



## **SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA LOCOS MICROSSATÉLITES PARA CONSTRUIR UM MAPA DE LIGAÇÃO, E ESTIMAR OS EFEITOS GENÉTICOS DE QTLs ASSOCIADOS COM A CAPACIDADE DE EXPANSÃO EM MILHO PIPOCA (*Zea mays* L.)**

Milene Ormino (PIBIC/CNPq-UEM), Maria de Fatima Pires da Silva Machado e-mail:mfpsmachado@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/CCB-DBC/ Maringá, PR.

**Biologia Celular, Genética vegetal.**

**Palavras-chave:** microssatélite (SSR), milho-pipoca, polimorfismo

### **Resumo:**

A proposta do presente estudo é selecionar *primers* microssatélites (Sequências Simples Repetidas) polimórficos para construir um mapa de ligação e estimar efeitos genéticos de QTLs associados a capacidade de expansão do milho-pipoca, (*Zea mays* L.). Foram utilizados 400 *primers* SSR já mapeados para milho comum, procurando adicionar um marcador a cada bin ao longo dos 10 cromossomos do milho. Foram encontrados 80 *primers* polimórficos.

### **Introdução**

Apesar do melhoramento do milho pipoca no Brasil e E.U.A. terem se iniciado quase na mesma época (na década de 1930), o Brasil ainda tem sido considerado como dependente de materiais melhorados que, mesmo não sendo importados são, em sua maioria, derivados de programas de melhoramento nos E.U.A. e cultivados no Brasil em parceria com produtores de empresas como a Yoki e a Hikari (Rangel et al., 2007). Por isso, o desenvolvimento de híbridos é de fundamental importância para a obtenção de materiais com maior capacidade de expansão (CE) e com adaptação específica às condições nacionais, a fim de tornar o produto acessível à diferentes regiões do país.

Segundo Hallauer e Miranda Filho (1985), para a obtenção de híbridos superiores, o primeiro passo é a identificação de materiais divergentes. Na concepção de diversos pesquisadores, esse procedimento pode ser obtido com resultados mais confiáveis quando se utilizam marcadores moleculares, por permitirem uma inequívoca representação das



diferenças genômicas das populações (Legesse et al., 2007; Balestre et al., 2008). Assim, selecionar *primers* polimórficos microssatélite (análise de *loci* SSR; *Simple Sequence Repeated*) é uma etapa imprescindível para construir um mapa de ligação para milho-pipoca tropical, e estimar os efeitos genéticos de QTLs associados com caráter CE.

## **Materiais e métodos**

### *Extração e Amplificação do DNA genômico*

As folhas jovens dos parentais e do híbrido F<sub>1</sub> e foram pulverizadas em nitrogênio líquido; 300mg de cada amostra de tecido vegetal foi incubado em banho-maria com 65 °C/1 hora com tampão de extração CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 0,5M pH 8,0; CTAB 1% e 140 mM de β-mercaptoetanol). O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994).

O DNA dos parentais e do híbrido F<sub>1</sub> foram amplificados com 400 pares de *primers* microssatélites, procurando adicionar um marcador a cada bin ao longo de cada cromossomo.

Para cada reação de PCR foram utilizados 50 ng de DNA, 0,5U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen), 1X o tampão que acompanha a enzima [20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl], 0,2 μM do *primer* F e R específico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 100 μM de uma mistura de dNTPs em um volume final de reação de 20 μl. Para a amplificação dos microssatélites foi utilizado o programa Touchdown PCR (Don et al., 1991). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose comum e Metaphor 4%. O gel foi corado em banho de brometo de etídio 0,5 μg/ml, e visualizado sob luz ultravioleta.

## **Resultados e Discussão**

Para a construção do mapa de ligação em F<sub>2</sub> foram testados 400 *primers* do banco de *primers* de milho comum, disponíveis em nosso laboratório e desses, 80 *primers* foram polimórficos (Tabela 1). Para os cromossomos 9 e 10 foram selecionados apenas um e quatro *primers*, enquanto que para os demais cromossomos foram selecionados de 7 a 14 *primers*. O maior número de *primers* foi selecionado para o cromossomo 7. Temperaturas diferentes daquelas propostas no programa Touchdown PCR (Don et al., 1991) deverão ser usadas para aumentar a eficiência de anelamento de *primers* no cromossomo 9, e selecionar um maior número de *primers* para este cromossomo. Os *primers* selecionados serão utilizados no mapeamento genético das famílias F<sub>2</sub>.



