



## TESTES DE GRADIENTE DE TEMPERATURA COM PRIMERS ISSR VISANDO DIFERENCIAÇÃO ENTRE ACESSOS DE MILHO CRIOULO

PHELIPE SOUZA AMORIM, ANA CAROLINA ATAIDE SILVEIRA, LUAN SOUZA DE PAULA GOMES, JEFFERSON JOE MOREIRA ALVES, DEMERSON ARRUDA SANGLARD

### RESUMO

**Introdução:** Dentre os marcadores de DNA baseados em PCR para estudos de diversidade, destaca-se o ISSR (Inter Simple Sequences Repeats), o qual apresenta vantagens como baixo custo relativo, alta reprodutibilidade e dispensa quanto aos conhecimentos prévios dos genomas. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi identificar as temperaturas de anelamento capazes de maximizar polimorfismos entre acessos de milho crioulo, dos quais foram prospectados no Norte de Minas Gerais. **Material e Métodos:** As extrações de DNA seguiram um protocolo CTAB adaptado, utilizando-se folhas maduras de milhos crioulos. Para otimização das ampliações com *primers* ISSR (Coleção UCB, Canada), foram realizados testes de gradientes de temperaturas de anelamentos em termociclador configurado para o espectro de 45°C a 65°C, gerando 12 temperaturas dentro deste intervalo. **Resultados:** As reações seguiram a seguinte programação: uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (45°C a 65°C por 1 min) e extensão (72°C por 2 minutos)]; e uma fase de extensão final de 72°C por 7 min / conservação a 4°C. Utilizou-se DNA's de dois indivíduos escolhidos em uma coleção de 44 acessos, variando-os a cada teste. Na placa de PCR (96 poços), testou-se quatro primers por reação, tendo as linhas como variantes de genótipos e primers; e colunas quanto às diferentes temperaturas. Durante a execução do estudo, foram testados 56 primers ISSR, sendo que 34 deles caracterizam-se como sendo amplamente polimórficos, sob temperaturas de anelamento específicas identificadas nos gradientes: primers UCB 812 e 836 (45°C); 820, 829, 842, 850, 856 e 876 (46°C); 827 e 847 (47°C); 808, 827 e 828 (48°C); 825 e 848 (49°C); 807 (51°C); 849, 866 e 889 (52°C); 830 e 887 (54°C); 867 (55°C); 816, 823, 880 e 888 (56°C); 855 (57°C); 818 e 884 (58°C); 858 (59°C); 865 e 886 (60°C); 864 (62°C). **Conclusão:** A identificação prévia das temperaturas de anelamentos (PCR) que otimizem polimorfismos em uma população sob estudo, mostra-se como uma etapa imprescindível na otimização de tempo e insumos de Biologia Molecular.

**Palavras-chave:** Anelamento, Otimização, PCR, Variação, *Zea mays* L.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os marcadores de DNA mais usados em estudos de diversidade e baseados em PCR, destaca-se o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), o qual apresenta vantagens de facilidade na obtenção de dados, custo relativamente reduzido e aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo, sem a necessidade de conhecimento prévio do seu genoma (NYBOM, 2004). Somado a isso, a técnica de ISSR também possui elevado grau de reprodutibilidade, resultante do comprimento dos primers empregados (16 a 25 pb) e de condições de anelamento mais estridentes (com temperaturas de anelamento entre 45°C e 65 °C (BORÉM; CAIXETA, 2009; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2018).

Para um bom funcionamento e confiabilidade dos marcadores que utilizam o PCR, há necessidade de uma prévia padronização das condições da reação, para que não sejam produzidas ampliações indefinidas e inespecíficas. (HYNDMAN; MITSUHASHI, 2003). Por conseguinte, diversos reagentes e etapas têm que ser padronizados para obtenção de resultados satisfatórios nas reações como, por exemplo, a adequada concentração de  $Mg^{2+}$ , o desenho dos iniciadores, as condições dos ciclos, sendo a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) um dos componentes que requer maior atenção no ajuste (ROUX, 1995).

