

Microssatélites Fluorescentes na Diferenciação de Linhagens de Milho

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

Padilha L., Guimarães C.T., Vieira, M.G.G.C., Souza I.R.P., Parentoni S.N., Pacheco C.A.P., Santos M.X., Gama E.E.G. e Paiva E.

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

Palavras-chave: *Fingerprinting*, microssatélites, linhagens, milho

1. Introdução

Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares (LPC), para uma nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ser submetida à proteção, ela deve passar pelos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE), cujos descritores sejam conhecidos, homogêneos quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estáveis quanto à repetição das mesmas características ao longo de gerações sucessivas (Brasil, 1997). A distinção de genótipos é oficialmente realizada por meio de características morfológicas que apresentam como desvantagens a necessidade de um grande número de descritores que são identificados na planta inteira ou adulta. Além do tempo gasto e da necessidade de espaço físico para a avaliação do material, os marcadores morfológicos são influenciados pelo ambiente, podendo gerar resultados pouco confiáveis. A possibilidade de acessar a variabilidade genética diretamente ao nível de DNA, vem fazendo com que, cada vez mais, sejam disponibilizadas técnicas precisas que podem vir a auxiliar o processo proteção intelectual de materiais genéticos. Dentre as técnicas moleculares, os marcadores microssatélites podem ser destacados pela precisão, simplicidade e possibilidade de automação.

Os microssatélites são seqüências curtas com um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA, as quais são flanqueadas por seqüências conservadas (Rafalski et al., 1996). Para o milho, um grande número de seqüências de pares de *primers* SSR encontram-se publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>), estando bem caracterizados e mapeados ao longo de todo o genoma. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998) e apresentando-se estável ao longo de várias gerações (Russel et al. 1997). Variações no número de repetições dos microssatélites resultam nos diferentes números de alelos, que podem ser amplificados por reações de PCR e resolvidos em géis de poli-acrilamida ou de agarose (Echt e May-Marquardt, 1997; Schneider e Douches, 1997).

Tecnologias que permitam alta resolução genética associada à elevada capacidade no processamento dos dados a custos efetivos encontrarão pronta aplicação para conservação de fontes genéticas e caracterização de cultivares. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de otimizar a técnica de SSR semi-automatizada e de aplicar os resultados na diferenciação e caracterização de linhagens elite de milho da

2. Material e Métodos

As análises moleculares de 35 linhagens elites foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada. O DNA foi extraído de dez plântulas com 20 dias após a semeadura, representando cada linhagem, segundo a metodologia descrita por Saghai-Marroof et al. (1984).

As reações de amplificação foram realizadas isoladamente para cada um dos 25 *primers* SSRs marcados com as fluorescências 6-FAM, HEX e NED, em um volume final de 10 µL contendo 30 ng de DNA, 1,0 µL do tampão PCR 10X, 125 µM de cada um dos dNTPs, 0,2 µM de cada um dos *primers* e 1 U da enzima Taq polimerase. Foram utilizadas duas condições para temperaturas de anelamento dos *primers* (Tabela 1): *i*) realizado por 30 ciclos de 67°C por 20 s ou *ii*) 68°C por 20 s com redução de 1°C por ciclo durante 9 ciclos, seguidos por 25 ciclos a 60°C por 20 s. O padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems) foi acrescentado aos produtos finais da reação de PCR diluídos, sendo posteriormente desnaturados a 95°C por 3 minutos e os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 5%, sob eletroforese a 2000 v durante 3 horas no seqüenciador ABI Prism 377.

Os polimorfismos foram avaliados com auxílio dos programas Genescan 2.1 e Genotyper 2.0, para a identificação dos alelos amplificados. A partir dos dados tabulados foi possível calcular a frequência (p_i) de cada alelo (i) para cada um dos locos, sendo a ausência da banda, identificada por 0 e a sua presença, por 1. As frequências alélicas foram utilizadas para avaliar a informatividade do loco marcador (Weir, 1996), calculando-se o índice de diversidade genética ou PIC (*Polymorphic Information Content*), probabilidade de identidade e poder de exclusão, segundo as fórmulas:

$$PIC = 1 - \sum (p_i)^2$$

Probabilidade de Identidade (I) =

Probabilidade de Exclusão (Q) =

, onde $a_k =$, p_i e p_j são as frequências do i -ésimo e j -ésimo alelo para as 35 linhagens.

