



## UTILIZAÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO DOCE PARA ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO DE DNA

*Rafael Verri Tavore<sup>1</sup>, Ana Daniela Lopes<sup>2</sup>, Sandra Aparecida de Oliveira Collet<sup>3</sup>, Carlos Alberto Scapim<sup>4</sup>*

**RESUMO:** A etapa de extração do DNA genômico para estudos de variabilidade genética através de marcadores moleculares é crucial para a obtenção de resultados consistentes e com repetibilidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de extrair e quantificar o material genético, além de padronizar a metodologia de extração de DNA para diferentes linhagens de milho doce, provenientes de cultivares do mesmo do programa de melhoramento genético da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, para posterior avaliação da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares. Para isto, foram utilizadas porções iguais de tecidos foliares originados de 10 plantas de cada uma das 15 linhagens de milho doce, coletadas cinco semanas após a semeadura, da Fazenda Experimental de Iguatemi. Todo protocolo e toda a metodologia utilizada para a extração do material genético foi descrita por Hoisington et al. (1994). Após os procedimentos de extração, o DNA foi analisado e quantificado em gel de agarose 0,8%. A metodologia de extração de DNA foi adequada, possibilitando a quantificação do genoma e futura avaliação da variabilidade genética através de marcadores moleculares.

**PALAVRAS-CHAVE:** Extração de DNA, milho doce, variabilidade genética.

### 1 INTRODUÇÃO

O milho doce é amplamente explorado em países de clima temperado, mas os cultivares dessa região, quando em condições de clima tropical, apresentam produção baixa e sérios problemas de sanidade de plantas e espigas.

No Brasil, algumas empresas governamentais e particulares vêm desenvolvendo programas de melhoramento para produção de cultivares adaptadas às nossas condições.

O uso de marcadores pode auxiliar o melhoramento de plantas, pois possibilita acessar diretamente o genótipo do indivíduo. Assim entre as principais aplicações de marcadores de DNA em programas de melhoramento de plantas estão: o monitoramento e organização da variabilidade genética, a seleção assistida por marcadores moleculares, e a proteção de cultivares (Lee, 1995).

<sup>1</sup> Acadêmico em nível de Mestrado do curso de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, tverri\_rafael@hotmail.com

<sup>2</sup> Acadêmica em nível de Doutorado do curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, anadani\_bio@hotmail.com

<sup>3</sup> Professora Doutora do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, saocollet@uem.br

<sup>4</sup> Professor Doutor do Curso de Pós Graduação em Agronomia na Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, cascapim@uem.br

Em espécies alógamas, como o milho e girassol, os marcadores podem ainda auxiliar o estabelecimento de grupos heteróticos (Hongtrakul et al., 1997), diminuindo substancialmente o número de cruzamentos testes a serem avaliados e posteriores combinações híbridas.

Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu na extração e quantificação de DNA, além da padronização da metodologia de extração de material genômico de linhagens de milho doce, para posterior avaliação da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

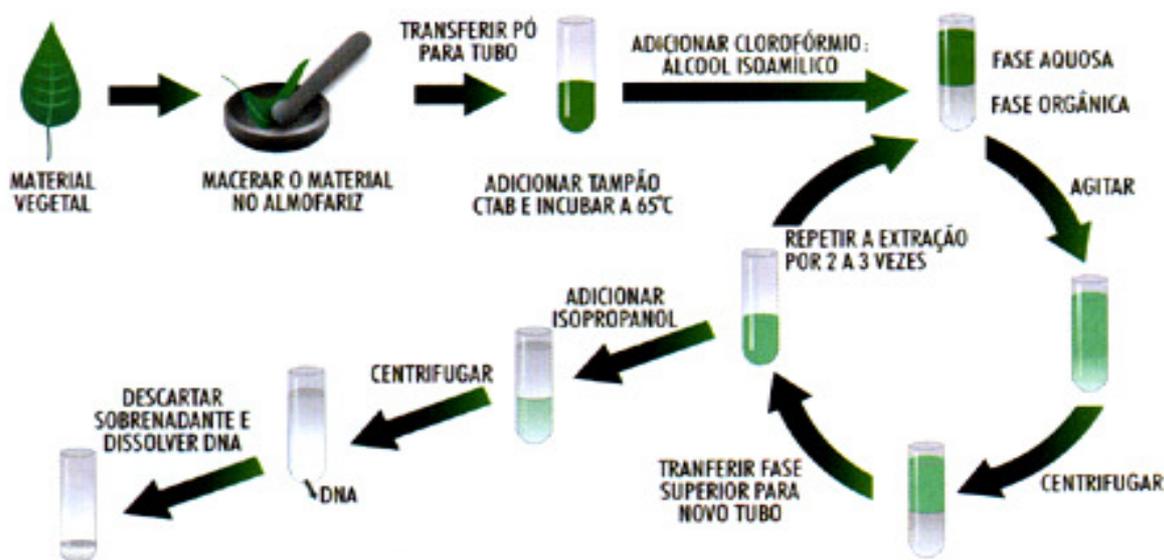
O presente trabalho foi realizado em uma área da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), da Universidade Estadual de Maringá, localizado no distrito de Iguatemi, pertencente à cidade de Maringá – PR.