**Tabela 1-** Relação de *primers* polimórficos e seus respectivos bins em cada cromossomo de milho pipoca.

<b>Cromossomo 1</b>	<b>Cromossomo 6</b>
Bin 1.02 umc 2226 umc 2191	Bin 6.00 umc2208
Bin 1.03 umc 2383	Bin 6.02 umc1178 Bnlg 2191
Bin 1.04 umc 2227	Bin 6.04 umc1614
Bin 1.05 umc 2083	Bin 6.05 umc 2319
Bin 1.06 umc 1590 umc 1754	Bin 6.07 umc 2165
Bin 1.07 umc 2181 umc 2080	Bin 6.08 umc 2059
Bin 1.11 bnlg 1055	
<b>Cromossomo 2</b>	<b>Cromossomo 7</b>
Bin 2.00 umc 2349	Bin 7.00 umc 2090 umc1426
Bin 2.05 umc 1635 umc1003	Bin 7.02 Bnlg 1247 umc 1585 umc 1068
Bin 2.06 umc 1065 umc 2023	Bin 7.03 umc 1015 Bnlg 1805 umc 1456
Bin 2.07 umc 2205 umc1107	Bin 7.04 umc 1799 umc 1125 umc 1029
Bin 2.10 umc 2214	Bin 7.05 umc 2333 umc 1407
	Bin 7.06 umc 2190
<b>Cromossomo 3</b>	<b>Cromossomo 8</b>
Bin 3.00 umc 2255	Bin 8.01 umc 1075
Bin 3.01 umc 2257	Bin 8.03 umc 2146
Bin 3.04 umc 2262 mmc 0312	Bin 8.04 umc 2367
Bin 3.05 umc 2166	Bin 8.05 umc 2401
Bin 3.07 umc 1399 umc 1286	Bin 8.06 mmc 0181
Bin 3.08 Bnlg 1521 umc 2275	Bin 8.08 umc 1933
Bin 3.09 umc1639	Bin 8.09 Bnlg 1131
Bin 3.10 umc 1136	
<b>Cromossomo 4</b>	<b>Cromossomo 9</b>
Bin 4.01 umc 2410	Bin 9.07 umc 1137
Bin 4.02 bnlg 1175 umc 2410	Bin 9.08 umc 1137
Bin 4.03 umc 2280	
Bin 4.05 umc 1702	
Bin 4.06 umc 2027	
Bin 4.07 Bnlg 1927	
Bin 4.08 umc 1808	
<b>Cromossomo 5</b>	<b>Cromossomo 10</b>
Bin 5.00 umc 1496	Bin 10.03 umc 2349
Bin 5.01 umc 2036	Bin 10.06 umc 2122 umc 2190
Bin 5.03 umc 2060 Bnlg 1046 umc 2294	Bin 10.07 umc 1084
Bin 5.04 umc 2299 umc 2302	
Bin 5.05 umc 2164	
Bin 5.06 umc 1524	
Bin 5.07 umc 1646	



## Conclusões

A proposta do presente estudo de utilizar o marcador molecular do tipo microssatélite para construir um mapa de ligação para milho-pipoca, e estimar os efeitos genéticos de QTLs associados com caráter CE, pode ser considerada uma estratégia promissora e interessante para a obtenção de materiais com adaptação específica às condições nacionais diferenciadas, para tornar o produto acessível a grande parte dos produtores de diferentes regiões edafoclimáticas do país. No entanto, a etapa de seleção dos *primers* para mapear cada cromossomo resulta num sucesso diferenciado, podendo ser caracterizado como um processo laborioso, que requer investimentos adicionais de tempo e capital.

## Agradecimentos

Agradeço ao CNPQ pela bolsa concedida, à minha orientadora e coorientadora pela dedicação, à Universidade Estadual de Maringá e a todos do laboratório que me apoiarem nesta jornada, em especial à Liriana pela dedicação e ajuda.

## Referências

- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames. Iowa State University Press. 468 p., 1985.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p. 1994.
- LEGESSE, B.W.; MYBURG, A.A.; PIXLEY, K.V.; BOTHA, M. **Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers** *Hereditas*, v. 144, p 10-17, 2007.
- RANGEL, R.M., AMARAL JÚNIOR, A.T.; VIANA, A.P.; FREITAS JÚNIOR, S.P.; PEREIRA, M.G. **Prediction of popcorn hybrid and composites means**. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 7, p. 287-295, 2007.