



SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA LOCOS MICROSSATÉLITES PARA CONSTRUIR UM MAPA DE LIGAÇÃO, E ESTIMAR OS EFEITOS GENÉTICOS DE QTLs ASSOCIADOS COM A RESISTÊNCIA À *CERCOSPORA ZEINA* NA CULTURA DO MILHO PIPOCA (*ZEA MAYS* L.)

Laura Ivana Ramos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Maria de Fátima da Silva Pires Machado (Orientador), e-mail: mfpsmachado@uem.br

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

Área Genética / sub-área Genética Vegetal

Palavras-chave: milho pipoca, microssatélite, cercosporiose

Resumo

O estudo tem como objetivo selecionar *primers* microssatélites polimórficos, que serão utilizados na construção de um mapa de ligação na geração F2 de milho-pipoca e que poderão estar associados a genes que conferem resistência à *Cercospora zeína*. O DNA dos parentais com características contrastantes, resistente e suscetível e o DNA das amostras da geração F1, foram extraídos e amplificados via PCR. Foram testados até o momento 20 *primers* localizados no cromossomo 1 e destes, 4 *primers* (Umc 1331, Umc 1906, Umc 1917, Umc 2047) foram polimórficos e serão empregados na construção do mapa de ligação, após os 400 *primers* de milho comum disponíveis em nosso laboratório serem testados.

Introdução

O milho é um cereal rico em vitaminas e sais minerais, cultivado no mundo todo. Além disso, o interesse no aumento da produção do milho é devido a ele produzir amido, proteína e óleo, essenciais para a alimentação e nutrição de seres humanos e de animais, além de ser matéria prima para a produção de etanol. Entretanto, a cultura do milho é muito afetada por diversas doenças, as quais causam danos significativos no rendimento e na qualidade dos grãos. A cercosporiose (mancha cinza foliar), ocasionada pelo fungo *Cercospora* spp, pode destruir grande parte do tecido foliar (Fornasier Filho, 2007). O





controle da cercosporiose pode ser realizado com a utilização de fungicida ou com o desenvolvimento de híbridos de milho com resistência à doença. Assim, a introgressão de genes de resistência/QTL de doadores para germoplasma elite de milho é uma alternativa viável para desenvolver germoplasmas resistentes. Desse modo, utiliza-se o marcador molecular do tipo microssatélite (análise de *loci SSR*; *Simple Sequence Repeated*) para construir um mapa de ligação para milho-pipoca tropical, e estimar os efeitos genéticos de QTLs associados com caráter resistência à *C. zeina* em milho pipoca. Uma das etapas para construir o mapa de ligação neste projeto, é a seleção dos *primers* de microssatélites para analisar os parentais resistentes e susceptíveis, e os descendentes gerados dos cruzamentos.

Materiais e Métodos

Extração, amplificação de DNA e genotipagem das amostras das diferentes gerações:

Para a extração do DNA genômico foram coletadas duas folhas jovens de plantas parentais (linhagens endogâmicas CML 23 resistente e CML 19 suscetível), F1 e F2 que darão origem às progênes F2:3. Estas folhas coletadas correspondem à aproximadamente 300 mg de tecido vegetal e foram rapidamente congeladas e pulverizadas em nitrogênio líquido; para posteriormente serem incubadas em banho-maria com 65 °C, durante 1 hora com o 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). Após a extração, a quantificação do DNA foi realizada usando o espectrofotômetro PicoDrop (Pico 100). O DNA extraído foi diluído em tampão TE (Tris/HCl 10mM e EDTA 1mM pH8,0) e estocado à 4°C. Os DNAs das plantas F2 e das progênes F2:3 serão amplificados com os pares de *primers* selecionados para microssatélites. Para a escolha desses marcadores polimórficos, 400 microssatélites já mapeados serão testados, procurando adicionar um marcador a cada bin ao longo de cada cromossomo, usando para isso a informação de localização disponível na Maize Genome Database <http://www.maizegdb.org/ssr.php>.

A reação de PCR dos microssatélites foi preparada em 96-well microtiter plates usando um termociclador Techne TC-512. Para cada reação foram utilizados 10 ng de DNA, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1X o tampão que acompanha a enzima (20 mM Tris-HCl pH 8,4); 50 mM KCL, 0,5





μM do *primer* F e R específico, 2,0 mM de MgCl_2 e 0,4 mM de uma mistura de dNTPs em um volume final de reação de 20 μl . Para a amplificação dos microssatélites será utilizado o programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991). O produto da amplificação foi separado em gel de poliacrilamida 10%, com o tampão TBE 0,5 X (Tris/Borato 0,045M e EDTA 0,001M pH 8,3), por 3 horas com 180 V. O gel foi corado em solução de nitrato de prata. Mas este método ainda está em fase de padronização.

Resultados e Discussão

Os parentais, resistente e suscetível, e três amostras F_1 tiveram seus DNA isolados, quantificados e diluídos à concentração de 10 ng/ μl para serem utilizados na reação da PCR. Para o teste de *primers* foram testados até o momento 20 *primers* do cromossomo 1, sendo que apenas 4 foram polimórficos, totalizando 20% de *primers* polimórficos. Os *primers* polimórficos serão utilizados para a construção do mapa de ligação em F_2 , assim que todos os 400 *primers* disponíveis em nosso banco forem testados. O Quadro 1 mostra os *primers* polimórficos selecionados e sua posição em cada cromossomo. A Figura 1 demonstra o padrão polimórfico de um dos *primers* selecionados até o momento, o *primer* Umc1331.

Quadro 1. *Primers* polimórficos selecionados e sua localização no cromossomo 1 (Bin)

Primers / cromossomo 1	Umc 1331	Umc1906	Umc 1917	Umc 2047
Bin	1.11	1.05	1.04	1.09

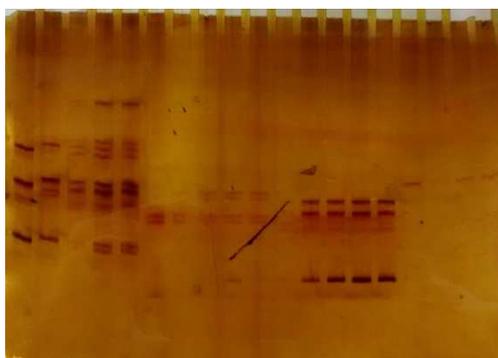


Figura 1. Padrão polimórfico do *primer* Umc1331





Conclusão

Foram testados em milho-pipoca, 20 *primers* microssatélite do cromossomo 1 e apenas 4 foram polimórficos, Umc1331, Umc1906, Umc1917 e Umc2047. O total de *primers* polimórficos selecionados dentre os 400 *primers* disponíveis no laboratório, serão utilizados para a construção do mapa de ligação em F2.

Agradecimentos

Agradeço a UEM pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa concedida

Referências citadas

DON, R.H., COX, P.T., WAINWRIGHT, B.J., BAKER, K. & MATTICK, J.S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 4008, 1991.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 2007. 576p.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p. 1994.

