

Desenvolvimento de marcadores baseados em RGAs associados com QTL de efeito maior para resistência ao mosaico comum em milho

Isabella Aparecida Maia Gonçalves¹, Ubiraci Gomes de Paula Lana^{2,3} e Isabel Regina Prazeres de Souza⁴

¹ Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq – Embrapa

² Analista da Embrapa Milho e Sorgo,

³ Professor do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM

⁴ Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo, com uma produção de 840 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (FAO, 2012). No Brasil, a produção de milho nesta mesma safra foi de 57,4 milhões de toneladas cultivadas em 13,8 milhões de hectares (CONAB, 2012), consolidando o país como o terceiro produtor mundial, depois dos Estados Unidos e da China. Entretanto, a cultura do milho está sujeita à ocorrência de várias doenças que podem afetar a produção, a qualidade e o 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. Seis espécies de potyvirus têm sido identificadas no mundo, causando sintomas de mosaico em uma variedade de cultura de grãos e gramíneas, incluindo: Sugarcane mosaic virus (SCMV), Sorghum mosaic virus (SrMV), Maize dwarf mosaic virus (MDMV), Johnsongrass mosaic virus (JGMV) (SHUKLA et al., 1994), Zea mosaic virus (ZeMV) (SHEIFERS et al., 2000), and Pennisetum mosaic virus (PenMV) (DENG et al., 2008). Entretanto, o SCMV foi identificado como sendo o vírus responsável pelos sintomas de mosaico em milho no Brasil (MELO, 2000; SOUZA et al., 2012).

Os sintomas dessa doença caracterizam-se pela presença de manchas verde-claro, que contrastam com manchas verdes normais, formando uma figura similar a de um mosaico. Esses sintomas são muito nítidos em plantas jovens e tendem a desaparecer na maturidade (fases de florescimento e maturação) (FERNANDES; OLIVEIRA, 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 acréscimo significativo de 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 desenvolvidos na Embrapa Milho e Sorgo detectaram um QTL de efeito maior no cromossomo 3, explicando aproximadamente 42% da variação fenotípica associada com a resistência ao mosaico comum do milho (SOUZA et al., 2008).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar marcadores moleculares baseados em análogos de genes de resistência (RGAs) colocalizados com o QTL de maior efeito para resistência ao SCMV.

Material e Métodos

Inicialmente, as posições físicas dos marcadores SSR flanqueadores da região do QTL de efeito maior localizado no cromossomo 3 foram determinadas a partir da consulta em banco de dado público de sequências de milho (<http://www.maizegdb.org>). Em seguida, os RGAs colocalizados *in silico* com estas regiões 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).

As sequências de nucleotídeos destes RGAs foram extraídas de bancos de dados públicos contendo sequências de milho, como *maize sequence* (<http://www.maizesequence.org/>) e *phytozome* (<http://www.phytozome.net/>). Posteriormente, os RGAs contendo os maiores valores de identidade, tamanho de sequência e/ou menores valores de E-value foram selecionados para análises de sequência. Para isso, iniciadores foram desenhados com o 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 linhagens parentais das populações de mapeamento, L18 e L520 (resistentes) L19 (susceptível ao SCMV). Tais reações foram preparadas em um 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) 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* (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 s, 50 °C por 15 s, 60 °C por 4 min, repetidos 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 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 min, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 min e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências foram avaliadas e comparadas pelo programa Sequencher 4.1.4 para a identificação das regiões polimórficas.

Posteriormente, sítios de restrição nas regiões polimórficas foram identificados com o auxílio do programa *NEBcutter V2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

Resultados e discussão

Um total de 46 RGAs foi identificado na região do QTL de efeito maior para a resistência ao SCMV. Destes, dez apresentaram alinhamento superior a 660 bases e E-value $< e^{-70}$ segundo Lana (2012), e foram selecionados para construção de iniciadores (**Tabela 1**).

Tabela 1. RGAs colocalizados com QTL de resistência ao SCMV em miho.

