências ordinais (colunas) estão afeitas aos genótipos associados aos produtos das amostras que continham 25 uL de mix-PCR (Oligonucleotídeo ISSR 855 - temperatura de anelamento em 57°C), 5 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), durante 3 h. Fonte: Do autor.

Tabela 1 - Matriz de distâncias genéticas relativas (frequência) entre 22 variedades de milho crioulas (tolerância a veranicos).

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	1,00																					
2	0,93	1,00																				
3	0,91	0,89	1,00																			
4	0,92	0,79*	0,88	1,00																		
5	0,90	0,88	0,89	0,92	1,00																	
6	0,93	0,91	0,87	0,84	0,91	1,00																
7	0,92	0,87	0,90	0,93	0,92	0,76*	1,00															
8	0,82	0,91	0,94	0,89	0,82	0,95	0,87	1,00														
9	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,88	0,83	0,88	1,00													
10	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,93	0,95	0,89	0,93	1,00												
11	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,86	0,98	0,94	0,95	0,92	1,00											
12	0,89	0,90	0,87	0,90	0,89	0,88	0,93	0,90	0,90	0,94	0,94	1,00										
13	0,75*	0,94	0,90	0,94	0,87	0,89	0,92	0,94	0,94	0,91	0,93	0,92	1,00									
14	0,88	0,92	0,94	0,92	0,90	0,77*	0,83	0,92	0,90	0,89	0,92	0,94	0,90	1,00								
15	0,87	0,84	0,92	0,88	0,94	0,90	0,91	0,96	0,84	0,87	0,90	0,86	0,94	0,90	1,00							
16	0,89	0,90	0,91	0,85	0,92	0,94	0,88	0,89	0,96	0,84	0,94	0,93	0,91	0,94	0,91	1,00						
17	0,89	0,84	0,88	0,94	0,88	0,92	0,90	0,87	0,87	0,86	0,90	0,83	0,90	0,94	0,87	1,00						
18	0,83	0,92	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,86	1,00					
19	0,95	0,90	0,87	0,70*	0,97	0,90	0,88	0,92	0,85	0,88	0,94	0,86	0,90	0,94	0,87	0,89	0,82	0,87	1,00			
20	0,92	0,93	0,90	0,90	0,94	0,90	0,83	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,96	0,94	0,88	0,94	0,87	0,94	0,91	1,00		
21	0,92	0,83	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,93	0,89	0,92	0,94	0,90	0,93	0,92	0,86	0,92	1,00	
22	0,85	0,90	0,94	0,87	0,89	0,94	0,87	0,89	0,87	0,89	0,93	0,85	0,90	0,89	0,92	0,94	0,83	0,96	0,86	0,90	0,89	1,00

*Combinações de variedades mais divergentes entre si (menos similares).

Tabela 4 - Matriz de distâncias genéticas relativas (frequência) entre 22 variedades de milho crioulas (produção na ausência de insumos).

Nº	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
23	1,00																					
24	0,92	1,00																				
25	0,91	0,85	1,00																			
26	0,90	0,94	0,86	1,00																		
27	0,94	0,92	0,90	0,77*	1,00																	
28	0,92	0,88	0,94	0,90	0,82	1,00																
29	0,91	0,85	0,92	0,94	0,92	0,86	1,00															
30	0,88	0,94	0,78*	0,92	0,82	0,95	0,87	1,00														
31	0,95	0,88	0,87	0,89	0,91	0,88	0,83	0,88	1,00													
32	0,91	0,89	0,90	0,77*	0,89	0,93	0,95	0,89	0,93	1,00												
33	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,86	0,98	0,94	0,95	0,87	1,00											
34	0,95	0,88	0,87	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,90	0,94	0,84	1,00										
35	0,91	0,89	0,90	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,86	0,98	0,94	1,00										
36	0,88	0,87	0,94	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,88	0,89	0,90	0,95	1,00									
37	0,87	0,84	0,92	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,89	0,87	0,94	0,91	0,89	1,00								
38	0,89	0,90	0,91	0,91	0,89	0,88	0,89	0,89	0,87	0,90	0,92	0,88	0,87	0,94	1,00							
39	0,89	0,84	0,88	0,94	0,72*	0,92	0,88	0,94	0,90	0,94	0,96	0,95	0,88	0,94	0,87	0,85	1,00					
40	0,83	0,92	0,89	0,90	0,94	0,87	0,85	0,92	0,94	0,92	0,89	0,96	0,94	0,87	0,89	0,94	1,00					
41	0,95	0,90	0,87	0,85	0,97	0,90	0,94	0,88	0,92	0,91	0,87	0,87	0,90	0,95	0,88	0,92	0,86	0,93	1,00			
42	0,92	0,93	0,90	0,90	0,94	0,90	0,87	0,84	0,86	0,88	0,94	0,95	0,96	0,91	0,89	0,88	0,89	0,91	1,00			
43	0,92	0,83	0,89	0,90	0,94	0,87	0,89	0,90	0,94	0,89	0,89	0,93	0,89	0,88	0,87	0,89	0,87	0,84	0,86	0,92	1,00	
44	0,85	0,90	0,94	0,87	0,95	0,88	0,92	0,86	0,91	0,95	0,88	0,92	0,86	0,89	0,92	0,94	0,83	0,96	0,86	0,90	0,90	1,00

*Combinações de variedades mais divergentes entre si (menos similares).



