IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À TEXTURA DO ENDOSPERMA EM MUTANTES INDÍGENAS DE MILHO UTILIZANDO MARCADORES SSR

MAKI, C. S., CARNEIRO, N. P., GUIMARÃES, C. T., LOPES, M. A. e PAIVA E.

Embrapa Milho e Sorgo, Núcleo de Biologia Aplicada, Rod. MG-424, km. 65, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. e-mail: csmaki@hotmail.com

Palavras-chave: milho, dureza do grão, endosperma, zeína, SSR

INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) ocupa lugar de destaque não só devido ao grande progresso que tem havido no acúmulo de conhecimentos científicos relacionados com esta espécie, mas também em razão do grande valor econômico e do potencial que ela representa (Paterniani & Campos, 1999). O milho está disseminado por todo o mundo, sendo considerado um dos cereais mais cultivados atualmente (Byerle & Winkelmann, 1981). Além de sua composição nutricional em termos de vitaminas A e B, cálcio, ferro e fósforo, outro aspecto de importância econômica é a sua transformação industrial, que possibilita a produção de derivados, tais como rações, bebidas e tintas (Watson, 1988). Apesar dos programas de melhoramento estarem mais focalizados no aumento da produtividade de grãos, existe atualmente, um interesse muito grande em melhorias nas qualidades físicas e nutricionais, refletindo no desenvolvimento de grãos mais duros/vítreos e de melhor qualidade protéica (Guimarães, 1997).

A dureza do grão é uma característica de grande interesse pelo fato de estar associada com uma maior resistência ao ataque de pragas e a danos mecânicos (Pomeranz *et al.*, 1984). A vitreosidade e a dureza são termos que referem à textura do grão, embora não designem a mesma propriedade. A vitreosidade está relacionada com a aparência, enquanto a dureza, à sua propriedade física (Shull, 1988).

Mutantes que apresentam endosperma opaco e mole têm sido caracterizados, estando frequentemente associados com elevada qualidade nutricional e baixos níveis de zeínas no endosperma. No entanto, em um trabalho de caracterização de populações de milhos indígenas originados da América do Sul, Guimarães (1994) identificaram milhos que, diferentemente dos mutantes até então caracterizados, apresentavam endosperma opaco, baixa qualidade nutricional e níveis de zeína semelhante aos milhos normais de endosperma vítreo. Dessa forma, iniciou-se um estudo destas populações, visando utilizá-las como ferramenta potencial nas tentativas de elucidação dos fatores que estão associados à determinação do caráter de dureza dos grãos em milho.

Foram utilizados marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*), que são regiões genômicas repetidas em tandem, representadas por pequenas sequências de nucleotídios (de 2 a 6 bp), espalhadas em abundância nos genomas eucariotos (Taramino & Tingey, 1996; Senior *et al.*, 1998). Com esta metodologia, diferentes

alelos podem ser detectados por meio da amplificação por PCR, utilizando *primers* específicos para as sequências de DNA conservadas que flanqueiam os SSR. Várias características interessantes, como sua distribuição ao acaso dentro do genoma, a grande variação alélica e a facilidade prática têm aumentado a utilização dos SSR como marcadores moleculares em plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Para a caracterização do perfil protéico foram utilizadas 11 populações de milho indígena provenientes de diversas regiões do Brasil e da América do Sul, obtidas pelo Banco de Germoplasma da EMBRAPA Milho e Sorgo. Além dos materiais normais HS-201 e
BRS 3150, foram utilizados os genótipos BR-473 (QPM) e 47-duro (Opaco-2) pertencentes ao Germoplasma elite da EMBRAPA Milho e Sorgo. Foi feito inicialmente um cruzamento entre pais contrastantes para a textura do endosperma (o genótipo indígena BOL II de endosperma opaco e níveis normais de zeínas com o genótipo normal HS-201 de endosperma vítreo). Os indivíduos F_2 foram submetidos a três gerações de autofecundação originando as famílias F_4 ou S_3, que foram avaliadas por meio dos marcadores SSR.

SDS-PAGE para Zeínas e Não-zeínas

As frações zeína e não zeína foram analisadas em SDS-PAGE, utilizando-se os genótipos BRS 3150 normal, BR-473 (QPM), 47-duro (Opaco-2), F9P3 (planta F_4 de endosperma vítreo), F40P5 (planta F_4 de endosperma opaco) e os milhos indígenas Poza Rica,
Nodzob Udza, PR I, MT II, MT III, MT10, BOL I, BOL II e Preto Chileno. A comparação dos perfís protéicos foram realizadas com o objetivo de identificar polipeptídeos possivelmente associados com a dureza do grão em milho. As sementes foram moídas, sendo adicionado ao pó tampão borato de sódio para extração das proteínas totais. Após centrifugação a 14.000rpm, o sobrenandante foi coletado, e a este, foi adicionado etanol para separação das frações zeína (sobrenandante) e não–zeína (pellet), por meio de centrifugação. Os géis de SDS-PAGE foram feitos na concentração de 12% (separador) e 6% (empilhador), sendo aplicados 17 μL de não-zeínas e 25 μL de zeínas, submetido a uma voltagem constante de 50V e utilizando o marcador de alto peso molecular (Sigma 6H).

