

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2003

Autores

Lilian Padilha

Claudia Teixeira Guimarães  
Ph.D. Biotecnologia Vegetal  
claudia@cnpms.embrapa.br

Edilson Paiva  
Ph.D. Biotecnologia Vegetal  
edilson@cnpms.embrapa.br



## Avaliação da Pureza Genética em Sementes de Milho Utilizando Marcadores Microsatélites



Os sistemas de produção de sementes de milho são caracterizados por serem extremamente competitivos, fornecendo um produto final com alto valor agregado, com alta qualidade genética, física, fisiológica e sanitária. A valorização da qualidade das sementes foi intensificada com a aprovação da Lei de Sementes, nº 10.711 de 05 de agosto de 2003, que fortalece a fiscalização da produção e a comercialização de sementes no país, além de abrir o sistema de certificação a entidades privadas e aos próprios produtores de sementes.

Nas etapas de obtenção e multiplicação das sementes, atenção especial é dada à sua pureza genética, pois esta irá garantir que as características de interesse acrescentadas aos materiais comerciais sejam mantidas e expressas nos cultivos subsequentes. Como, na cultura do milho, a grande maioria das cultivares comercializadas é híbrida, obtidas a partir de cruzamentos entre linhagens, a contaminação ocorre principalmente pela autofecundação do parental fêmea nos campos de produção de sementes. Tal contaminação tem conseqüências indesejáveis, como a redução na qualidade fisiológica das sementes e na produção final de grãos da cultura do milho (Von Pinho, 1996). No caso de híbridos simples, produzidos pelo cruzamento entre linhagens endogâmicas, existe ainda o risco da liberação das sementes das linhagens autofecundadas misturadas ao híbrido. Esse é um fato preocupante para a empresa detentora do híbrido, uma vez que nas linhagens reside grande parte da tecnologia e dos esforços de melhoramento da empresa, que ficariam expostos às apropriações indevidas. Assim, torna-se essencial um sistema que permita monitorar e rastrear contaminações genéticas que ocorrem no campo, permitindo o fornecimento de sementes com elevados padrões de pureza genética aos produtores de sementes certificadas e, conseqüentemente, aos produtores de grãos.

A avaliação da pureza genética tem sido realizada por meio de marcadores morfológicos baseados em características das sementes, plântulas, plantas em desenvolvimento e espigas. Com o rápido aperfeiçoamento das técnicas moleculares, fundamentadas na

amplificação de fragmentos de DNA, grandes avanços têm sido alcançados na área dos marcadores de DNA. Dentre as técnicas de marcadores de DNA disponíveis, pode ser destacada a de microssatélites ou SSR (*Seqüências Simples Repetidas*), em que segmentos de seqüência repetida, distribuídos aleatoriamente no genoma, são amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos. A técnica de microssatélites é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, sendo, ainda, facilmente automatizada. Esses marcadores são os mais indicados para o monitoramento da pureza genética, devido às suas características de multialelismo e co-dominância, apresentando um elevado conteúdo de informação genética por loco. A característica de co-dominância permite que sejam detectadas as diferentes contribuições parentais nas progênies. Vários trabalhos têm apresentado a aplicação de marcadores microssatélites no monitoramento da pureza genética de sementes (Salgado, 2001; Padilha, 2002). Outra vantagem dos microssatélites é que eles requerem uma pequena quantidade de DNA e o mesmo pode ser extraído de qualquer material biológico, sementes ou plântulas em diferentes fases do desenvolvimento, permitindo uma avaliação precoce e eficiente dos lotes de sementes.

A Figura 1 exemplifica as características de multialelismo e de co-dominância dos marcadores SSR, em que um par de *primer*, representando um loco genético, amplifica vários alelos em diferentes materiais genéticos distintos, permitindo, assim, a distinção entre os híbridos simples e as suas respectivas linhagens parentais. A avaliação da pureza genética de um lote de sementes de um híbrido simples comercial é apresentada na Figura 2, em que foi utilizado um par de *primer* microssatélite para amplificar dois alelos distintos entre as linhagens parentais. Assim, a contaminação é detectada quando o perfil genético de alguma semente não equivale ao do híbrido simples. Na Figura 2, observa-se que a semente 10 foi originada da autofecundação da linhagem parental fêmea  $L_2$ . No processo de manutenção do estoque de linhagens elites utilizadas nos programas de