De acordo com Reif *et al.* (2005) e Cruz *et al.* (2011), o estudo da diversidade visa a elucidar relações genéticas, quantificar ou predizer o nível de variabilidade total existente e a sua distribuição entre e/ou dentro de unidades taxonômicas, quer elas envolvam indivíduos; acessos de banco de germoplasma; linhagens; cultivares; populações de sistemas controlados de acasalamento ou naturais (exogâmicas); e espécies. Os autores ainda acrescentam que este conhecimento tem proporcionado importantes contribuições ao melhoramento genético, ao gerenciamento de bancos de germoplasma, à conservação de recursos genéticos e ao entendimento dos processos evolutivos.

Este trabalho envolvendo diagnósticos locais, ainda que morosos e pouco céleres, permitiram recuperar preciosos genótipos de milhos crioulos, fontes de variabilidade para tolerância a estresses causados por pragas, doenças e limitações de clima, todos estes contextualizados ao semiárido. O propósito maior é de que essas sementes possam ser distribuídas e estimuladas quanto a testes comunitários, o que favorecerá o intercâmbio de sementes e surgimento de novas combinações, perspectivas de imensa relevância para a sustentabilidade dos diferentes perfis ambientais.

4 CONCLUSÃO

A coleção prospectada e caracterizada neste trabalho possui enormes potenciais para compor populações-base de programas de melhoramento genético, sejam eles participativos ou convencionais, sendo que os últimos geralmente padecem por bases genéticas estreitas. Ao analisar os padrões de bandejamento eletroforético ISSR, identificou-se nove combinações entre acessos, com dissimilaridades genéticas superiores a 20%.

FINANCIAMENTO

Esse trabalho foi fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, relativo ao projeto "Melhoramento Participativo de Milho com Enfoque na Agrobiodiversidade do Semiárido Mineiro". (FAPEMIG APQ-03554-14), Edital 07/2014 - Apoio a Projetos de Extensão em Interface com a Pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANAND, K. K.; SRIVASTAVA, R. K.; CHAUDHARY, L. B.; SINGH, A. K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabacea) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. *Taiwania*, v. 55, p. 197-207, 2010.

CRUZ, C. D. **Programa GENES - versão Windows**. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2006, 285 p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética**. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2011, 620 p.

CGIAR. **Systemwide Program on Participatory Research and Gender Analysis for Technology Development and Institutional Innovation (PRGA Program)**. Annual Report. Cali, Colombia, 1999. 36p.

DE BOEF, W. S.; THIJSEN, M. H. Ferramentas participativas no trabalho com cultivos, variedades e sementes. **Um guia para profissionais que trabalham com abordagens participativas no manejo da agrobiodiversidade, no melhoramento de cultivos e no desenvolvimento do setor de sementes**. Wageningen UR Centre for Development



Innovation, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUTRA, I. J. B.; MARTINS, M. C.; PARRÉ, J. L. A produção da agricultura familiar e os efeitos dos programas de incentivo. **Revista de Política Agrícola**, v. 30, p. 94, 2021.

EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Acompanhamento da Agricultura no Semiárido Mineiro** (2019). Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/>>. Acessado em abril de 2022.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **International Technical Conference on Plant Genetic Resources** (2012). Disponível em: <http://www.fao.org/index_en.htm> Acessado em abril de 2022.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 2022-2030, 2009.

GHAZALLI, M. N.; YUNUS, M. F.; MOHAMMAD, A. L. Assessment of genetic relationships within *Bouea* (Anacardiaceae) accessions in Peninsular Malaysia using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 76-85, 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Senso Demográfico 2010**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg.html>>. Acessado em abril de 2022.

MACHADO, A. T.; MACHADO, C. T. T. Melhoramento participativo de cultivos no Brasil. In: BOEF, W. S.; THIJSSSEN, M. H.; OGLIARI, J. B.; STHAPIT, B. R. (eds). **Biodiversidade e Agricultores: fortalecendo o manejo comunitário**. Porto Alegre: L&PM, p. 93-102, 2007.

REIF, J. C.; HALLAUER, A. R.; MELCHINGER A. E. Heterosis and heterotic patterns in maize. **Maydica**, v. 50, p. 215-223, 2005.

RIZKALLA, A. A.; ATTIA, S. A. A.; EL-HADY, E. A. A. A.; HANNA, N. S.; NASSEEF, J. E. Genetic diversity based on ISSR and protein markers associated with earliness trait in wheat. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 23-33, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. E. F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbour Labs. New York**. 1989, 815 p.

MACHADO, A. T. Manejo dos recursos genéticos vegetais em comunidades agrícolas: enfoque sobre segurança alimentar e agrobiodiversidade. In: NASS, L. L. (ed). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 717-744, 2007.



SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 843-849, 2008.

VIEIRA, F. A.; SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; FAJARDO, C. G.; MOLINA, W. F. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, p. 525-531, 2015.