RGA	% Identidade	Alinhamento (pb)	E-value
GRMZM2G368865_P01	36,50	1022	8,00E-132
GRMZM2G062576_P01	37,74	999	3,00E-143
GRMZM2G463574_P01	39,58	998	9,00E-170
GRMZM2G463580_P01	36,92	986	2,00E-143
GRMZM2G091088_P01	32,05	855	9,00E-104
GRMZM2G080503_P01	30,19	1133	8,00E-115
GRMZM2G391794_P01	33,58	932	1,00E-116
GRMZM2G456669_P01	40,38	1045	0
AC230011.2_FGP002	29,64	668	2,00E-76
GRMZM2G447447_P01	35,05	719	7,00E-104

Com base nestes dez RGAs, 13 pares de iniciadores foram sintetizados visando a amplificação preferencial de regiões intrônicas e UTRs (**Tabela 2**).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para reações de PCR.

Iniciador	Identificação *	Sequência (5' - 3')
01	G368865_5'_F	TAGTTTGTGTTGGCCAGAGC
02	G368865_5'_R	GCAACGGTGGAGTAGTTGGT
03	G062576_3'_F	TGCTCTCTCATTTTTGGGAAA
04	G062576_3'_R	CCAAGCCTCAACCTTAAGTCA
05	G463574_i_3'_F	AGCCACCAATTGCTCACTG
06	G463574_i_3'_R	AACCAACATAACTTTTCGTTGTC
07	G463580_i1_F	CGATCCTTAGCTTTGGCAAG
08	G463580_i1_R	ATGCTACCAATGGCTTCAGG
09	G463580_i2_F	TGATGCCCTGGACTACCTTC
10	G463580_i2_R	CATTCCACCATAGGCGATCT
11	G091088_i_F	CCAGACTTTCTGCGCTCTTC
12	G091088_i_R	GCCTCACTAGGCGATCTGTC
13	G080503_i_3'_F	CCTACCTCCACCACGACCT
14	G080503_i_3'_R	CGTGTAATCATCGGCACAT
15	G391794_3'_F	AGAAGGTGATGTCCCTGGTG
16	G391794_3'_R	AAGTGAATTGAACGCCAACC
17	G456669_i_3'_F	CGCTGAGGCTCTTGACTACC
18	G456669_i_3'_R	ACGTTCAAGTAGGGGTGGTG
19	AC230011.2_i1e2_F	CCTGTTTCAGCTTGTGAGCA
20	AC230011.2_i1e2_R	AGTGGCTTGTGGCTTCAGTC
21	AC230011.2_i2e3_F	CCACTGAGGCACCAAAGAAT
22	AC230011.2_i2e3_R	AACTTCGTCCCCAAAACCTT
23	AC230011.2_i4e5_F	TGCTTCAGATCAGTGCATCA
24	AC230011.2_i4e5_R	TACATCGCGTAGACCAATCG
25	G447447_3'_F	CTACAGCTTTGGCGTTGTC
26	G447447_3'_R	CCTGAACATGAGCAGCGTTA

*Pares de iniciadores F= forward , R=reverse

Dos 13 pares de iniciadores, nove geraram produtos únicos: 01/02, 03/04, 07/08, 09/10, 11/12, 15/16, 19/20, 21/22 e 25/26 (**Figura 1**).

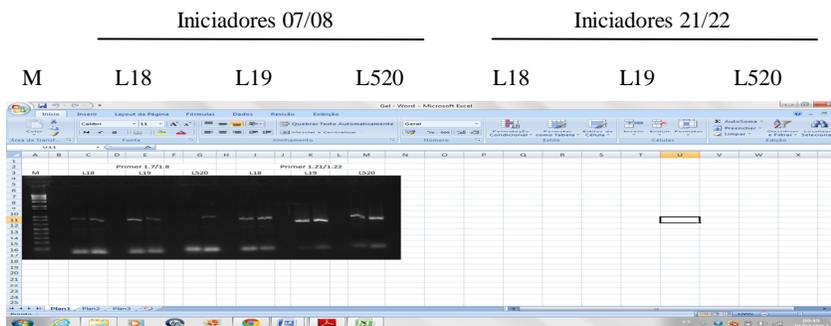


Figura 1. Exemplo de reação de PCR utilizando linhagem L19 (suscetível ao SCMV) e L18 e L520 (resistentes ao SCMV) com pares de iniciadores 07/08 e 21/22. M = Marcador molecular 1 Kb.