Os tecidos foliares das 15 linhagens de milho doce foram coletadas após 5 semanas de semeio. Quantidades iguais de tecidos foliares (tiras de aproximadamente 3 a 5 mm de largura) originados de 10 plantas de cada uma das 15 linhagens foram misturadas e pulverizadas com nitrogênio líquido. Após o processo de trituração e maceração, aproximadamente 300 mg do pó obtido foi homogeneizado com 8 ml de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 140 mM  $\beta$ -ME, 1% CTAB) e incubado por 65 °C por 1 hora.

As amostras foram extraídas duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Depois, foram tratadas com RNase, e posteriormente, o DNA foi precipitado com isopropanol, dissolvido em TE (10 mM Tris-HCL pH 8.0 e 1 mM EDTA). Este método de extração de DNA foi descrito por Hoisington et al. (1994).

Após a extração, as amostras foram diluídas para uma concentração final de 2,5 ng/ $\mu$ l com o tampão de diluição (10 mM Tris-HCL pH 8.0 e 0.2 mM EDTA) e a qualidade e quantidade de DNA extraído foram verificadas em gel de agarose 0,8% utilizando tampão TAE (80 V).

Todo o processo descrito acima para a obtenção do material genético (DNA) das linhagens de milho doce pode ser visualizado e exemplificado na Figura 1.



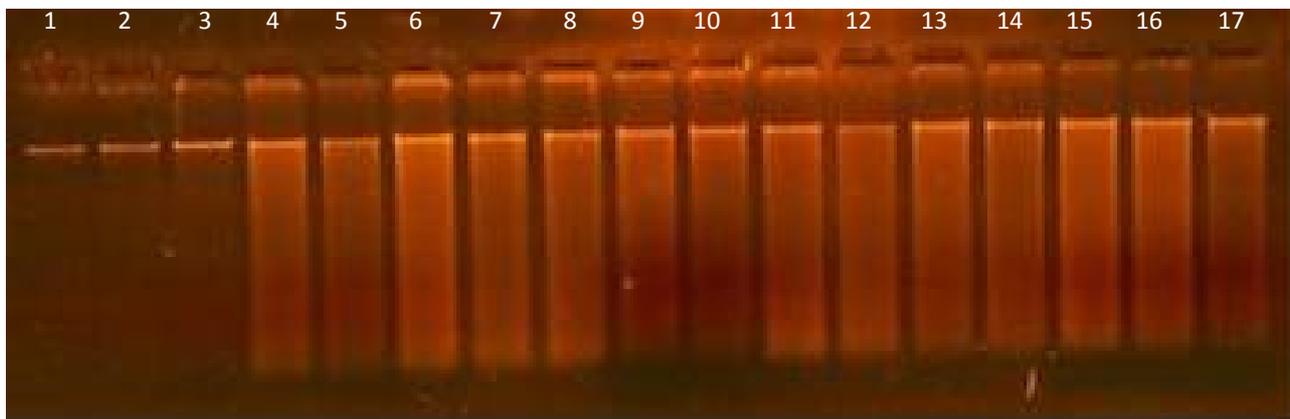
**Figura 1** – Esquema de extração de DNA para estudos de variabilidade genética.

Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados, conforme mostra a Figura 2.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade obtida de DNA em amostras das diferentes linhagens milho doce variou entre 20 a 150 ng/μL (Figura 1).

O método de extração descrito por Hoisington et al. (1994), mostrou-se eficiente, pois as amostras de DNA apresentaram-se livre de impurezas e íntegras, fatores estes importantes para a amplificação utilizando “primers” RAPD ou microssatélites.



**Figura 2** - Gel de quantificação de DNA de amostras de folhas de milho doce, preparado com agarose 0,8%. As amostras 1, 2 e 3 são de DNA  $\lambda$  nas concentrações 50, 100 e 150 ng/μL, e as amostras 4 a 17 são DNA de milho doce.

### 4 CONCLUSÃO

A metodologia de extração de DNA já descrita na literatura foi adequada, possibilitando a padronização do processo;

Por este protocolo de extração de material genético, viu-se que é possível quantificá-lo para uma futura avaliação da variabilidade genética do mesmo, utilizando para isto, marcadores moleculares.

### REFERÊNCIAS

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theor. Appl. Genet.** v. 95, p. 400-407, 1997.

HOSINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE LION, D. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory.** 2nd edn. Mexico DF: CIMMYT. 1994.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy.** v. 55, p. 265-343. 1995.