



## **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DE MILHO CRIOULO ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ASSOCIADOS AO CARÁTER TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO**

**KNEIB, Raquel Bartz<sup>1</sup>; VILLELA, Juliana Castelo Branco<sup>1</sup>; MOREIRA, Laura Lemons<sup>1</sup>; LEMÕES, Juliana Silva<sup>1</sup>; MONTE, Fernanda Garcia<sup>1</sup>; PINHEIRO, Natércia Lobato<sup>1</sup>; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> <sup>2</sup> *Laboratório de Biologia Molecular, Embrapa Clima Temperado – Pelotas RS  
BR 392 – Km 78 – CEP 96001-970 – Caixa Postal 403. raquelkneib@yahoo.com.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

As várzeas se caracterizam por serem solos aluviais e/ou hidromórficos, geralmente planos e ricos em matéria orgânica, facilmente irrigáveis por gravidade, na maioria dos casos, e inundados temporariamente, porém, apresentando, muitas vezes, umidade excessiva, necessitando de drenagem adequada. No sul do Brasil, a cultura do milho pode ser uma alternativa de cultivo para áreas de várzea; entretanto, o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao encharcamento é condição fundamental para viabilizar economicamente esta opção. (Silva et al., 2005). O uso de marcadores moleculares na caracterização e avaliação de germoplasma e na identificação de genes de interesse tem permitido obter avanços consideráveis nos programas de melhoramento genético de diferentes culturas (PALMIERI & MAIA, 2007). Microsatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) são marcadores co-dominantes, multialélicos, altamente informativos, e de ampla utilização na maior parte das culturas (MORGANTE & OLIVIERI, 1993). O uso desta classe de marcadores é bastante promissor, pois estes locos são os que apresentam maior frequência de mutações em todos os genomas e em todas as espécies animais e vegetais, elevado nível de polimorfismo detectável, permite uma separação precisa de indivíduos aparentados e exige uma quantidade mínima de DNA (ZIMMER, 2005). A partir destes marcadores, foi realizado este trabalho com o objetivo de caracterizar, cultivares de milho crioulo através de marcadores SSRs associados ao caráter tolerância ao encharcamento em milho.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS. A extração do DNA foi realizada utilizando folhas de 55

genótipos de milho cultivados em casa de vegetação da mesma unidade, segundo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987). As amostras foram quantificadas em fluorômetro, a amplificação foi realizada em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700.

O SSR PCR foi desenvolvido numa reação de 10 µl contendo 5 µl de GoTaq Green Master Mix, 50 ng de DNA, 0,8 µl de *primer Forward* e *primer Reverse* na concentração de 10 µM. O programa de amplificação utilizado foi do tipo *touchdown*, que consistiu de 18 ciclos de 94 °C por 1 minuto seguido de um decréscimo de 1 °C a cada 2 ciclos (64 °C a 55 °C) e 72 °C por 1 minuto e mais 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C também por 1 minuto.

O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 3,5% e visualizado em transiluminador por meio de coloração com brometo de etídio.

Foram utilizados 7 pares de *primers* sintetizados a partir do genoma do milho (phi 006, phi 026, phi 074, phi 085, UMC 1018, UMC 1546, UMC 1726), flanqueando 7 locos microssatélites.

Os produtos de reação de amplificação (bandas) do SSR-PCR foram classificados independentemente conforme presença (1) e ausência (0) de bandas. Os dados gerados a partir da análise de todos os indivíduos testados, foram utilizados para o cálculo da similaridade genética entre todos os pares de indivíduos, com o auxílio do programa computacional NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000). Para o cálculo da similaridade genética, foi utilizado o coeficiente de Dice (Dice, 1945), e com base nas matrizes de similaridade gerada, foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento UPGMA. Para a verificação do ajuste entre a matriz de similaridade e o respectivo dendrograma, foi estimado o coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal & Rohlf (1962).

**Tabela 1.** Lista de genótipos utilizados no estudo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS, 2009.

<i>Amostra</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Amostra</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Amostra</i>	<i>Genótipo</i>
102	Colonial Sta Eulalia 2	262	Amarelo comum	145	Grand roux amarelo
103	Branção	265	Recombinação 56047	146	Recombinação 56106
110	Açoriano branco	357	8 carreiras amarelo	196	Vermelho Arabatiba
118	Palha fina artesanato	358	Argentino flint	197	Pururuca barnco
483	Cms 50 original	472	Pool 33 dentado	360	Ajuricaba C
105	Br 451	473	8 carreira	470	Palha Roxa
106	Cinquentinha	474	Pop 9	475	Sabuguinho ou M. Grosso
109	Recombinação 56030	477	Recombinação 56103	476	Colonial Sta Eulalia
111	Grand roux roxo	478	M bonito pl baixa	479	Recombinação 56034
113	Cateto fe 265	481	Milho branco	112	Roux indio
114	Amarelão	107	Vermelhão	122	Guarentino
115	Ferro	128	Amarelão comum colmirati	133	Argentino
117	Caiano roxo	132	Pool 34 duro	134	Pop 1
123	Amarelo cunha	139	Pintado	138	Bico de ouro
126	Mbr 86 novo	140	Colonial vermelho	259	Dente de ouro
131	Cms 50	144	Milho do lírio	260	Pipoca roxa
135	Cerrito velho	121	Brasino	261	Argentino
137	Cunha Fe 101	125	Cms 50		
142	Mbr 86	257	Pop 2		

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise dos resultados, apresentados na figura 1, foi verificado que a similaridade genética entre os genótipos variou de 6 a 92%, com média de 29%. O emprego da similaridade média como critério para a separação, propiciou a

visualização de seis grupos distintos, onde: grupo I foi formado pelos genótipos 483, 118, 110, 103 e 102, grupo II pela maioria dos genótipos, apresentando a maior similaridade para os genótipos 109 e 114, grupo III formado pelos genótipos 196, 145 e 144, grupo IV formado pelos genótipos 470, 360, 146, 476, 475, 125 e 121, grupo V agrupou de forma isolada o genótipo 197, demonstrando para este maior dissimilaridade genética dos demais genótipos presente neste estudo. e, o grupo VI foi representado pelos genótipos 138 e 122. Estes agrupamentos serão utilizados como critério para a seleção de genótipos, os quais serão ainda analisados para caracteres agrônômicos como também bromatológicos, visando seu uso direto ou em programas de melhoramento genético.