Após o sequenciamento e a comparação das sequências dos produtos das reações, cinco conjuntos de iniciadores (07/08, 11/12, 19/20, 21/22, 25/26) revelaram 2, 3, 156, 22 e 4 polimorfismos do tipo SNPs, respectivamente (**Figura 2**).

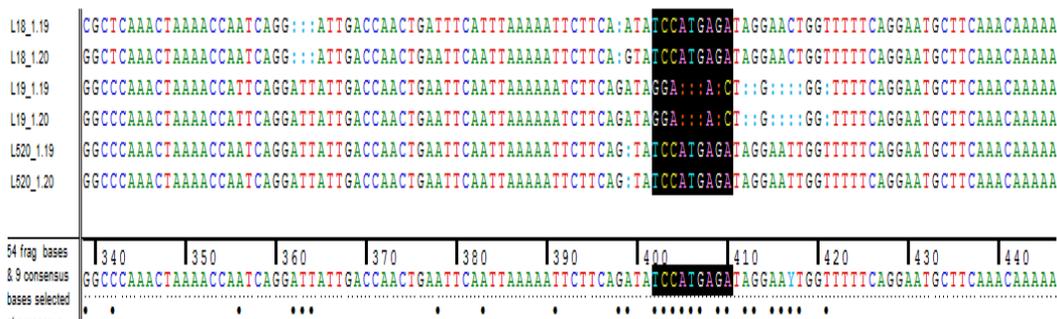


Figura 2. Exemplo de alinhamento da sequência do produto dos iniciadores 19/20 entre as linhagens L19 (suscetível ao SCMV) e L18 e L520 (resistentes ao SCMV). As regiões em destaque mostram diversos polimorfismos.

Sítios de restrição foram identificados *in silico* em algumas regiões polimórficas (**Figura 3**) e estão em fase de validação nas linhagens parentais.

```

L18_1.21 | AATCTATTCITTCCTGTATACCAGCGCTTGGGTATATTAACATCATCCTATCCTTATATAGCTCACCTTTC::ATGTATGT
L18_1.22 | AATCTATTCITTCCTGTATACCAGCGCTTGGGTATATTAACATCATCCTATCCTAATATAGCTCACCTTTC::ATGTATGT
L19_1.21 | AATCTATTCITTCCTGTATACCAGCGCTTCGGTATATTAACATCATCCTATCCTTATATAGCTCACCTTTCATATGTATGT
L19_1.22 | AATCTATTCITTCCTGTATACCAGCGCTTCGGTATATTAACATCATCCTATCCTTATATAGCTCACCTTTCATATGTATGT
L520_1.21 | AATCTATTCITTCCTGTATACCAGCGCTTCCTATATTAACATCATCCTATCCTTATATAGCTCACCTTTCATATGTATGT

```

Figura 3. Alinhamento da sequência 21/22 entre as linhagens L19 (suscetível ao SCMV) e L18 e L520 (resistentes ao SCMV). O destaque em preto na figura indica o sítio de restrição da enzima *NdeI* (CATATG).

Conclusão

Foi possível identificar marcadores moleculares baseados em RGAs associados com a região do QTL de efeito maior para resistência ao SCMV em milho. Esses marcadores serão utilizados em populações de mapeamento segregantes obtidas do cruzamento entre L520 x L19 e L18 x L19 para o estudo de associação destes marcadores com a resistência ao SCMV.

Referências

- BOUCHEZ, A.; HOSPITAL, F.; CAUSSE, M.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Markerassisted 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. **Consolidado e acompanhamento da safra brasileira 2011/2012, levantamento de agosto de 2012**. Brasília, 2012. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 22 mar. 2013.
- 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.
- FAO. **Statistical Database**. 2010. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 22 mar. 2013.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1997.
- 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.htm>. Acesso em: 25 mar. 2013.

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.

SHEIFERS, D. L.; SALOMON, R.; MARIE-JEANNE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y. M.; STANDING, K. G. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 505-513, 2000.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

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, 2012.