Neste contexto, se a  $T_a$  for muito alta, os iniciadores anelam-se de maneira deficiente, resultando em baixa produção de DNA amplificado. Contudo, se a  $T_a$  for muito baixa, pode ocorrer anelamento inespecífico dos iniciadores, ocasionando a amplificação de segmentos de DNA indesejáveis. (ROUX, 1995; HYNDMAN; MITSUHASHI, 2003). O objetivo deste trabalho foi identificar as temperaturas de anelamento capazes de maximizar polimorfismos entre acessos de milho crioulo, dos quais foram prospectados no Norte de Minas Gerais.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados testes de gradientes de temperaturas de anelamento, por meio de termocicladores com este recurso (Equipamentos da marca Eppendorf, modelo Nexus Gradient). As máquinas foram configuradas para o espectro de 45°C a 65°C, sendo utilizados os DNA's de 02 (dois) indivíduos aleatórios da população. Amostras de tecidos foliares de 44 variedades crioulas de milho prospectadas no Norte de Minas Gerais foram armazenadas em ultrafreezer (-75°C). Os testes envolveram extrações de DNA por um método adaptado de Doyle e Doyle (1990) (CTAB), visando ampliações via PCR (Polymerase Chain Reaction) (Quadro 1). Foram testados 56 primers ISSR (Inter Simple Sequences Repeats), de escolhas randomizadas, oriundos da coleção UCB (University of British Columbia, Canada). As reações foram programadas em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 min), anelamento (45°C a 65°C / 1 min) e extensão (72°C/2 minutos)]; além de uma fase de extensão final de 72°C por 7 min. Logo após essas ciclagens, o aparelho conservou as reações a 4°C, até a retirada das amostras. Os produtos resultantes das ampliações foram separados por eletroforese horizontal com géis de agarose 1,5% (m/v), imersos em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). No momento da aplicação, foram adicionados, à cada amostra, 3  $\mu$ L do corante tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5  $\mu$ L de GelRed™ (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os géis foram submetidos a uma carga de 120 V, por 3 h. Findadas as eletroforeses, os géis foram analisados por meio de um sistema de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia, modelo L-PIX Sti).

Quadro 1 - Condições de amplificação via PCR (Polymerase Chain Reaction) para primers ISSR, envolvendo genótipos de milhos crioulos. Fonte: Adaptado de Doyle e Doyle 1990.

Reagentes	Concentração de Trabalho	Concentração Final	Volumes por Reação
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	12,4 uL
MgCl <sub>2</sub>	20,0 mM	2,8 Mm	3,5 uL
Tris / KCl pH 8,3	100 mM / 500 mM	10 mM / 50 mM	2,5 uL
d'NTP (A, T, C, G)	2,5 mM (cada)	0,1 mM (cada)	1,0 uL
Primer ISSR	4,0 uM	0,4 uM	2,5 uL
Taq polimerase	1,0 un/uL	1,0 um	0,1 uL
DNA	10 ng/uL	30 ng	3,0 uL
<b>Total</b>			<b>25,0 uL</b>

Todos os procedimentos de manutenção de variedades de milho e análises moleculares foram realizados nas dependências do Laboratório de Biotecnologia, localizado no Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias - CPCA, *Campus* Regional Montes Claros da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as extrações de DNA, procedeu-se os testes para averiguação das concentrações das amostras por espectrofotometria (Quadro 2), o que apontou as diluições para a o preparo dos mix na PCR. Em caráter complementar foi realizada uma corrida eletroforética para averiguação da qualidade do DNA Total extraído (Figura 1). Averiguou-se a inexistência de arrastes, bem como notória nitidez (espessura) das bandas, as quais estão compatíveis com os dados da espectrofotometria (concentrações).

Foram conduzidos ensaios de gradientes de temperaturas de anelamento, como forma de averiguar as capacidades de ampliações com os diferentes primers ISSR disponíveis. As temperaturas do gradiente foram intervaladas entre 45°C e 65°C, conforme recurso de randomização próprio aparelho termociclador. O arranjo para o preparo das placas de PCR possibilitou testar quatro primers ISSR simultaneamente, conforme esquema apresentado na Figura 2. Uma exemplificação prática de análise eletroforética nos testes de gradiente está destacada na Figura 3.