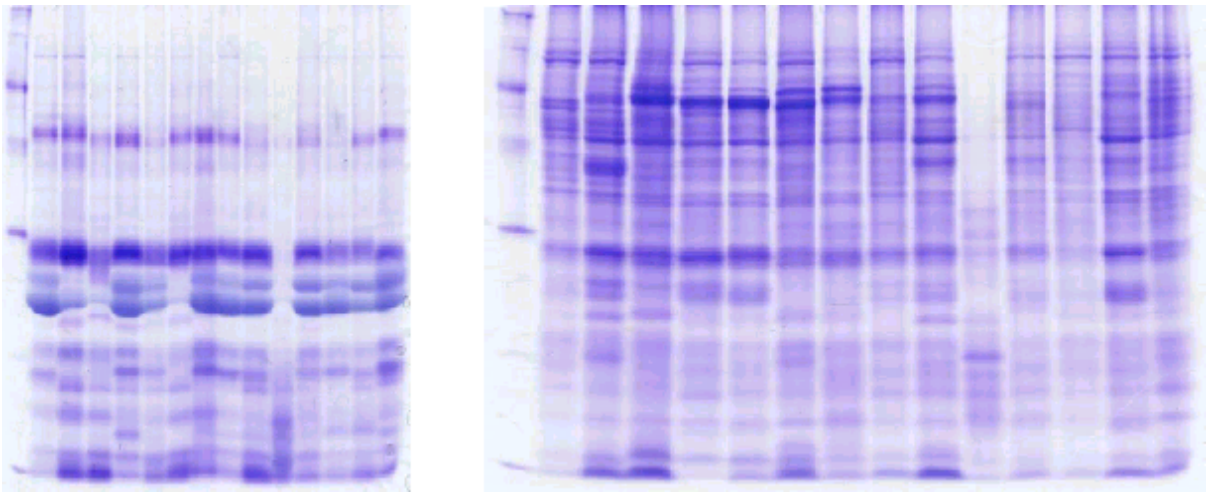
Marcadores Moleculares SSR

Para os testes de SSR, foram utilizadas famílias contrastantes da geração F_4, com o objetivo de detectar regiões genômicas que estejam associadas à dureza/vitreosidade do grão de milho. Os *primers* SSR específicos foram adquiridos da Research Genetics, Inc., cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (http://www.agron.missouri.edu/ssr.htm). As reações de PCR consistiram de 25ng de DNA, 0,6μM de cada *primer*, 100μM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8.6), 50mM KCl,
2mM $MgCl_2$ e 1U da enzima Taq polimerase em um volume total de 10μl. As

amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600 com uma etapa de 95oC/2min, seguida de um ciclo de 94oC/20sec, 68oC/20sec, 72oC/20sec com a redução da temperatura de anelamento de 1oC a cada ciclo por 9 ciclos até atingir 60o C, seguindo por mais 25 ciclos com a temperatura de anelamento de 60oC e uma etapa final de 72oC/5 min. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 4% e visualizados sob luz ultra-violeta em presença de brometo de etídio. As imagens dos géis foram digitalizadas pelo sistema
Eagleeye II (Stratagene, Lajolla, CA) Foram testados 228 *primers* SSR utilizando dois *bulks* contrastantes contendo, um deles, DNA de 9 famílias F_4 com endosperma opaco e o outro, DNA de 5 famílias F_4 com endosperma vítreo. Os *primers* que geraram bandas de interesse entre os *bulks* foram utilizados na amplificação das plantas F_4 separadamente

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão eletroforético das zeínas e não zeínas foi analisado entre os diferentes materiais genéticos (Figura 1). Nos genótipos opaco-2 e QPM, a α-zeína de 22 kD é drasticamente reduzida. Isto ocorre porque a proteína opaco-2, um ativador transcricional que controla a expressão dos genes que codificam principalmente a α -zeína de 22 kD, não é funcional nos mutantes opaco-2 e nos QPMs, com isso, a síntese desses polipeptídeos não é ativada. As α-zeínas de 19kD também têm sua síntese reduzida nos genótipos opaco-2 e QPM, à semelhança das α-zeínas de 22 kD. O padrão e a concentração das zeínas têm sido frequentemente associados à dureza do endosperma, onde a opacidade dos grãos opaco-2 é causada pela redução na síntese das zeínas. Ao contrário do que seria esperado, os genótipos indígenas que apresentam grãos opacos e muito moles, possuem concentrações e padrões normais de zeínas. Pela análise do padrão de zeínas, os indivíduos da população F_4 originados do cruzamento entre milho normal e o indígena, contrastante para a dureza do endosperma, também não apresentam diferenças significativas. Assim, tais resultados sugerem que existem outros fatores influenciando na determinação a textura e a dureza do endosperma, além dos padrões e da concentração das zeínas.



