

## Desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em análogos de genes de resistência associados a QTLs de resistência à mancha-branca-do-milho

Ubiraci G. de P. Lana<sup>1</sup>, Cláudia T. Guimarães<sup>1</sup>, Isabel R. P. de Souza<sup>1</sup> e Silvia N. J. Belicuas<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo - Caixa Postal 285 - Sete Lagoas-MG - ubiraci@cnpms.embrapa.br, claudia@cnpms.embrapa.br, isabel@cnpms.embrapa.br, silvia@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: mancha-branca, resistência, RGAs, *Zea mays*.

### Introdução

A mancha-branca é considerada, no Brasil, uma das principais doenças do milho tanto pelos prejuízos econômicos como pela sua ampla distribuição, sendo relatada em várias áreas tropicais e subtropicais (CARSON, 2001; SILVA, 2002; MOREIRA et al., 2009). Os sintomas apresentam-se na forma de lesões foliares em número variável, circulares a elípticas, e caracterizam-se, no início, por lesões aquosas verde-claro que vão evoluindo para acinzentadas a necróticas (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Geralmente, os sintomas aparecem primeiro nas folhas inferiores, progredindo rapidamente para o ápice da planta (PEGORARO et al., 2002).

Embora a mancha-branca seja de reconhecida importância é recente a atenção à obtenção de informações genéticas quanto à resistência a esta doença. A característica é descrita como quantitativa, sendo a ação gênica aditiva de maior importância na herança do caráter quando comparada à dominante (LIMA et al., 1998; PATERNIANI et al., 1998; CARSON, 2001; PEGORARO et al., 2002; SILVA, 2002). Além disso, a resistência à mancha-branca tem sido relatada como caráter que apresenta alta herdabilidade (LOPES et al., 2007; MOREIRA et al., 2009; PEGORARO et al., 2002; SILVA, 2002).

Marcadores moleculares ligados aos locos de resistência podem reduzir a necessidade de fenotipagem na seleção de plantas resistentes, aumentando a eficiência do programa de melhoramento. Historicamente, o desenvolvimento de cultivares com resistência baseada na presença de um gene de efeito maior tem sido um dos mais importantes métodos para o controle de doenças, embora estratégias mais modernas façam uso de genes de efeito menor em conjunto com aqueles de efeito maior visando estabelecer uma resistência genética mais duradoura (CLAIR, 2010).

A maioria dos genes de resistência de plantas a patógenos apresentam homologia entre si, particularmente em certos domínios conhecidos, tais como as repetições do aminoácido leucina (LRR - *Leucine Rich Repeats*) e os sítios de ligação de nucleotídeos (NBS - *Nucleotide Binding Sites*) (CANNON; YOUNG, 2003). Estes domínios podem estar envolvidos no reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro durante o processo de infecção. A existência de similaridades estruturais entre os genes de resistências possibilitou a identificação de análogos aos genes de resistência em diversas espécies vegetais (MALVAS, 2003). Os análogos de genes de resistência (RGAs) são sequências similares a sequências de genes de resistência, mas que ainda não possuem sua funcionalidade confirmada.

Recentemente, Wang et al. (2007) e Xiao et al. (2007) identificaram e mapearam dezenas de análogos de genes de resistência em populações RILs de milho utilizando análises



*in silico* e mapeamento genético. Esses autores ancoraram vários RGAs a mapas saturados com marcadores microssatélites (SSRs).

Trabalhos recentes desenvolvidos na Embrapa Milho e Sorgo detectaram QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6 e 8, explicando aproximadamente 70% da variação fenotípica utilizando populações F2 derivadas do cruzamento de linhagens contrastantes quanto a resistência à mancha-branca-do-milho.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar marcadores moleculares relacionados a RGAs colocalizados com os principais QTLs envolvidos na resistência à mancha-branca em populações tropicais de milho.