A probabilidade de identidade combinada foi obtida pela multiplicação dos valores de I encontrados para cada loco e a probabilidade de exclusão combinada (Q_c) para l locos, foi calculada da seguinte forma: $Q_c =$

3. Resultados e Discussão

Os alelos amplificados pelos 25 locos SSR apresentaram tamanho entre 72 e 424 pares de base, sendo que apenas dois *primers* tiveram alelos maiores que 300 pares de base (Tabela 1). A sobreposição da faixa de amplificação dos alelos, limitou a combinação dos *primers* em reações *multiplex*, reduzindo a capacidade de análise de vários locos simultaneamente em cada gel. Para os 25 locos avaliados entre as 35 linhagens, foram obtidos 293 alelos, variando de três a 25 alelos amplificados por loco, sendo que seis locos apresentaram alelos nulos.

O índice de diversidade para cada loco medido pelo PIC variou de 0,28 a 0,93 com média igual a 0,76 (Tabela 1). Esses valores foram superiores aos obtidos por Smith et al. (1997) que utilizaram 131 *primers* marcados com fluorescência em 58 linhagens e 4 híbridos de milho e encontraram valor médio de PIC igual a 0,62. No presente trabalho, a grande diversidade das linhagens envolvendo diferentes pedigrees, tipos de endosperma e características de qualidade protéica das sementes pode também ter

contribuído para os altos valores do PIC. Além disso, 75% dos alelos apresentaram frequência inferior a 0,10, sendo que 46% de todos os alelos tiveram frequência igual a 0,03 (Figura 1). A elevada proporção de alelos raros na população contribuiu para elevar os valores de PIC dos locos, embora tenha sido detectada uma ampla faixa de frequências alélicas entre os alelos.

O elevado nível de polimorfismo dos marcadores SSR permitiu a completa diferenciação das linhagens envolvidas nesse estudo com a utilização de apenas dois *primers* (dup24 e bnlg1006), com uma probabilidade de identidade (I) combinada na ordem de 10^{-6} . Isso significa que, para a população envolvida nesse estudo, existe uma probabilidade inferior a 1 em 10^{-6} de serem encontrados dois indivíduos com os genótipos idênticos utilizando esses dois locos. De maneira complementar, a probabilidade combinada de exclusão (Q) dos dois locos considerados foi de 0,94, indicando 94% de probabilidade desses locos em detectar a não existência de uma relação de parentesco entre os 35 genótipos estudados. O elevado poder discriminatório dos SSRs foi também detectado por Senior et al. (1998) ao diferenciar 94 linhagens de milho com apenas cinco locos SSR e por Russell et al. (1997), onde quatro locos SSR foram suficientes para diferenciar 24 cultivares elites de cevada com uma probabilidade de identidade de 10^{-2} .

Considerando-se os valores de PIC, I, Q, a amplitude alélica e as marcações dos *primers*, definiu-se uma combinação de seis locos SSR passíveis de serem avaliados em um único gel: umc1016, bnlg2241, bnlg1006, bnlg125, dup24, phi053. A combinação desses *primers* apresentou valor de PIC igual a 0,86, com um poder de exclusão combinado de 0,9973 e uma probabilidade de identidade combinada de 10^{-14} para a diferenciação das 35 linhagens de milho. Assim, existe uma probabilidade de 10^{-14} de se ter um mesmo genótipo em cada dois indivíduos dentro a população de linhagens considerada. Em *Eucalyptus*, Kirst (1999) definiu dois conjuntos com três locos SSR, com uma probabilidade de identidade de 10^{-6} e um poder de exclusão de 0,99.

A semi-automatização dos marcadores microssatélites propiciou a obtenção de informações precisas, de maneira rápida e confiável, apresentando-se útil para a caracterização e diferenciação de materiais genéticos de milho. A combinação de um sistema com seis locos em única linha do gel garantiu um elevado poder de discriminação entre as 35 linhagens elites de milho avaliadas, sugerindo um grande potencial para processos de proteção de cultivares, além de estudos relacionados com a diversidade genética entre os materiais do programa de melhoramento.

4. Literatura Citada

- BRASIL. **Lei n. 9.456**, 25 abr. 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1997. p.15-30.
- ECHT, C.S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, Ottawa, v.40, n.1, p. 9-17. 1997.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3.ed. Brasília, DF: Embrapa-CENARGEM, 1998. 220 p.
- Rafalski, d.J.A.; vogel, j.m.; morgante, m.; powell, w.; andre, c.; tingey, s.v. Generating and using DNA markers in plants. **In**: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York, 1996. p. 75-134.
- RUSSELL, J.; Fuller, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, Ottawa, v.40, n.4, p. 442-450. 1997.

