

# Identificação de marcador molecular co-localizado com o QTL de efeito maior associado à resistência ao mosaico comum em milho tropical<sup>1</sup>

Isabella Aparecida Maia Gonçalves<sup>2</sup>, Uiraci Gomes de Paula Lana<sup>3</sup> e Isabel Regina Prazeres de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pela Fapemig

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig

<sup>3</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Professor do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM

<sup>4</sup> Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

## Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo. No Brasil, a sua produção deve alcançar 79 milhões de toneladas na safra 2014/2015 (CONAB, 2015). 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. Seis espécies de potyvirus têm sido identificadas no mundo, causando mosaico em uma variedade de cultura de grãos e gramíneas. No Brasil, o *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) foi identificado como o agente causal do mosaico comum em milho podendo causar uma redução de até 50% da produção (MELO, 2000; SOUZA et al., 2012; FERNANDES e OLIVEIRA, 1997). Os sintomas dessa doença caracterizam-se pela presença nas folhas de pequenas áreas verde-claro, entremeadas com áreas verde-escuro, formando uma figura similar a de um mosaico (FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E., 1997). A forma mais efetiva de controle da doença é por meio do desenvolvimento de cultivares resistentes (FERREIRA et al., 2007).

Com o aperfeiçoamento dos marcadores moleculares e das estratégias de mapeamento, houve um aumento 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 patógenos, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento (Bouchez et al., 2002). Trabalhos recentes desenvolvidos na Embrapa Milho e Sorgo detectaram um QTL de efeito maior no cromossomo 3, explicando 34% da variação fenotípica associada à resistência ao mosaico comum do milho (SOUZA ET AL., 2008). O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores moleculares co-localizados com o QTL de efeito maior para resistência ao SCMV em milho tropical.

## Material e Métodos

As linhagens de milho L18 e L520 (resistentes ao SCMV) e L19 (susceptível ao SCMV) foram avaliadas com seis marcadores STS (M5, M8, M9, M11, M12, M13) associados com QTL de resistência ao SCMV detectado no cromossomo 3 em genótipos de milho temperados (DING et al., 2012). As reações de PCR 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 MgCl<sub>2</sub>; 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 Tm dos iniciadores) e 72 °C por 1 min, seguido por uma alongação final de 72 °C por 5 min, mantendo a reação a 10 °C.

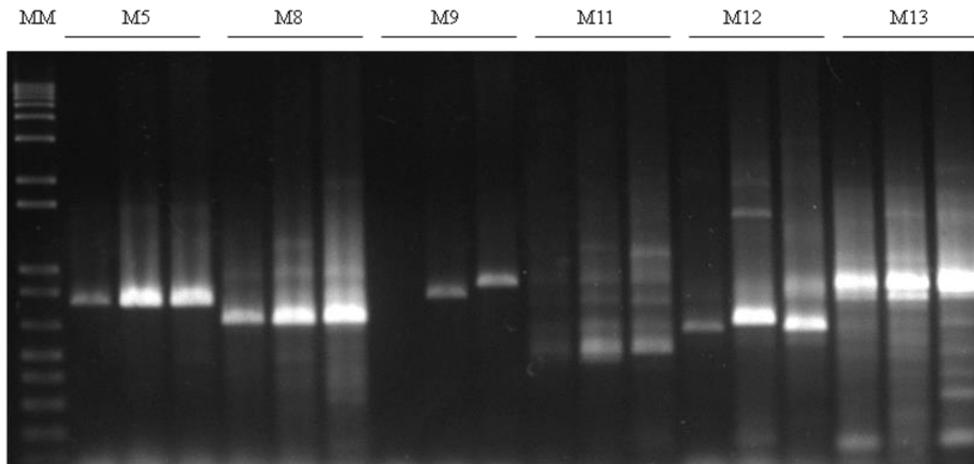
Após o término das reações foram adicionados 4 µl de corante contendo o fluoróforo gel red diluído 100 X. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0) e submetidas a eletroforese a 100 v. O gel foi fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY, USA) sob luz UV. Os fragmentos polimórficos entre as linhagens L18, L19 e L520 foram removidos 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.