## Material e métodos

Inicialmente foram realizadas buscas por RGAs colocalizados nas regiões dos QTLs de resistência à mancha-branca nas posições 1.06, 2.07, 3.08, 4.06, 4.09-4.10, 6.06, 8.03 e 8.05, que foram previamente identificadas em trabalhos realizados na Embrapa Milho e Sorgo (dados não publicados). Para isso, foram utilizados marcadores SSR como âncora para definir as regiões-alvo entre os mapas de referência publicados por Wang et al. (2007) e Xiao et al. (2007) e o mapa desenvolvido a partir da população tropical na Embrapa Milho e Sorgo. As sequências dos RGAs foram extraídas de bancos de dados públicos contendo sequências de milho, como TIGR database (<http://maize.tigr.org/>), maizegdb (<http://www.maizegdb.org/>) e MAGI (<http://magi.plantgenomics.iastate.edu/>). Com base nessas informações foram desenvolvidos iniciadores para 19 ESTs correspondentes aos RGAs. Tais iniciadores foram construídos com auxílio do software primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Reações de PCR foram preparadas para amplificação de fragmentos genômicos para posterior sequenciamento, visando identificar polimorfismos entre os parentais da população de mapeamento, L31.2.1.2 e L726 (resistente e susceptível, respectivamente). Tais reações foram preparadas em um volume final de 40 µL, consistindo de 60 ng de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,125 mM dNTPs e 20 pmols de cada iniciador. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos, seguido por uma elongação final de 72°C por 5 minutos, mantendo a reação a 4°C.

Ao produto de PCR foram adicionados 5 µL de corante, sendo toda a mistura aplicada em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY, USA). Os fragmentos amplificados foram removidos do gel e purificados com “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, CA) segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram então eluídas em 50 µL de tampão EB (Qiagen, Valencia, CA), liofilizadas em centrífuga a vácuo e ressuspensas em 10 µL de água ultrapura.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se entre 50 e 100 ng do DNA purificado; 2 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 2 µL do tampão 5X (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 5 pmols do iniciador, em um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.



Posteriormente, 40  $\mu$ L de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 minutos no escuro e centrifugadas por 20 minutos a 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100  $\mu$ L de etanol 70% (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 minutos, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10  $\mu$ L de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95°C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As sequências foram avaliadas e comparadas pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI). As identidades dos RGAs foram confirmadas por meio da comparação com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blastx (ALTSCHUL et al., 1997).

Para a busca e identificação de sítios de restrição nas regiões polimórficas foram utilizados programas disponíveis na internet como <http://www.restrictionmapper.org/> e <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>. Para avaliar a eficiência dos marcadores baseados em digestão, os parentais e alguns indivíduos da população de mapeamento foram amplificados e posteriormente digeridos com as respectivas enzimas de restrição. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) em TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) e posteriormente coradas com solução de brometo de etídio (1  $\mu$ g/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY, USA).

## Resultados e discussão

Os iniciadores desenvolvidos para as sequências dos RGAs amplificaram fragmentos entre 0,4 e 1,5 Kb, localizados *in silico* nos bins 1.02-1.06, 2.07-2.08, 3.07-3.08, 4.06-4.07, 4.08, 4.09-4.10, 6.06, 8.02-8.03, 8.05-8.06 e 8.09. Dos 19 RGAs avaliados, 15 foram amplificados, dentre eles, fragmentos maiores do que os tamanhos esperados, possivelmente relacionados à amplificação de regiões intrônicas.

