

“Fingerprinting” Molecular de Linhagens de Milho

Claudia Teixeira Guimarães¹

Lilian Padilha²

Isabel Regina Prazeres de Souza³

Edilson Paiva⁴

Os programas de melhoramento vegetal são processos que requerem elevados investimentos financeiros e intelectuais para a geração de cultivares e híbridos com alto valor agregado. Assim, torna-se necessário caracterizar, de maneira precisa e inequívoca, as novas cultivares, visando minimizar os riscos de apropriação indevida e estimulando, com isso, novos investimentos, para um contínuo desenvolvimento de genótipos superiores e mais adaptados.

Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares, Nº 9.456, de 25 de abril de 1997 (Brasil, 1997), foi instituído o direito à proteção de cultivares, cuja caracterização é realizada por meio de descritores que atendem aos critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade, ao longo de gerações sucessivas. Atualmente, a proteção de genótipos de milho é oficialmente realizada por meio de características morfológicas. Estas apresentam

como principais desvantagens a necessidade de um grande número de descritores, que serão identificados na planta adulta, além do tempo e do espaço físico necessários para a avaliação do material. Associada a isto, ainda existe a influência do ambiente, que poderá levar à geração de resultados pouco confiáveis para os marcadores morfológicos.

A introdução de técnicas moleculares para caracterizar e identificar cultivares é um processo atual e, apesar de ainda não ser reconhecida como metodologia oficial, vem sendo fortalecida em função do alto grau de precisão e informação que pode ser obtido pelo “fingerprinting” molecular. O “fingerprinting” ou genotipagem molecular é a “impressão digital” de um determinado genótipo, que permite a obtenção de seu perfil genético e sua diferenciação inequívoca de outro genótipo.

¹ Eng. Agr., Doutora, Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Milho e Sorgo Caixa Postal 151 CEP 35 701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: claudia@cnpmis.embrapa.br

² Eng. Agr., Doutora, Fitotecnia, Embrapa Milho e Sorgo Caixa Postal 151 CEP 35 701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: lilian@cnpmis.embrapa.br

³ Eng. Agr., Ph.D. Fitomelhoramento, Embrapa Milho e Sorgo Caixa Postal 151 CEP 35 701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: isabel@cnpmis.embrapa.br

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Biologia Molecular de Plantas, Embrapa Milho e Sorgo Caixa Postal 151 CEP 35 701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: edilson@cnpmis.embrapa.br

Os métodos que utilizam diretamente o DNA apresentam grandes vantagens, por não serem afetados pelo ambiente e por apresentarem um elevado poder de discriminação (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas) são os mais indicados para a diferenciação varietal. Esses marcadores são baseados em uma metodologia simples e rápida, que gera marcadores com elevado conteúdo de informação genética e amplamente distribuídos no genoma do milho. Tal metodologia é rotineiramente utilizada nas elucidações de processos de paternidade humana, em que alcança um amplo respaldo jurídico e forense.

Com relação aos aspectos genéticos, os microssatélites são uma classe de marcadores que consistem de pequenas seqüências de nucleotídeos repetidas em tandem e amplamente distribuídas no genoma eucarioto. Cada microssatélite constitui um loco genético altamente polimórfico, cujos diferentes alelos são resultantes das variações no número dessas repetições (Senior et al., 1998; Smith et al., 1997).

As regiões de SSR são delimitadas por seqüências de DNA conservadas, para as quais são desenhados *primers* que serão utilizados para amplificação dos microssatélites. Essas amplificações dos locos SSR são realizadas por meio de reações em cadeia da polimerase

do DNA (PCR). Os fragmentos amplificados são, então, separados por eletroforese em géis de agarose (Figura 1) ou poliacrilamida (Figura 2), revelando os diferentes alelos. É importante realçar que o DNA a ser utilizado na reação de PCR pode ser extraído a partir de pequenas quantidades do material biológico, sementes ou folhas e em qualquer estágio de desenvolvimento da planta.

Além da alta resolução genética, outra vantagem da técnica SSR é que a mesma pode ser semi-automatizada, o que aumenta a capacidade para processamento de dados. Essa semi-automatização refere-se, principalmente, à extração e análise automática dos dados por programas computacionais, reduzindo, com isso, a chance de erros provocados pela manipulação humana dos resultados. Em tais sistemas, são utilizados *primers* marcados com fluorescências de colorações diferentes, que podem ser combinados para o processamento simultâneo das amostras, aumentando a eficiência do mesmo.

A captura das informações é realizada pela leitura dos fragmentos fluorescentes por um sistema a laser, no seqüenciador automático de DNA. Um padrão de peso molecular, também marcado com fluorescência, é avaliado juntamente com cada uma das amostras, garantindo a quantificação precisa do tamanho dos fragmentos.