A reação de sequenciamento foi preparada 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 nmols 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). 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.

As sequências dos produtos de amplificação dos marcadores polimórficos foram utilizadas para buscas no genoma do milho (<http://blast.gramene.org/Multi/blastview>). Iniciadores foram desenhados com o auxílio do software Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para amplificação de fragmentos genômicos na região dos marcadores polimórficos. As reações foram realizadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente e amostras de DNA do híbrido F1 resultante do cruzamento entre as linhagens L18 e L19, além de alguns indivíduos de uma população F2 derivadas desse cruzamento foram incluídas na análise.

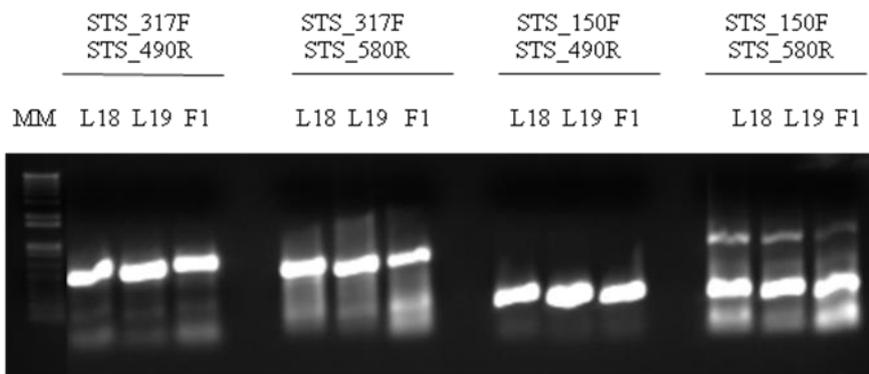
## Resultados e discussão

Um total de seis marcadores STS foram avaliados neste trabalho, dos quais somente M9 e M12 apresentaram polimorfismos (**Figura 1**). Observou-se ausência de amplificação na linhagem L19 com o marcador M9. Já os produtos de amplificação com o marcador M12 apresentaram uma diferença de tamanho muito pequena, dificultando a etapa de mapeamento, principalmente em populações F<sub>2</sub>. Tais marcadores foram desenvolvidos por Ding et al. (2012) para mapeamento fino de QTL de resistência ao mosaico comum localizado no cromossomo 3 em genótipos de milho temperados.



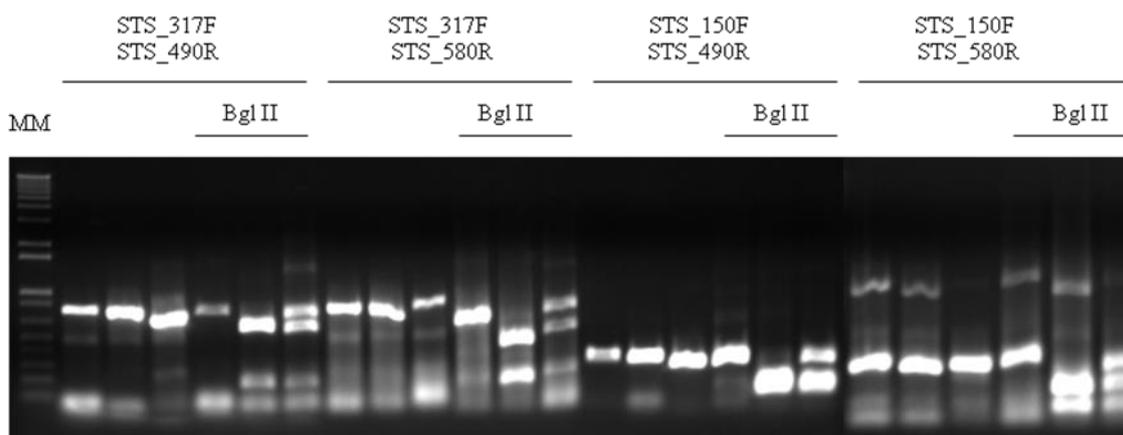
**Figura 1.** Perfil de amplificação de marcadores STS entre as linhagens L19, L18 e L520, respectivamente. MM = Marcador molecular 1 Kb.

