

Identificação de RGAs e STS Colocalizados com QTL para Resistência ao *Sugarcane Mosaic Virus* em Milho

Ubiraci Gomes de Paula Lana ⁽¹⁾; **Isabella Aparecida Maia Gonçalves** ⁽²⁾; **Isabel Regina Prazeres de Souza** ⁽³⁾

⁽¹⁾ Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Professor do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; Sete Lagoas, Minas Gerais; ubiraci.lana@embrapa.br; ⁽²⁾ Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM; ⁽³⁾ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: O mosaico comum do milho no Brasil tem como agente causal o *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) que pode provocar perdas na produção de até 50%. Com o aperfeiçoamento dos marcadores moleculares, estratégias de mapeamento e sequenciamento do genoma do milho, houve um aumento substancial em informações associadas à resistência ao SCMV em genótipos temperados. Recentemente, um QTL de efeito maior localizado no cromossomo 3 foi detectado em condições tropicais. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar marcadores moleculares baseados em genes análogos de resistência (RGAs) e sítios marcados por sequências (STS) colocalizados com o QTL de efeito maior para a resistência ao mosaico em milho tropical. Foram avaliados polimorfismos em marcadores STS e na sequência parcial de RGAs colocalizados *in silico* com a região genômica associada com a resistência ao SCMV. Quatro marcadores moleculares derivados de RGAs e STS foram identificados e poderão ser potenciais alvos no melhoramento assistido para o desenvolvimento de cultivares de milho tropical resistentes ao SCMV.

Termos de indexação: *Zea mays* L., SCMV, potyvirus.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais mais cultivados no mundo. No Brasil, a sua produção deve alcançar 75,2 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (CONAB, 2014). Entretanto, a cultura do milho está sujeita à ocorrência de várias doenças que podem afetar sua produção, qualidade e valor nutritivo dos grãos.

O mosaico comum é uma das principais viroses incidentes na cultura do milho no Brasil, podendo causar uma redução de até 50% da produção (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Os sintomas caracterizam-se pela presença de pequenas áreas verde-claras entremeadas com áreas verde-escuras, formando uma figura similar a

de um mosaico (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). O *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) foi identificado como agente causal do mosaico em milho no Brasil (MELO, 2000; SOUZA et al., 2012a). A forma mais efetiva de controle da doença consiste no desenvolvimento de cultivares resistentes ao patógeno (FERREIRA et al., 2007).

Com o aperfeiçoamento dos marcadores moleculares e das estratégias de mapeamento, houve um acréscimo significativo em informações genéticas e de QTLs associados à resistência a doenças. O uso de marcadores ligados aos locos de resistência reduz a necessidade de fenotipagem, permitindo a identificação e seleção precoce de plantas resistentes na ausência do patógeno e a piramidação de genes de resistência a diferentes doenças, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento (BOUCHEZ et al., 2002). Estudos identificaram um QTL de efeito maior localizado no cromossomo 3 associado com a resistência ao mosaico comum em milho tropical (SOUZA et al., 2008, 2012b).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar marcadores moleculares baseados em genes análogos de resistência (*Resistance Gene Analogs*, RGAs) e sítios marcados por sequências (*Sequence-Tagged-Site*, STS) co-localizados com o QTL de efeito maior para resistência ao SCMV em milho tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente as posições físicas de marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeat*, SSRs) flanqueadores da região do QTL de efeito maior localizado no cromossomo 3 (SOUZA et al., 2008, 2012b) foram determinadas a partir da consulta em banco de dados público contendo sequências de milho (<http://www.maizegdb.org>). Em seguida, os RGAs co-localizados *in silico* com esta região foram identificados por meio da comparação com uma base de dados contendo 941 RGAs

preditos ao longo de todo o genoma do milho (LANA, 2012).

Posteriormente, os RGAs contendo os maiores valores de identidade, tamanho de sequência e/ou menores valores de E-value foram selecionados para análises de sequências que foram extraídas de bancos de dados públicos (<http://www.phytozome.net/>). Iniciadores foram desenhados com o auxílio do software Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e nomeados com a inicial p mais o nome do RGA. As letras a e b após o nome do RGA foram incluídas quando mais de um par de iniciador foi desenhado para o mesmo gene. Reações de PCR foram preparadas para amplificação de fragmentos genômicos e posterior sequenciamento, visando identificar polimorfismos entre linhagens de milho parentais de populações de mapeamento, L18 e L520 (resistentes ao SCMV) e L19 (susceptível ao SCMV). Tais reações foram preparadas no volume final de 20 µL, consistindo de 30 ng de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 4% (v/v) de DMSO; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,125 mM dNTPs e 10 pmols de cada iniciador. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, x °C por 30 s (dependo da T_m dos iniciadores) e 72 °C por 1 min, seguido por uma elongação final de 72 °C por 5 min, mantendo a reação a 10 °C.