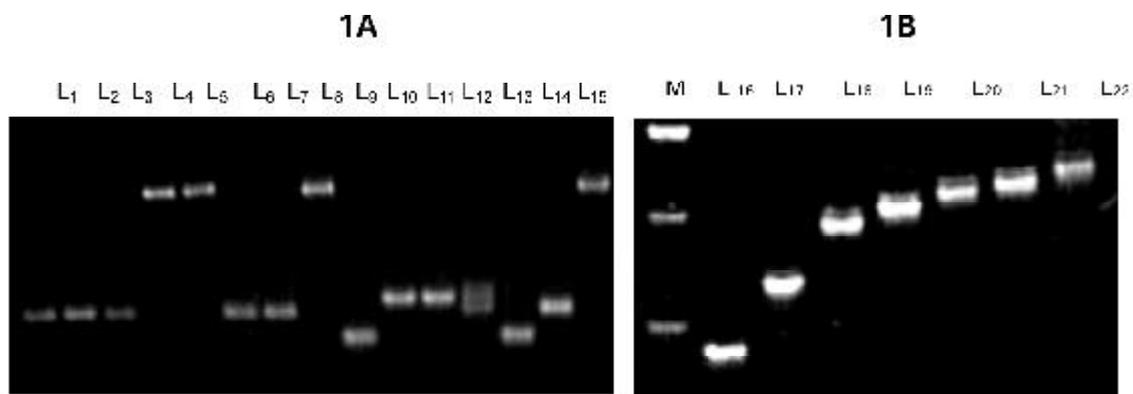


Figura 1. Padrão multialélico dos marcadores microssatélites entre linhagens (L) de milho. **A)** Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose, tratado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. **B)** Os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, contendo 1X Spreadex Polymer NAB (Elchrom Scientific) e corado com brometo de etídio. M é o padrão de peso molecular 25 pb Ladder

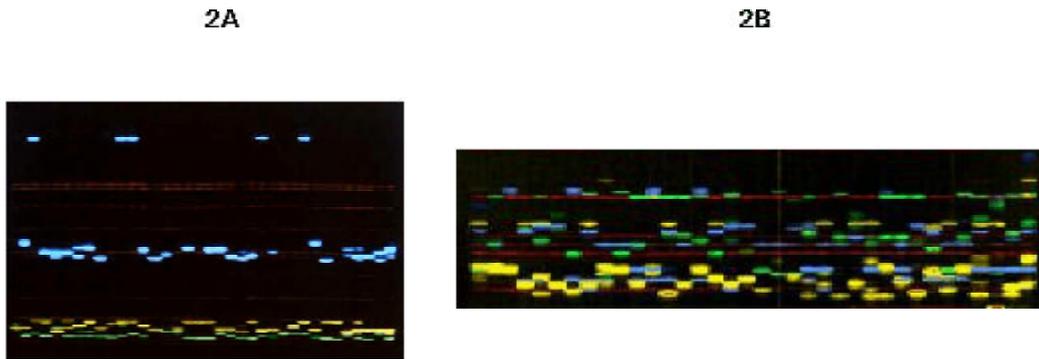


Figura 2. Padrão de amplificação dos marcadores microssatélites utilizando primers fluorescentes. **A)** Três locos SSR com as fluorescências azul, verde e amarela, visualizados em gel de poliacrilamida, no seqüenciador automático de DNA. **B)** Combinação de seis locos SSR marcados com fluorescência e visualizados em único gel de poliacrilamida no seqüenciador automático de DNA.

No sistema semi-automatizado, é possível visualizar e analisar até três produtos amplificados numa mesma faixa de tamanho para os fragmentos ou, ainda, serem combinados locos com diferentes amplitudes de tamanho, aumentando, assim, o número de marcas que podem ser analisadas em um gel (Figura 2). Outra característica favorável diz respeito à resolução do sistema, possuindo a precisão de um nucleotídeo em uma faixa de tamanho entre 50 e 500 bases.

Variações nas regiões SSR, resultantes dos diferentes números de alelos detectados por loco genético, apresentam elevado poder discriminatório e, normalmente, poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse. Essa característica é um fator importante, considerando a necessidade de discriminação de cultivares muito próximas ou essencialmente derivadas.

Em milho, para a definição de "fingerprintings" únicos para cada uma das 94 linhagens avaliadas por Senior et al. (1998), apenas cinco locos de SSR foram necessários. Analisando 35 linhagens-elite de milho do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, foram identificados dois *primers* microssatélites que permitiram a diferenciação completa de todas as linhagens (Padilha, 2002). Além da identificação das linhagens e do auxílio aos processos de Proteção de Cultivares, a análise com marcadores moleculares

permite o estudo da diversidade genética dentro do germoplasma-elite.

Referências bibliográficas

- BRASIL. **Lei n. 9.456**, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1997. p. 15-30.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.
- RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 442-450, 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.; 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, p. 163-177, 1997.

**Comunicado
Técnico, 92****Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

**Comitê de
Publicações****Expediente**

Presidente: Jamilton Pereira dos Santos
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Cláudia
Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos
Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro

Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoração eletrônica: Dilermando Lúcio de Oliveira

1ª edição
1ª impressão (2004) Tiragem: 200