Entre os marcadores avaliados, o M12 foi selecionado para análise das sequências entre as linhagens L18 e L19. Alguns SNPs foram identificados, incluindo polimorfismos coincidentes com o sítio de restrição da enzima Bgl II (AGATCT). Posteriormente, quatro pares de iniciadores foram sintetizados na região desse marcador: STS\_317F/STS\_490R, STS\_317F/STS\_580R, STS\_150F/STS\_490R e STS\_150F/STS\_580R. Com exceção da última combinação, os demais iniciadores geraram produtos únicos (**Figura 2**).



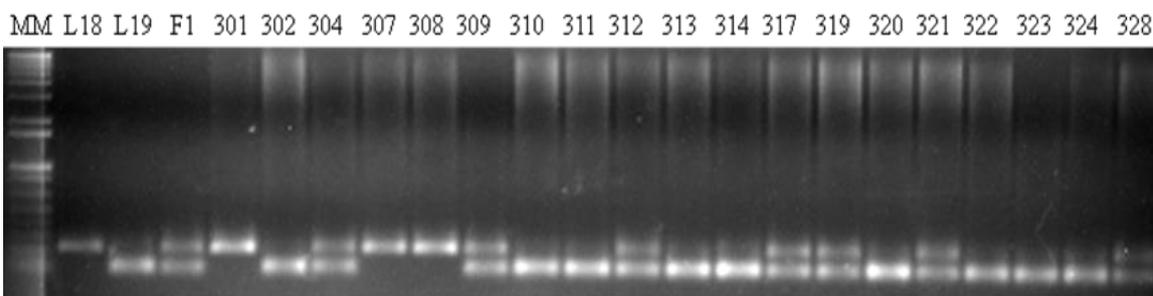
**Figura 2.** Perfil de amplificação dos marcadores entre as linhagens de milho L18, L19 e F1 respectivamente. MM = Marcador Molecular 1Kb.

Os produtos de amplificação dos quatro novos iniciadores foram digeridos com a enzima de restrição Bgl II (**Figura 3**).



**Figura 3.** Perfil de digestão dos produtos dos marcadores entre as linhagens L18, L19 e F1, respectivamente. MM = Marcador Molecular 1Kb.

O produto de amplificação dos iniciadores STS\_150F/STS\_490R apresentou o perfil de digestão mais simples e de fácil avaliação, sendo selecionado para reação de digestão de uma população F<sub>2</sub> derivada do cruzamento das linhagens L18 e L19 (**Figura 4**).



**Figura 4.** Perfil de digestão do marcador STS\_150F/STS\_490R entre alguns indivíduos da população F<sub>2</sub> derivadas das linhagens L18 e L19. MM = Marcador Molecular 1Kb.

Resultados preliminares indicaram que o marcador STS\_150F/STS\_490R está geneticamente localizado no cromossomo 3, mostrando-se co-localizado com o principal QTL de resistência ao mosaico comum (dados não mostrados). Estas informações poderão ser utilizadas em estratégias de melhoramento assistido por marcadores moleculares visando o desenvolvimento de cultivares de milho resistentes ao SCMV

### Conclusão

Identificou-se um marcador molecular co-localizado com o QTL de efeito maior associado à resistência ao mosaico comum em milho tropical.

## Referências bibliográficas

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 2014/2015**: levantamento de janeiro 2015. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 fevereiro de 2015.

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. (EMBRAPACNPMS. 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](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/doencasvirus.html)>. Acesso em: 04 fevereiro de 2015.

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.; 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, 2012.