Após o término das reações foram adicionados 4 µl de corante contendo o fluoróforo gel red diluído 100 X. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0) e submetidas a eletroforese a 100 v. O gel foi fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY, USA) sob luz UV. Os fragmentos amplificados foram cortados do gel com o auxílio de um bisturi e purificados com o kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se entre 50 e 100 ng do DNA purificado; 2 µL de Big Dye v3.1; 2 µL do tampão 5X (Life Technologies, Foster City, CA) e 5 pmols do iniciador, num volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a 96 °C por 20 s, 50 °C por 15 s, 60 °C por 4 min, repetidas por 30 vezes. Posteriormente, 40 µL de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 min no escuro e centrifugadas por 20 min a 16000g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000g por 20 min, o sobrenadante removido e as amostras secas em temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspendidas em 10 µL de formamida HiDi (Life Technologies, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 min e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI3100 (Life Technologies, Foster

City, CA). As sequências foram comparadas pelo programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) para identificação das regiões polimórficas. Sítios de restrição nas regiões polimórficas foram identificados com o auxílio do programa público NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Para confirmação, reações de digestão foram realizadas com 15 µl dos produtos de amplificação, 1 µl de enzima de restrição (5 U/µl), de acordo com sítio identificado, e 1,7 µl do tampão 10X. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C durante a noite e a eletroforese foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Amostra de DNA do híbrido F1 resultante do cruzamento entre as linhagens L18 e L19 foi incluída no teste.

Adicionalmente, foram avaliados seis marcadores STS (M5, M8, M9, M11, M12, M13) recentemente associados com QTL de resistência ao SCMV detectado no cromossomo 3 de milho em genótipos temperados (DING et al., 2012). Para isso, as linhagens L18, L19 e L520 foram avaliadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão TAE 1X e submetidas a eletroforese a 100 v. O gel foi corado em solução contendo o gel red diluído 1:3000 por 30 min e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY, USA) sob luz UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 46 RGAs foram identificados na região do QTL de efeito maior para a resistência ao SCMV localizado no cromossomo 3 de milho (SOUZA et al., 2008). Destes, 10 apresentaram alinhamento superior a 660 bases e E-value < e-70 em relação a genes de resistência descritos em plantas, segundo Lana (2012) (**Tabela 1**).

Tabela 1. RGAs colocalizados com QTL de efeito maior associado à resistência ao mosaico em milho tropical.

RGA	% Identidade	Alinhamento (pb)	E-value
865	36,5	1022	E-132
576	37,7	999	E-143
574	39,6	998	E-170
580	36,9	986	E-143
088	32,0	855	E-104
503	30,2	1133	E-115
794	33,6	932	E-116
669	40,4	1045	0
002	29,6	668	E-76
447	35,0	719	E-104

Com base nestes 10 RGAs, 13 pares de iniciadores foram sintetizados visando à amplificação preferencial de regiões intrônicas e não traduzidas (*Untranslated Region*, UTRs). Dos 13 pares de iniciadores, nove geraram produtos únicos: p865, p576, p580a, p580b, p088, p794, p002a, p002b e p447 (**Figura 1**).

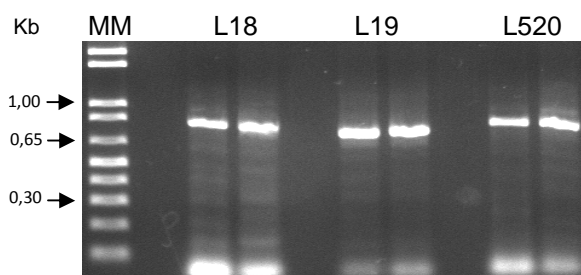


Figura 1. Produtos da reação de PCR utilizando linhagem L19 (suscetível ao SCMV) e L18 e L520 (resistentes ao SCMV) com iniciador p088. MM= Marcador 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Os demais quatro pares de iniciadores geraram múltiplos produtos, indicando inespecificidade, ou ausência de amplificação, provavelmente associada à presença de polimorfismos nas regiões de anelamento.

Após o sequenciamento e comparação das sequências, os produtos obtidos pelos iniciadores p580a, p088, p002a, p002b, p447 apresentaram 2, 3, 156, 22 e 4 SNPs, respectivamente. A análise das regiões polimórficas permitiu a identificação *in silico* de alguns sítios de restrição (**Figura 2**).



Figura 2. Identificação de sítios de restrição em regiões polimórficas de RGAs entre as linhagens de milho L19, L18 e L520. (A) Sequência parcial do RGA 088. O destaque em preto indica o sítio de restrição da enzima Aci I (CCGC). (B) Sequência parcial do RGA 002. O destaque em preto indica o sítio de restrição da enzima Nde I (CATATG).

A digestão do produto de amplificação parcial dos RGAs 002 e 088 dos genótipos de milho avaliados possibilitou a genotipagem das amostras sem a necessidade de sequenciamento, o que reduziu o custo e tempo de análise (**Figura 3**).