melhoramento de cultivares, é necessário que as linhagens sejam mantidas com um elevado grau de homozigose e de pureza. Da mesma forma, os marcadores SSR permitem monitorar o nível de homozigose das linhagens e acelerar o processo de obtenção das mesmas, identificando os indivíduos que apresentam maior número de locos em homozigose (Gethi et al., 2002; Padilha, 2002; Prasad et al., 2000; Senior et al., 1998; Smith et al., 1997). Uma vez identificada a heterozigosidade residual em uma linhagem, elas podem ser submetidas a um avanço na geração de autofecundação, a partir de indivíduos únicos que apresentem níveis elevados de homozigose entre os locos avaliados. Na Figura 3, sementes genéticas de 28 indivíduos das linhagens  $L_1$  e  $L_2$  foram genotipadas com o loco microssatélite bnl589 para avaliação do nível de endogamia das mesmas. O padrão de amplificação demonstrou que todos os indivíduos da linhagem  $L_1$  eram homozigotos, ao contrário da linhagem  $L_2$ , onde foi verificado que os indivíduos 6, 7, 8, 15 e 18 apresentavam esse loco em heterozigose. A combinação de um conjunto de locos microssatélites permite o acompanhamento do nível de homozigose das linhagens.

A adaptação e a incorporação da tecnologia de marcadores microssatélites às atividades do programa de melhoramento é uma estratégia precisa e eficiente, que pode ser utilizada para garantir elevados padrões de pureza genética das linhagens elite e das sementes híbridas de milho. Além das características fenotípicas, o melhorista terá acesso às informações sobre a variabilidade genética, advindas diretamente do DNA, sendo um grande diferencial na seleção das plantas que serão utilizadas como fonte das sementes genéticas. Por se tratar de uma técnica de análise rápida, precisa e independente do ambiente, ela supera as limitações inerentes aos marcadores morfológicos utilizados para tais propósitos até então.

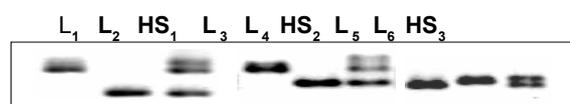


Figura 1. Perfis genéticos gerados com um par de *primer* microssatélite, diferenciando três híbridos simples  $HS_1$ ,  $HS_2$  e  $HS_3$  das suas respectivas linhagens  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ,  $L_4$ ,  $L_5$  e  $L_6$ .



Figura 2. Perfil genético obtido pela amplificação de um par de *primer* microsatélite para avaliação de uma amostra de sementes do híbrido simples (HS) comercial de milho. A  $L_1$  é a linhagem parental macho, a  $L_2$  é a linhagem parental fêmea e os números de 1 a 13 são as sementes do lote. Nota-se que a semente 10 possui apenas o alelo da linhagem  $L_2$ , indicando que a sua origem é a autofecundação da linhagem fêmea  $L_2$  e, portanto, é uma contaminação genética.

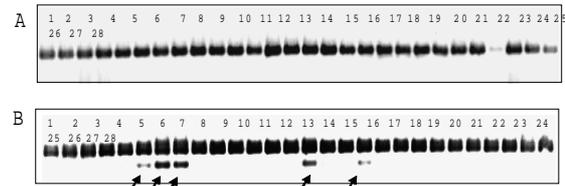


Figura 3 - Avaliação do nível de endogamia das linhagens  $L_1$  (A) e  $L_2$  (B). A linhagem  $L_1$  apresenta um elevado nível de homozigose, ao passo que na linhagem  $L_2$  são identificados indivíduos em heterozigose (indicados pelas setas).

### Referências Bibliográficas

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**, Madison, v. 42, n. 4, p. 952-957, 2002.

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

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYA, H. S.; GUPTA, P. K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 584-592, 2000.

PINHO, E. V. R. von; PINHO, R. G. von; CÍCERO, S. M. Efeito da contaminação genética em campos de produção de sementes sobre o comportamento de diferentes híbridos de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 18, n. 2, p. 256-261, 1996.

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

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, n. 4, 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.; ZIEGLE, 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, n. 1/2, p. 163-173, 1997.

#### Circular Técnica, 30

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 151  
**Fone:** (31) 3779-1000  
**Fax:** (31) 3779-1088  
**E-mail:** sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição  
 1ª impressão (2003): 200 exemplares

#### Comitê de publicações

**Presidente:** Ivan Cruz  
**Secretário-Executivo:** Frederico Ozanan M. Durães  
**Membros:** Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

#### Expediente

**Supervisor editorial:** José Heitor Vasconcellos  
**Revisão de texto:** Dilermando Lúcio de Oliveira  
**Tratamento das ilustrações:** Tânia Mara A. Barbosa  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara A. Barbosa