

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 objetivo no presente estudo foi selecionar *primers* microssatélites polimórficos, que foram utilizados na construção de um mapa de ligação na geração F2 de milho-pipoca, e que podem 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 48 *primers* localizados no cromossomo 1, e destes *primers* 8 (Umc1331, Umc1906, Umc1917, Umc2047, Umc1737, Umc1383, Bnlg1598 e Umc1397) foram polimórficos.

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, utilizamos 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. O objetivo nesse projeto foi selecionar *primers* de microssatélites para analisar os parentais resistentes e susceptíveis, e os

descendentes gerados dos cruzamentos para posterior construção de um mapa de ligação.

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. 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 μ M do *primer* F e R específico, 2,0 mM de MgCl₂ e 0,4 mM de uma mistura de dNTPs em um volume final de reação de 20 μ l. Para a amplificação dos microssatélites foi 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.

Resultados e discussão

Os parentais (resistente e suscetível) e três amostras F₁ tiveram seu DNA isolado, quantificado e diluídos à concentração de 10ng/ μ l para serem utilizados na reação da PCR. Para a seleção de *primers* foram testados 48 *primers* do cromossomo 1, sendo que 8 foram polimórficos, totalizando 16,67% de *primers* polimórficos. O total de *primers* polimórficos serão utilizados para a construção do mapa de ligação em F2, assim que todos os 400 *primers* disponíveis em nosso banco forem testados. A Tabela 1 mostra os *primers* polimórficos selecionados e sua posição no cromossomo. A Figura 1, demonstra o padrão polimórfico de um dos *primers* selecionados, o *primer* Umc1331.

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

Primers / cromossomo 1	Umc1331	Umc1906	Umc1917	Umc2047
Bin	1.11	1.05	1.04	1.09
Primers / cromossomo 1	Umc1737	Umc1383	Bnlgl598	Umc1397
Bin	1.11	1.08	1.06	1.03

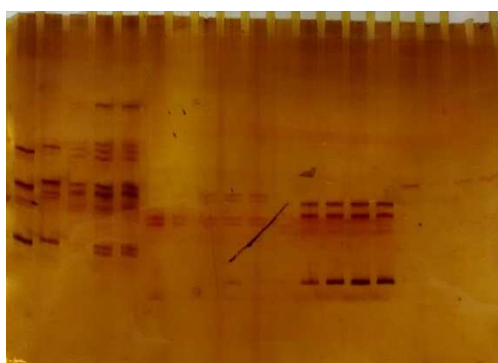


Figura 1. Padrão polimórfico do *primer* Umc1331

Conclusão

Foram testados em milho-pipoca, 48 *primers* microssatélite do cromossomo 1 e 2, sendo que 8 *primers* foram polimórficos, Umc1331, Umc1906, Umc1917, Umc2047, Umc1737, Umc1383, Bnlgl598 e Umc1397 e serão utilizados para a construção do mapa de ligação em F2.

Agradecimentos

Agradeço a UEM pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa concedida

Referências

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.