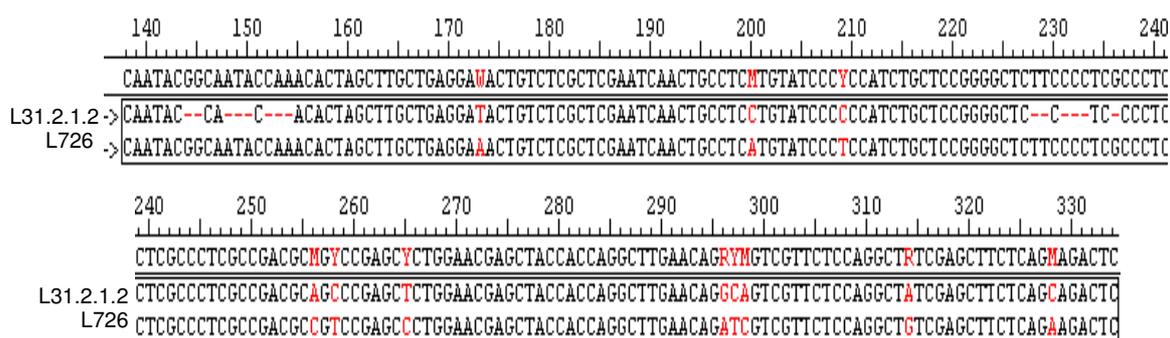
O alinhamento das sequências dos RGAs revelou um reduzido nível de polimorfismos entre as linhagens de milho contrastantes quanto a resistência à mancha-branca. Doze dos quinze genes análogos de resistência não apresentaram variação na sequência de nucleotídeos. No entanto, três RGAs da família Pto mostraram-se polimórficos. A comparação entre os parentais da população de mapeamento para o Pto19 revelou 11 SNPs e 14 indels em um intervalo de 200 pb (Figura 1). Os RGAs identificados como Pto16 e Pto20 apresentaram 2 e 3 SNPs, respectivamente (Figuras 2 e 3). Todos os três RGAs polimórficos foram previamente mapeados *in silico* no cromossomo 4 de milho (bin 4.06-4.10), em regiões colocalizadas com QTLs de resistência a mancha-branca previamente identificados na Embrapa Milho e Sorgo. Além disso, QTLs de resistência a mancha-branca foram encontrados por outros autores nessa mesma região (CARSON et al., 2005; MOREIRA et al., 2009).

Sítios de restrição foram identificados para revelar os polimorfismos encontrados nas sequências do Pto16 e do Pto20. Para o Pto19, sítios de restrição da enzima PvuII (CAGCTG) foram encontrados flanqueando a região contendo indels (dados não mostrados). Para verificar a eficiência dos marcadores baseados em digestão, também conhecidos como CAPs (*cleaved amplified polymorphisms*), alguns indivíduos foram amplificados e digeridos com as respectivas enzimas de restrição (Figura 4). Com a digestão foi possível realizar a genotipagem dos indivíduos de maneira rápida e mais barata que os métodos baseados em sequenciamento de DNA.

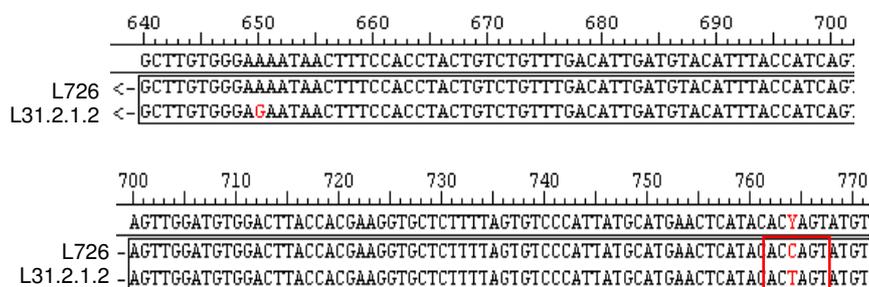


O gene *Pto* confere resistência a *Pseudomonas syringae* pv. em tomate e codifica uma proteína quinase rica em leucina (domínios LRR) e responsável pela fosforização de enzimas envolvidas na reação de defesa da planta (MARTIN et al., 1993). Diversos marcadores moleculares baseados em RGAs ligados a genes de resistência têm sido identificados, incluindo espécies como trigo (CHEN et al., 2006; MAZAHARI et al., 2008; YAN et al., 2003; XIE et al., 2004), cevada (YAN; CHEN, 2006) e milho (WENKAI et al., 2006).