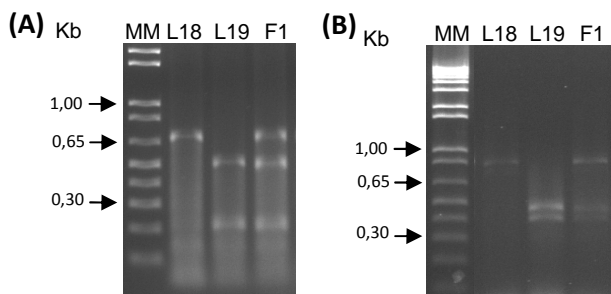


Figura 3. Perfil de digestão dos produtos de amplificação dos RGAs 088 (A) e 002 (B) com as

enzimas Aci I e Nde I, respectivamente. MM = Marcador 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Em relação aos marcadores STS, somente M9 e M12 apresentaram polimorfismos entre os genótipos avaliados (**Figura 4**). Estes marcadores STS foram desenvolvidos por Ding et al. (2012) para mapeamento fino de QTL de resistência ao mosaico comum localizado na região do cromossomo 3 em genótipos temperados de milho.

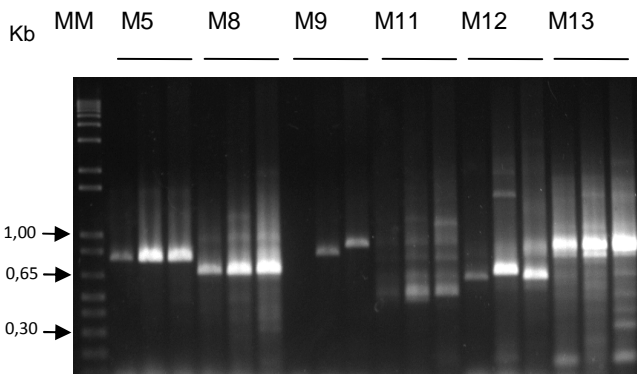


Figura 4. Perfil de amplificação de marcadores STS entre as linhagens L19, L18 e L520, respectivamente. MM = Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Os marcadores RGAs e STS identificados e caracterizados neste trabalho em linhagens tropicais de milho serão mapeados e validados em etapas posteriores. Estas informações poderão ser utilizadas em estratégias de melhoramento assistido por marcadores moleculares para o desenvolvimento de novas cultivares de milho resistentes ao SCMV.

CONCLUSÃO

Foram identificados quatro marcadores moleculares baseados em RGAs e STS associados com a região do QTL de efeito maior para resistência ao SCMV em milho tropical.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Beatriz de Almeida Barros, Célio Ramos das Neves e Marcos de Oliveira Pinto pelo auxílio na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

BOUCHEZ, A.; HOSPITAL, F.; CAUSSE, M.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Marker assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. **Genetics**, Baltimore, n. 162, p. 1945-1959, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira 2013/2014:** levantamento de novembro de 2014. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 maio de 2014.

DENG, C. L.; WANG, W. J.; WANG, Z. Y.; JIANG, X.; CAO, Y.; ZHOU, T.; WANG, F. R.; LI, H. F.; FAN, Z. F. The genomic sequence and biological properties of Pennisetum mosaic virus, a novel monocot-infecting potyvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 921-927, 2008.

DING, J.; LI, H.; WANG, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, X.; CHEN J.; XIA, Z.; WU, J. Fine mapping of Rscmv2, a major gene for resistance to sugarcane mosaic virus in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, p. 1593-1600, 2012.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1997. 80 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 26).

FERREIRA, A. da S.; CASELA, C. R.; FERNANDES, F. T.; PINTO, N. F. J. de A. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/doencasvirus.html>. Acesso em: 12 maio de 2014.

LANA, U. G. P. **Estratégias genético-moleculares visando à detecção do patógeno e à identificação de análogos de genes de**

resistência associados com a mancha branca do milho. 2012. 105 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MELO, P. R. **Estudo da variabilidade e do uso de métodos moleculares na detecção dos vírus do rayado fino e do mosaico comum do milho (*Zea mays* L.)** 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARÃES, C. T.; CHUSTER, I.; OLIVEIRA, E. de; REDINBAUGH, M. Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. **Hereditas**, Lund, v. 145, p. 167-173, 2008.

SOUZA, I. R. P.; GIOLITTI, F.; CARNEIRO, N. P.; LENARDON, S. L.; OLIVEIRA, E.; GOMES, E. A.; NODA, R. W.; SOUZA, F. A. de. Sequence diversity in the coat protein of SCMV infecting maize and sorghum in Brazil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, n. 2, p. 120-135, 2012a.

SOUZA, I. R. P. de; BELICUAS, S. N. J.; GUIMARAES, C. T.; OLIVEIRA, E. de; AZEVEDO, G. C.; MENDES, F. F. Validação de QTLs para resistência à virose mosaico comum em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Diversidade e inovações na era dos transgênicos:** resumos expandidos. Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012b. p.33-39.

