

Marcadores Microssatélites Multiplex para Análise Genética de Milho e Seu Emprego para Estudos de Diversidade e Proteção de Cultivares

Sílvia N. Jardim¹, Lilian Padilha²; Felipe Iani³, Jurandir V. Magalhães⁴ e Claudia T. Guimarães⁵

¹Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas-MG, silvia@cnpms.embrapa.br; ²Embrapa Café, lilian.embrapa@uol.com.br; ³Embrapa Milho e Sorgo; ⁴Embrapa Milho e Sorgo, claudia@cnpms.embrapa.br; ⁵Embrapa Milho e Sorgo, jurandir@cnpms.embrapa.br.

Palavras-chave: *Zea mays* L., marcadores moleculares, multiplex, linhagem elite.

A tecnologia de marcadores moleculares tem demonstrado ser uma ferramenta eficiente para a caracterização de recursos genéticos, e em programas de melhoramento tem sido empregada de maneira crescente para o desenvolvimento de cultivares, avaliação de pureza de sementes e proteção intelectual.

Centenas de marcadores microssatélites já foram descritos em milho, inclusive com sua localização cromossômica determinada. Estes vêm sendo empregados amplamente no *fingerprinting* de germoplasma de milho (Smith et al. 1997; Senior et al. 1998, Gethi et al., 2002; Liu et al., 2003) por causa do seu alto nível de polimorfismo (Saghai Maroof et al., 1994) e pela facilidade de automação do sistema de detecção. Na Embrapa Milho e Sorgo o *fingerprinting* das linhagens elite vem sendo desenvolvido para auxiliar o programa de melhoramento de milho na alocação das linhagens elite em grupos heteróticos e para a seleção de genitores em cruzamentos (Padilha, 2002).

Atualmente, o programa de melhoramento de milho da Embrapa possui cerca de 200 linhagens elite, com uma capacidade crescente de geração de novas. O *fingerprinting* de uma grande coleção como essa requer o emprego de métodos de larga escala no laboratório, e na coleta e armazenagem dos dados gerados. O uso de conjuntos multiplex de marcadores microssatélites fluorescentes aumenta enormemente a capacidade de realização de genotipagem semi-automatizada de um grande número de amostras, permitindo a caracterização mais rápida de recursos genéticos, e com um menor dispêndio de reagentes. O objetivo deste trabalho foi otimizar um método multiplex semi-automatizado de detecção de marcadores microssatélites em milho. Os conjuntos de reações multiplex otimizados permitirão a avaliação genotípica em larga escala das linhagens elite do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

Metodologia

A partir de dados de microssatélites de 48 linhagens elite de milho, avaliadas anteriormente (Padilha, 2002), foram selecionados os 21 mais informativos entre os 100 avaliados. Para essa seleção foram levados em consideração o seu polimorfismo, sua distribuição ao longo do genoma, pela frequência bem distribuída entre os seus alelos e pelo valor do Conteúdo de Informação do Polimorfismo (PIC).

Esses 21 marcadores foram organizados de modo a formar sete tripletes (Tabela 1). Tais conjuntos de tripletes foram testados em quatro linhagens elite de milho quanto à amplificação de fragmentos detectados satisfatoriamente pelo equipamento ABI377.

Após vários ajustes foi estabelecido um protocolo de amplificação satisfatória para todos os conjuntos multiplex, que poderá ser empregado em qualquer DNA genômico de milho, descrito a seguir. As reações de amplificação em multiplex foram preparadas com volume final de 20 μ L, consistindo de 30 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5mM de MgCl₂, 0,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 mM dNTPs e 2,5 pM de cada um dos pares de iniciadores componentes da reação multiplex. As amplificações seguiram-se mediante as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 30 ciclos de 95°C por um minuto, 55°C por dois minutos e 72°C por dois minutos, elongação final a 72°C por cinco minutos. A reação de amplificação foi diluída duas vezes em água destilada e 3 μ L dessa diluição foram misturados a 0,3 μ L do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,8 μ L de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,4 μ L de tampão de carregamento (*blue dextran* 50mg/ml; EDTA 25 mM). As amostras foram desnaturadas por dois minutos a 95°C e mantidas em gelo até o carregamento de 3 μ L em gel de poliacrilamida 5% (p/v) (Long Ranger Gel Solution, Cambrex); uréia 6 M; Tris 100 mM; ácido bórico 100 mM e EDTA 2 mM. A eletroforese foi realizada no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por 2,5 h a 3000V em tampão TBE (Tris-HCl 0,89M; ácido bórico 0,02M e EDTA 0,02M pH 8,0).

Tabela 1: Conjuntos multiplex padronizados para amplificação de microssatélites de milho.

microssatélite	in	fluorescência	multiplex
upssr14	.09	ET	
mc1771	.04	EX	
nlg182	.03	-FAM	
hi053	.05	ET	
mc1862	.11	-FAM	
nlg1863	.03	EX	
hi084	0.04	ET	
mc1653	.07	EX	

nlg589	.10	-FAM
hi116	.06	-FAM
upssr24	.08	ET
nlg1006	.00	EX
nlg2241	.06	-FAM
mc1019	.06	ET
nlg161	.00	EX
mc1084	0.07	ET
mc1033	.02	-FAM
nlg125	.02-2.03	EX
mc1016	.02	-FAM
nlg1338	.01	ET
mc1008	.01	EX

Os 21 locos SSR avaliados em milho foram polimórficos nas linhagens estudadas, amplificando um total de 370 alelos. O número de alelos por loco variou de oito (umc1771) a 36 (bnlg1006), indicando ampla diversidade genética entre os genótipos avaliados. Os valores de PIC para os 21 locos SSR de milho variaram de 0.65 (bnlg589) a 0.96 (bnlg1006) (Tabela 2).

Estes conjuntos multiplex vão permitir um ganho de tempo e emprego de um número menor de reagentes na análise por marcadores moleculares de genótipos de milho, facilitando o trabalho em larga escala na genotipagem de milho.

Tabela 2: Características dos 21 locos SSR avaliados em linhagens de milho.

SR	Número Alelos	de IC
		3
nlg1006	6	,96
nlg125	0	,92
		2
nlg1338	0	,88
nlg161	6	,92
		1
nlg182	6	,88
nlg1863	6	,92
		1
nlg2241	4	,86
upssr14	8	,79
		2
upssr24	9	,94
hi084	7	,88
		2
mc1008	5	,92
mc1016	6	,93
		1
mc1019	6	,90
mc1033	6	,95
		1
mc1084	3	,68
mc1653	5	,92
		8
mc1771		,68
mc1862		,68
		1
nlg589	5	,65
		1

hi053	1	,82
		8
hi116		,75

Conclusões

Foi descrito o desenvolvimento e otimização de um sistema eficiente multiplex para análise de um conjunto selecionado de marcadores microssatélites hipervariáveis em milho. Foi otimizado um procedimento que permite a análise semi-automatizada de 21 marcadores microssatélites distribuídos em sete reações de amplificação.

A otimização destas reações em condições multiplex resulta não apenas na seleção de locos com alto grau de polimorfismo, mas também efetivamente permite o avanço da velocidade dos estudos de diversidade das linhagens elite do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

Referências bibliográficas

SAGHAI MAROOF, M.A.; BIYASHEV, R.M; YANG, C.P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R.W. Extraordinarily polymorphic microssatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings National Academy of Science*, v.91, p. 5466-5470, 1994.

GETHI, J.G.; LABATE, J.A.; LAMKEY, K.R.; SMITH, M.E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U.S. maize inbred lines. *Crop Science*, v.42, p.951-957, 2002.

LIU, K.; 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*, v.165, p. 2117-2128, 2003.

PADILHA, L. Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2002.

SENIOR, M.L.; MURPHY, J.P. GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using na agarose gel system. *Crop Science*, 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. MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S. ZIEGLE, J. An evaluation of utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, v.95, p.163-173, 1997.