Durante a execução das análises moleculares, foram testados 56 primers ISSR, dos quais 34 apresentaram polimorfismos sob as temperaturas de anelamento específicas identificadas nesse procedimento (Quadro 3). Os marcadores moleculares têm sido utilizados para estabelecer grau de parentesco entre linhagens endogâmicas e para a predição de comportamento híbrido (BORÉM; MIRANDA, 2009; CRUZ *et al.*, 2011). Outros estudos têm sido realizados também para investigar a relação entre a diversidade genética em relação às regiões de origem, para fins de conhecimento de similaridade entre materiais adaptados a diferentes condições ambientais (XIA *et al.*, 2005). Silva *et al.* (2009), estudando 25 genótipos pela técnica microsatélite, identificaram quatro acessos mais distantes dos demais indivíduos e, com isso, foi possível sugerir o cruzamento direcionados, para aproveitamento de efeito heterótico. Em milho comum, cujos programas de melhoramento receberam maior atenção por parte dos pesquisadores, autores demonstraram a eficiência na quantificação da diversidade genética e identificação de

grupos heteróticos (CARVALHO *et al.*, 2002; REIF *et al.*, 2003; VIGOUROX *et al.*, 2005; BARATA; CARENA, 2006).

Quadro 2 - Resultados da quantificação por espectrofotometria (TECAN) de DNA's extraídos de acessos de milho crioulos, prospectados no Norte de Minas Gerais. Fonte: Do autor.

Referência laboratorial	Nome do acesso	Conc. Inicial DNA (ng/uL)	Volume de DNA (uL)*	Volume de TE (uL)*
1	Milho Branco	58,1	52	248
2	Colorido Vinhedo	40,6	74	226
3	Cateto	122,3	15	285
4	Milho Preto	18,9	159	141
5	Almenara 1	199,4	25	275
6	Almenara 2	171,2	18	282
7	Capitão Enéas 1	55,2	55	245
8	Capitão Enéas 2	41,7	72	228
9	Janaúba 1	50,1	60	240
10	Janaúba 2	27,3	110	190
11	Janaúba 3	48,2	63	237
12	Montes Claros 1	37,7	80	220
13	Montes Claros 2	43,2	70	230
14	Montes Claros 3	63,5	48	252
15	Montes Claros 4	21,2	142	158
16	São João do Paraíso 1	50,0	60	240
17	São João do Paraíso 2	46,4	64	236
18	São João do Paraíso 3	39,4	77	223
19	São João do Paraíso 4	36,1	84	216
20	São João do Paraíso 5	44,7	68	232
21	Rio Pardo de Minas 1	166,3	19	281
22	Rio Pardo de Minas 2	83,3	37	263
23	Taiobeiras 1	107,8	28	272
24	Taiobeiras 2	80,4	38	262
25	Asteca	153,8	20	280
26	Branco da Barra	70,8	43	257
27	Sabuco Fino	76,9	40	260
28	Francês Colorido Branco	48,8	62	238
29	Mexicano	98,3	31	269
30	Vinhedo	88,4	34	266
31	Pipoqueiro Espinhudo	61,3	49	251
32	Milho Coruja	44,0	69	231
33	Janaúba 6	50,4	60	240
34	Janaúba 7	77,7	39	241
35	Janaúba 8	76,2	40	260
36	Montes Claros 5	23,5	128	172
37	Montes Claros 6	134,9	23	277
38	Montes Claros 7	37,2	81	219
39	São João do Paraíso 6	33,2	91	209
40	São João do Paraíso 7	72,0	42	258

TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0); \*Volumes em diluições compatíveis à concentração de 10 ng/uL de DNA.

Quadro 2- Continuação.

41	São João do Paraíso 8	125,5	24	276
42	Rio Pardo de Minas 3	48,9	62	238
43	Rio Pardo de Minas 4	90,9	34	266
44	Taiobeiras 3	58,9	51	249

TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0); \*Volumes em diluições compatíveis à concentração de 10 ng/uL de DNA.

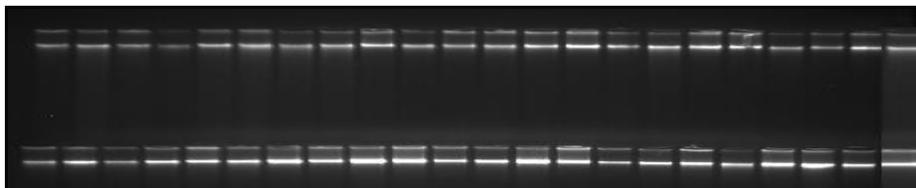


Figura 1 - Teste de qualidade da extração de DNA total envolvendo 44 acessos de milho crioulo, prospectados no Norte de Minas Gerais. Cada uma das amostras (canaletas no gel) continham 10 uL de DNA total, 4 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 4 h. Fonte: Do autor.