- Saghai-Marouf, 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.
- SCHNEIDER, K.; DOUCHES, D.S. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprinting North American potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v.74, n.3, p.149-160.1997.
- 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.
- Smith, J.S.C.; Chin, E.C.L; Shu, H.; Smith, O.S.; Wall, S.J.; Senior, M.L.; Mitchel, S.E.; Kresovich, S.; Ziegler, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p.163-17. 1997.
- Weir, B.S. **Genetic data analysis II**. 2.ed. rev. and exp. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

Tabela 1. Características dos 25 locos SSR avaliados entre as 35 linhagens de milho, incluindo: diversidade genética (PIC), probabilidade de identidade (I) e probabilidade de exclusão (Q)

Primer	Bin	Marcação	Amplitude Alélica	Temperatura de Anelamento	Nº de alelos	PIC	I	Q
bnlg1006	5.00	HEX	168-255	67 ^b	23	0,9184	0,0019	0,7600
bnlg1045*	2.07	6-FAM	114-193	68 ^a	15	0,8882	0,0037	0,6302
bnlg105	5.02	NED	72-104	68 ^a	13	0,7518	0,0247	0,3405
bnlg1208	5.03	6-FAM	97-120	67 ^b	9	0,6294	0,1184	0,2440
bnlg125	2.02	HEX	312-424	68 ^a	25	0,9110	0,0023	0,6926
bnlg161	6.00	HEX	122-183	68 ^a	12	0,8212	0,0147	0,4760
bnlg1724	9.00	NED	97-143	68 ^a	7	0,4759	0,1973	0,1047
bnlg1811	1.04	HEX	171-262	68 ^a	15	0,8816	0,0055	0,6111
bnlg182	1.03	6-FAM	86-400	68 ^a	16	0,8400	0,0116	0,5263
bnlg1863*	8.04	HEX	117-192	68 ^a	17	0,8857	0,0046	0,6178
bnlg2241	3.06	6-FAM	192-242	68 ^a	9	0,8180	0,0221	0,4610
bnlg589	4.11	6-FAM	151-252	67 ^b	12	0,7306	0,0381	0,3297
bnlg594*	10.06	NED	171-265	68 ^a	12	0,7780	0,0326	0,4219
dup24	2.08	NED	103-168	68 ^a	19	0,9314	0,0016	0,7550
nmc041	1.08	HEX	158-189	68 ^a	12	0,7665	0,0237	0,3832
phi026	4.05	NED	78-135	68 ^a	16	0,8498	0,0092	0,5304
phi028	9.01	HEX	72-78	67 ^b	3	0,6008	0,2096	0,1605
phi041*	10.00	HEX	197-205	67 ^b	5	0,7102	0,0520	0,2949
phi053	3.05	NED	176-194	67 ^b	7	0,7061	0,0407	0,2816
phi063*	10.02	NED	156-216	67 ^b	5	0,7241	0,0330	0,3088
phi116	7.06	6-FAM	151-173	67 ^b	7	0,6645	0,1246	0,2081
umc1016	7.02	6-FAM	92-161	68 ^a	19	0,8767	0,0058	0,6112
umc1366*	9.06	6-FAM	100-122	67 ^b	3	0,5853	0,1709	0,1223
umc1653	6.07	HEX	93-221	67 ^b	10	0,7959	0,0267	0,4211
umc2025	1.05	6-FAM	123-138	67 ^b	4	0,4392	0,4694	0,0995
Valores médios					12	0,7592	0,0655	0,4157

* locos com alelos nulos

a Anelamento a 68°C com redução de 1°C por ciclo durante 9 ciclos e 25 ciclos a 60°C

b Anelamento a 67°C por 20 segundo durante 30 ciclos

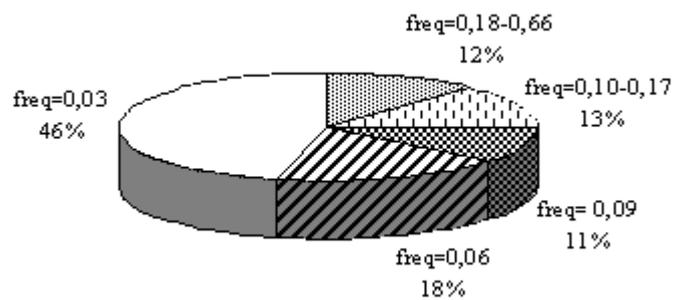


Figura 1. Distribuição da frequência alélica observada para os 293 alelos amplificados nos 25 locos SSR entre as 35 linhagens de milho do programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo.