



Lilian Padilha¹, Magnólia M. Lopes², Maria G.G.C. Vieira³ e Cláudia T. Guimarães¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG. ²UNESP, Jaboticabal, SP, 14884-900. ³UFLA, C.P. 37, 37200-000, Lavras, MG. e-mail: lilian@cnpms.embrapa.br

Introdução

As sementes híbridas de milho, obtidas a partir de cruzamentos entre linhagens, têm como fonte de contaminação genética a auto-fecundação do parental fêmea nos campos de produção de sementes. A técnica de microssatélites é eficiente para a detecção deste tipo de contaminação em sementes (Salgado, 2001; Padilha et al., 2003), sendo uma ferramenta importante para o monitoramento dos cruzamentos que ocorrem no campo. Os microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) são segmentos de sequência repetida, distribuídos aleatoriamente no genoma, que são amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos. A rapidez associada à precisão da análise são grandes vantagens da técnica de SSR. A possibilidade de análise de vários indivíduos de uma só vez, ou seja, a análise em *bulk* das amostras recebidas do campo, é mais uma vantagem que pode ser associada a este tipo de marcador. No entanto, faltam informações consistentes a respeito da sensibilidade da técnica com relação ao número de indivíduos que podem ser utilizados na montagem do *bulk*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade da técnica de SSR quanto à eficiência de amplificação de dois alelos numa mesma amostra, presentes em diferentes proporções. Ainda, selecionar cinco conjuntos de *primers* eficientes em amplificar perfis genéticos para distinguir cinco materiais híbridos dos seus parentais.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no laboratório de Análise de Sementes e no Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Foram utilizadas sementes de quatro híbridos simples (HS1, HS2, HS3 e HS4), um híbrido triplo (HT) e nove linhagens (L1, L2, ..., L9), provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1).

Tabela 1. Híbridos e seus respectivos progenitores cujos perfis foram analisados pela técnica de microsatélites.

Híbrido	Linhagens
HS1	L9 x L8
HS2	L9 x L6
HS3	L3 x L4
HS4	L7 x L2
HT	HS2 x L1

A sensibilidade dos marcadores SSR foi avaliada pela capacidade de detecção do alelo em uma mistura de um híbrido (HS3) com uma linhagem não envolvida neste híbrido (L1). As misturas iniciais dos DNAs foram nas proporções de 1:0, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 e 1:40, realizadas para o HS3 com a L1 e, de maneira inversa, para a L1 com o HS3. Os métodos para obtenção das proporções acima citadas foram: 1) mistura de volumes de DNA cuja concentração foi determinada em gel de agarose 0,8% e, 2) mistura de discos foliares com diâmetro de 0,8 cm. Posteriormente, trabalhou-se com os valores de 1:5 e 1:8 de misturas entre os DNAs das linhagens que participam dos híbridos.

O DNA foi extraído da parte aérea de plântulas com cinco dias de germinação em rolo de papel mantido a 25°C. Para representar cada genótipo, o DNA foi extraído de um conjunto de 10 plântulas. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%, por meio da comparação com um DNA de concentração conhecida.

Para avaliar a sensibilidade da técnica de SSR, foram selecionados *primers* polimórficos que apresentavam boa qualidade de amplificação. Um total de 24 *primers* foi selecionado a partir da avaliação de 100 *primers*. Foi simulada uma contaminação genética nas proporções de 1:1, 1:5, 1:8, 5:1, 8:1 de ambas as linhagens, para verificar a viabilidade de identificação destes níveis de contaminação.

As reações de SSR foram realizadas segundo descrito em Padilha (2002). Os fragmentos amplificados foram separados em géis de agarose 4% e visualizados sob luz ultravioleta após a coloração com brometo de etídio (1 mg/mL).

Resultados e Discussão

As misturas de volumes de DNA apresentaram o mesmo padrão de amplificação observado para as misturas de discos foliares. As proporções das misturas de 1:10 até 1:40, independente do *primer*, não permitiram visualizar a presença do alelo da mistura. Assim foram realizadas avaliações com as proporções 1:5 e 1:8 das linhagens parentais dos híbridos 1 a 4.

Na Figura 1 estão mostrados os géis com os produtos amplificados para dois híbridos. Verifica-se que a sensibilidade é variável com o *primer* utilizado. Isto pode estar ocorrendo em função da maior ou menor especificidade do mesmo com relação ao seu anelamento na região a ser amplificada. Por outro lado, o contaminante presente na reação, também interfere na maior ou menor sensibilidade da técnica. A competição que ocorre entre seqüências amplificadas simultaneamente, é uma provável explicação para este fato. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a reação de amplificação será favorecida onde a complementaridade entre o *primer* e o sítio de iniciação no DNA-molde é mais alta. Para o híbrido HS1, o *primer* bnlg125 não foi capaz de amplificar o alelo da linhagem L9 quando o DNA da L8 estava em concentrações 5 ou 8 vezes superior. Quando o inverso ocorre, mesmo a L9 tendo o DNA 8 vezes mais concentrado que o DNA da L8, ainda é possível verificar um padrão correspondente à contaminação da L9 com a L8.

Já o contrário ocorre para o *primer* bnlg166, que parece ser mais específico para a L9, cuja maior concentração de DNA na mistura com a L8 favorece a amplificação do alelo da L9. Por outro lado, o *primer* bnlg2291 não apresentou especificidade diferenciada para nenhuma das duas linhagens, sendo que um *bulk* de até 5 plantas pode ser recomendado para este último caso. O comportamento diferenciado para a amplificação dos alelos do HS1 também foi verificado para o HS2 (Figura 1) e para os demais materiais genéticos. Assim, para se trabalhar com *bulks* de plantas no monitoramento de contaminações em campos de produção de sementes, é necessário que seja conhecida a sensibilidade da técnica para os locos a serem avaliados. Isto possibilitará a definição do número de plantas a ser utilizado para a construção do *bulk*. Para os *primers* aqui selecionados, um *bulk* de cinco plantas pode ser utilizado para o monitoramento da pureza genética em campos de multiplicação de sementes de milho. A Tabela 2 apresenta a relação de *primers* que foram eficientes em distinguir o híbrido das suas linhagens parentais, para cada híbrido simples e triplo.

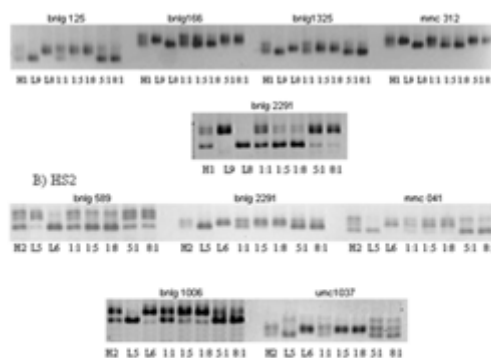


Figura 1. Perfil de bandas SSR obtidas para os híbridos HS1 (A) e HS2 (B) e suas respectivas linhagens parentais, simulando uma contaminação genética nas proporções de 1:1, 1:5, 1:8, 5:1, 8:1 de ambas as linhagens.

Tabela 2. Relação de *primers* que permitiram a distinção do híbrido de suas linhagens parentais.

Material	Primer
HS1	bnlg125, bnlg166, bnlg325, mnc312, bnlg2291, umc1003
HS2	mnc071, bnlg1006, umc1037, bnlg589, mnc041, bnlg1027
HS3	mnc312, umc1008, phi072, umc1055, umc1037
HS4	bnlg125, bnlg166, bnlg1520, mnc071, bnlg669
HT	bnlg1117, bnlg2291, bnlg1006, umc1008, phi072, umc1016, bnlg238

Literatura Citada

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-CENARGEM, 1998. 220 p.

PADILHA, L. **marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Padilha, L., Vieira, M.G.G.C., Guimarães, C.T. et al. Marcadores microsatélites para avaliação de sementes genéticas de milho. **Informativo Abrates**, Londrina, v.13. n.3, p. 82, 2003. Trabalho apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Sementes, Gramado, RS. 2003.

Salgado, K.C.C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares.** 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C