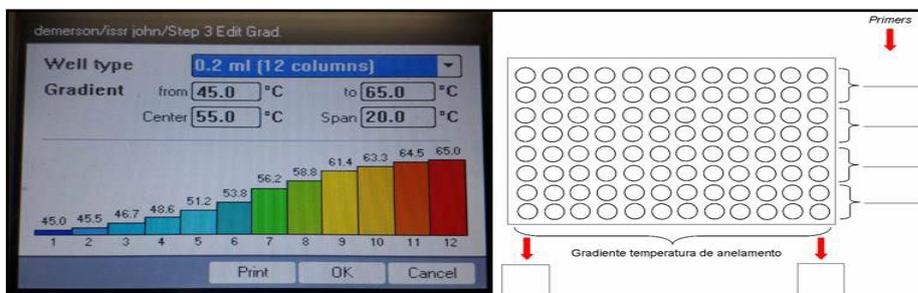


Figura 2 - Interface fornecida pelo aparelho termociclador (Gradient), evidenciando a programação do intervalo em gradiente, quanto às temperaturas de anelamento nas placas de PCR (45°C a 65°C). Fonte: Do autor.

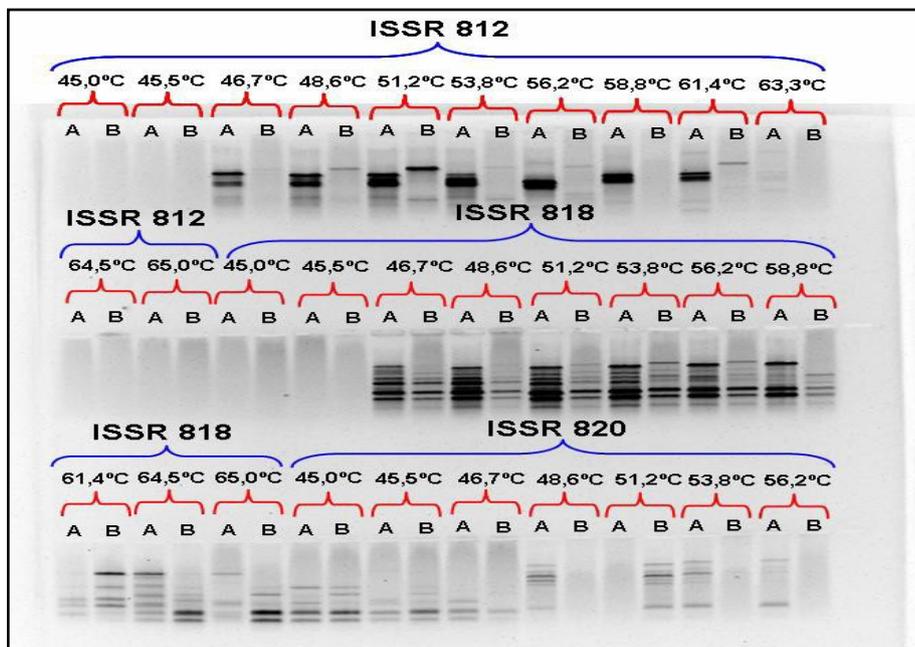


Figura 3 - Exemplificação de corrida eletroforética para testes de gradiente de temperatura de anelamento, envolvendo primers ISSR (45°C a 65°C) e DNA de variedades de milho crioulo. A e B referem-se a genótipos aleatoriamente escolhidos da coleção resgatada. Fonte: Do autor.

Quadro 3 - Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNA genômico de acessos de milhos crioulos, resgatados no âmbito deste trabalho. Fonte: Do autor.