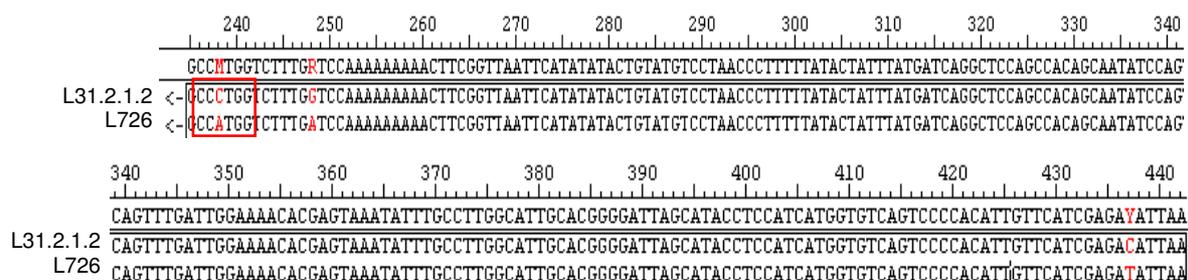
Após avaliação da segregação e confirmação da colocalização com os QTLs, análises de expressão gênica serão realizadas entre os parentais na ausência e presença do patógeno. Além disso, novos marcadores serão desenvolvidos em outras regiões do genoma relacionadas a resistência à mancha-branca do milho. Uma vez validados, os RGAs poderão ser utilizados em programas de seleção assistida para a introgressão da resistência a mancha-branca em cultivares de milho.



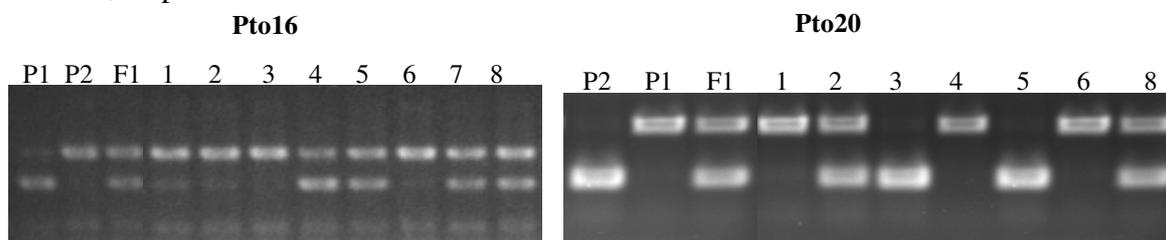
**Figura 1.** Alinhamento das sequências do Pto19 entre os parentais contrastantes quanto a resistência à mancha-branca-do-milho, L31.2.1.2 e L726.



**Figura 2.** Alinhamento das sequências do Pto16 entre os parentais contrastantes quanto a resistência à mancha-branca-do-milho, L31.2.1.2 e L726. A sequência apresentada no quadro em vermelho indica o sítio de restrição da enzima SpeI (ACTAGT).



**Figura 3.** Alinhamento das seqüências do Pto20 entre os parentais contrastantes quanto a manha-branca-do-milho. A seqüência apresentada no quadro em vermelho indica o sítio de restrição da enzima NcoI (CCATGG). L31.2.1.2 e L726 referem-se aos parentais tolerante e suscetível, respectivamente.



**Figura 4.** Perfil de digestão dos marcadores pto16 e pto20 desenvolvidos com base em RGAs. P1 refere-se ao parental L726, P2 ao parental L31.2.1.2. As amostras amplificadas com Pto16 foram digeridas com SpeI e Pto20 com NcoI. Os números de 1 a 8 correspondem a alguns indivíduos da população de mapeamento.

## Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

CANNON, S.; YOUNG, N. Genomic architecture and evolution of NBS-LRRs. In: STACEY, G.; KEEN, N. (Ed.). **Plant-microbe interactions**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2003. p. 81-95.