(A)

(B)

Figura 1. Gel de SDS-PAGE 15%. (A) Padrão eletroforético de zeínas e (B) padrão eletroforético de não-zeínas. (M) Marcador de Alto Peso Molecular (1) BRS normal, (2) BR-473 QPM, (3) 47-duro Opaco-2, (4) F4 vítreo, (5) F4 opaco, (6) Poza Rica, (7) Nodzob udza, (8) PR I, (9) MT II, (10) MT III, (11) MT 10, (12) BOL I, (13) BOL II e (14) Preto Chileno. As setas indicam um polipeptídio de aproximadamente 100kD presente apenas nos materiais que possuem endosperma vítreo.

Procurando identificar possíveis polipeptídeos que pudessem estar associados com a textura do endosperma no milho, as frações não-zeínas também foram analisadas. Um polipeptídeo de aproximadamente 100 kD presente apenas nos genótipos que apresentam endosperma duro e vítreo, pode estar associado com diferenças na textura do grão.

A conversão do endosperma opaco em vítreo por genes modificadores, que ocorre nos genótipos QPM (opaco-2 modificados) está atualmente associada a um aumento considerável na síntese da γ-zeína de 27kD. Trabalhos indicam que os níveis aumentados de γ-zeína estejam associados com a vitreosidade do grão. Nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar a alta concentração dessa classe de zeína no genótipo BR-473 QPM quando comparados aos opaco-2, estando de acordo com os resultados descritos por Guimarães (1994). Nos genótipos indígenas os níveis de γ-zeína de 27kD são variáveis, embora sejam semelhantes àqueles encontrados nos milhos normais.

Por meio da análise de *bulks* segregantes utilizando 228 *primers* SSR, foram identificados quatro pares de *primers* que geraram bandas polimórficas entre os *bulks* de plantas com endosperma vítreo e opaco. Tais *primers* foram utilizados par amplificar as famílias F_4 individualmente, demonstrando estarem associados com a característica em estudo (Figura 2). Os quatro pares de *primers* estão mapeados em uma mesma região do braço curto no cromossomo 2, sugerindo que nesta região genômica estejam localizados o(s) gene(s) responsável(is) pelo fenótipo vítreo ou opaco dos grãos. Atualmente estão sendo testadas sondas de RFLP, visando confirmar os resultados obtidos. Além do mapeamento, pretende-se comparar o material dos mutantes indígenas com os genótipos normal, QPM e opaco-2 em vários estágios de desenvolvimento através de microscopia eletrônica dos corpos protéicos.

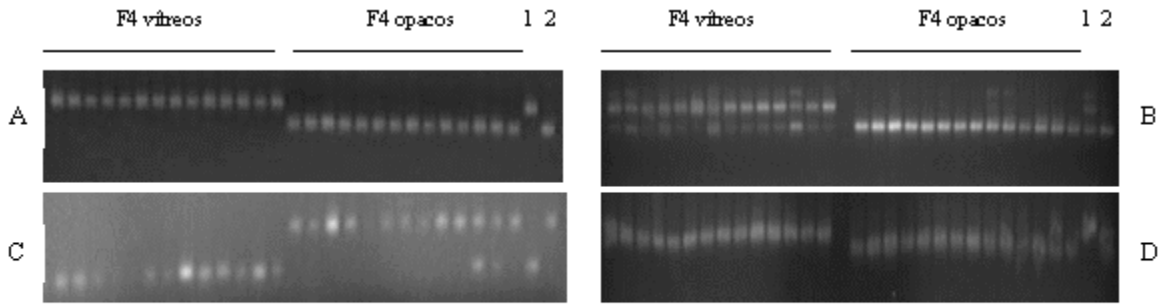


Figura 2. Padrão de polimorfismo dos quatro marcadores SSR [(A) Bnlg 125, (B) Bnlg 381, (C) MAG.T01.D04, (D) Phi 083] que foram capazes de diferenciar as amostras vítreas das opacas na população F4. (1) Bulk de amostras vítreas, (2) Bulk de amostras opacas.

LITERATURA CITADA

BYERLE, D.; WINKELMANN, D. **World Maize Facts and Trends**; report one: An analysis of changes in production, consuption, trade and prices over the last two decades. Mexico: CIMMYT, 1981. 33p.

GUIMARÃES, C. T. **Caracterização de populações indígenas de milho** (*Zea mays* L.) **que apresentam grãos opacos**. Viçosa-MG: UFV, 1994. 69p. Tese Mestrado

GUIMARÃES, V. D. **Fatores que controlam a dureza do endosperma do grão de milho** . Viçosa-MG: UFV, 1997. 67p. Tese Mestrado

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BOREM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Vicosa: UFV, 1999. p.429-485.

POMERANZ, Y.; MARTIN C. R.; TRAYLOR, D. D.; LAI, F. S. Corn hardness determination. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.61, p.147-150, 1984.

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.

SHULL, J. M. **Developmental Study of Hard, Intermediate and Soft Variety of Sorghum** . West Lafayette, USA: Purdue University, 1988. Tese Mestrado

TARAMINO, G., TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Ottawa, v.39, p.277-287, 1996.

WATSON, S.A. Corn marketing, processing and utilization. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. **Corn and Corn Improvment**. Madison, WI: American Society of Agronomy. 1988. p.881-940.