Código do primer (Sequência 5' → 3')	Temperatura de anelamento
ISSR 807 (AGA GAG AGA GAG AGA GT)	51°C
ISSR 808 (AGA GAG AGA GAG AGA GC)	48°C
ISSR 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)	45°C
ISSR 818 (CAC ACA CAC ACA CAC AG)	58°C
ISSR 820 (GTG TGT GTG TGT GTG TC)	46°C
ISSR 823 (TCT CTC TCT CTC TCT CC)	56°C
ISSR 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG)	47°C
ISSR 830 (TGT GTG TGT GTG TGT GG)	54°C
ISSR 842 (GAG AGA GAG AGA GAG AYG)	46°C
ISSR 848 (CAC ACA CAC ACA CAC ARG)	49°C
ISSR 850 (GTG TGT GTG TGT GTG TYC)	46°C
ISSR 856 (ACA CAC ACA CAC ACA CYA)	46°C
ISSR 858 (TGT GTG TGT GTG TGT GRT)	59°C
ISSR 867 (GGC GGC GGC GGC GGC GGC)	55°C
ISSR 876 (GAT AGA TAG ACA GAC A)	46°C
ISSR 884 (HBH AGA GAG AGA GAG AG)	58°C
ISSR 886 (VDV CTC TCT CTC TCT CT)	60°C
ISSR 888 (BDB CAC ACA CAC ACA CA)	56°C
ISSR 828 (TGT GTG TGT GTG TGT GA)	48°C
ISSR 829 (TGT GTG TGT GTG TGT GC)	46°C
ISSR 849 (GTG TGT GTG TGT GTG TYA)	52°C
ISSR 866 (CTC CTC CTC CTC CTC CTC)	52°C
ISSR 810 (GAG AGA GAG AGA GAG AT)	48°C
ISSR 816 (CAC ACA CAC ACA CAC AT)	56°C
ISSR 825 (ACA CAC ACA CAC ACA CT)	49°C
ISSR 836 (AGA GAG AGA GAG AGA GYA)	45°C
ISSR 847 (CAC ACA CAC ACA CAC ARC)	47°C
ISSR 855 (ACA CAC ACA CAC ACA CYT)	57°C
ISSR 864 (ATG ATG ATG ATG ATG ATG)	62°C
ISSR 865 (CCG CCG CCG CCG CCG CCG)	60°C
ISSR 880 (GGA GAG GAG AGG AGA)	56°C
ISSR 887 (DVD TCT CTC TCT CTC TC)	54°C
ISSR 889 (DBD ACA CAC ACA CAC AC)	52°C
ISSR 890 (VHV GTG TGT GTG TGT GT)	46°C

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T).

#### 4 CONCLUSÃO

Os testes de gradiente de temperaturas de anelamentos, executados de forma prévia às investigações sobre a diversidade de acessos milhos crioulos prospectados no Norte de Minas Gerais, foi eficiente na seleção de primers ISSR amplificáveis e polimórficos. Esse procedimento otimiza recursos e esforços nas tarefas de amplificação populacional.

## FINANCIAMENTO

Esse trabalho foi fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, relativo ao projeto "Melhoramento Participativo de Milho com Enfoque na Agrobiodiversidade do Semiárido Mineiro". (FAPEMIG APQ-03554-14), Edital 07/2014 - Apoio a Projetos de Extensão em Interface com a Pesquisa.

## REFERÊNCIAS

BARATA, C.; CARENA, M. Classification of North Dakota maize inbred lines into heterotic groups base on molecular and testcross data. **Euphytica**, v. 151, p. 339-349, 2006.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Org.). **Marcadores Moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV. 2009. 532p.

CARVALHO, V. P.; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; FERREIRA, J. M.; MOREIRA, R. M. P. Assesment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, p. 577-568, 2002.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. 1 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 2011, 620 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

HYNDMAN, D. L.; MITSUHASHI, M. PCR primer design. **Methods in Molecular Biology**, v. 226, p. 81-88, 2003.

NYBOM H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; XIA, X. C.; WARBURTON, M. L.; HOISINGTON, D. A.; VASAL, S. K.; BECK, D.; BOHN, M.; FRISCH, M. Use of SSRs for establishing heterotic groups ins subtropical maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 947-957, 2003.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Genome Research**, v. 4, p. 185-194, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbour Labs. New York. 1989, 815 p.

SILVA, T. A.; PINTO, R. J. B.; SCAPIM, C. A.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; CARVALHO, M. S. N. Genetic divergence in popcorn genotypes using microsatellites in bulk genomic DNA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 31-36, 2009.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C. ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Org.). **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética. 2018. 181 p.

VIGOUROUX, Y.; MITCHELL, S.; MATSUOKA, Y.; HAMBLIN, M.; KRESOVICH, S.; SMITH, J. S. C.; JAQUETH, J.; SMITH, O. S.; DOEBLEY, J. An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. **Genetics**, v. 169, p. 1617-1630, 2005.

XIA, X. C.; REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; FRISH, M.; HOISINGTON, D. A.; BECK, D.; PIXLEY, K.; WARBURTON, M. L. (2005). **Genetic diversity among CIMMITY maize inbred lines investigated with SSR markers: II** Subtropical, Tropical Midaltitude and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and European maize. Crop Science Society.