CARSON, M. L. Inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 7, p. 798-800, 2001.

CARSON, M. L.; STUBER, C. W.; SENIOR, M. L. Quantitative trait loci conditioning resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 571-574, 2005.

CHEN, Y. P.; WANG, H. Z.; CAO, A. Z.; WANG, C. M.; CHEN, P. D. Cloning of a resistance gene analog from wheat and development of a codominant PCR marker for *Pm21*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, p. 715-721, 2006.

CLAIR, D. A. S. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 12.1-12.22, 2010.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 80 p.

LIMA, M.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GALLO, P. B. Cruzamentos parciais entre linhagens de milho com ênfase na produtividade e doenças foliares. In:



CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Anais...** Recife: IPA, 1998. p. 38.

LOPES, M. T. G.; LOPES, R.; BRUNELLI, K. R.; SILVA, H. P.; MATIELLO, R. R.; CAMARGO, L. E. A. Controle genético da resistência a mancha de *Phaeosphaeria* em milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 605-611, 2007.

MALVAS, C. C. **Clonagem e caracterização genética de locos homólogos a genes de resistência em *Brassica oleracea* e *Zea mays***. 2003. 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2003.

MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; EARLE, E. D.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a protein kinase conferring disease resistance in tomato. **Science**, Washington, v. 262, p. 1432-1436, 1993.

MAZAHARI, M.; NAGHAVI, M. R.; GHAFFARI, M. R.; PIRSEYEDI, S. M.; GHAREYAZIE, B.; ABDEMISHANI, S.; MARDI, M. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with the major QTL of fusarium head blight (FHB) resistance, *Qfhs.ndsy-3BS* in wheat. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 6, p.119-123, 2008.

MOREIRA, J. U. V.; BENTO, D. A. V.; SOUZA, A. P.; SOUZA, C. L. QTL mapping for reaction to *Phaeosphaeria* leaf spot in a tropical maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 119, p. 1361-1369, 2009.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; DUARTE, A. P.; GALLO, P. B. Cruzamentos dialélicos entre linhagens de milho com diferentes níveis de resistência a moléstias foliares. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Anais...** Recife: IPA, 1998. p. 98.

PEGORARO, D. G.; BARBOSA NETO, J. F.; DAL SOGLIO, F. K.; VACARO, E.; NUSS, C. N.; CONCEIÇÃO, L. D. H. Herança da resistência à manchafoliar de feosféria em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 3, p. 329-336, mar. 2002.

SILVA, H. P. **Genética da resistência à *Phaeosphaeria maydis* em milho**. 2002. 105 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2002.

YAN, G. P.; CHEN, X. M.; LINE, R. F.; WELLINGS, C. R. Resistance genealog polymorphism markers co-segregating with the YR5 gene for resistance to wheat stripe rust. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 636-643, 2003.

YAN, G. P.; CHEN, X. M. Molecular mapping of a recessive gene for resistance to stripe rust in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, p. 529-537, 2006.



WANG, G. X.; CHEN, Y.; ZHAO, J. R.; LI, L.; KORBAN, S. S.; WANG, F. G.; LI, J. S.; DAI, J. R.; XU, M. L. Mapping of defense response gene homologs and their association with resistance loci in maize. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, p. 1580-1598, 2007.

WENKAI, X.; MINGLIANG, X.; JIUREN, Z. H.; FENGGE, W.; JIANGSHENG, L.; JINGRUI, D. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, p. 63-72, 2006.

XIE, C.; SUN, Q.; NI, Z.; YANG, T.; NEVO, E.; FAHIMA, T. Identification of resistance gene analogue markers closely linked to wheat powdery mildew resistance gene *Pm31*-short communication. **Plant Breeding**, Berlin, v. 124, p. 198-200, 2004.

XIAO, W.; ZHAO, J.; FAN, S.; LI, L.; DAI, J.; XU, M. Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 115, p. 201-508, 2007.

Apoio: FAPEMIG