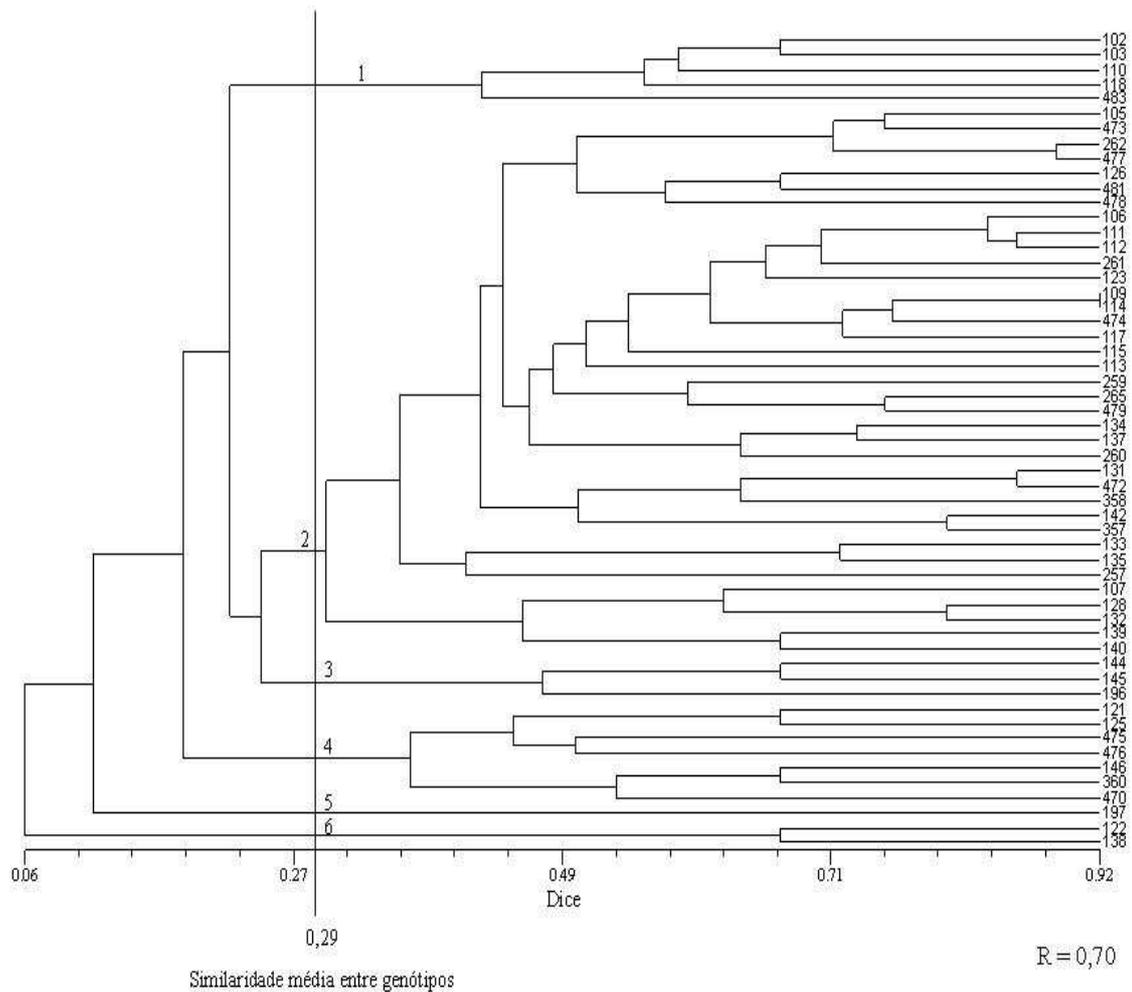


Figura1. Dendrograma de 55 genótipos de milho obtido a partir da análise molecular de microssatélites utilizando o índice de similaridade de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,70. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2009.

#### 4. CONCLUSÕES

A coleção de milho crioulo da Embrapa Clima Temperado apresenta grande variabilidade genética sendo de grande importância sua conservação e caracterização para uso no melhoramento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology**, Washington, v.26, n.3, p.297-307, 1945.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software, New York, 2000. 98p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, n.19, p.11-15, 1987.

PALMIERI, D.A. ; MAIA, L.C. . Marcadores microssatélites para estudos genéticos em mamona (*Ricinus communis* L.) e pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis, 2007, Teresina, PI. Anais do ... , 2007. p. 138-138.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**. 1993, v.3, n.1, p.175-182.

ZIMMER, P. D., et al. Identification of rice mutants (*Oryza sativa* L.) for agronomical and root system traits. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.9, p.195-199, 2003.

SILVA, S. D. A., NETO, J. F. B., SILVA, C. F. L., SERENO, M. J. C. M., OLIVEIRA, A. C., Identificação de QTLs para tolerância ao encharcamento em milho utilizando microssatélites, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, EMBRAPA, Pelotas, RS, 2005