

Expressão Temporal de Genes Candidatos Associados com a Resistência ao Mosaico Comum do Milho

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

⁽¹⁾ Analista; Embrapa Milho e Sorgo; Professor; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; Sete Lagoas, MG; ubiraci_lana@embrapa.br; ⁽²⁾ Pesquisadora; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM.

RESUMO: O mosaico comum do milho, principal virose da cultura no Brasil, tem como agente causal o *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV), cuja incidência pode reduzir em até 50% a produção. O método mais eficiente de controle da doença consiste na utilização de cultivares resistentes. Recentemente, um QTL de efeito maior localizado no cromossomo 3 do genoma do milho foi detectado em uma linhagem tropical. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão temporal de genes candidatos co-localizados com o principal QTL associado à resistência ao mosaico em linhagens tropicais. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com genótipos contrastantes quanto à resistência ao SCMV. Amostras foliares foram coletadas entre zero e nove dias após inoculação na presença e ausência do vírus e o perfil de expressão de quatro genes candidatos foi avaliado por PCR em tempo real. Os maiores níveis de expressão foram observados aos 9 dias após a inoculação. Os genes GC_04 e GC_43 foram induzidos pelo vírus na linhagem L18, resistente ao SCMV, em todos os tempos avaliados. Já o gene GC_37 apresentou indução após uma hora e 9 dias da inoculação, tanto na linhagem resistente quanto na suscetível ao mosaico. O candidato GC_02 apresentou nível de expressão muito superior na linhagem resistente, em torno de 1.500 vezes em relação à suscetível. O padrão de expressão do candidato GC_02 o torna um potencial candidato associado à resistência ao vírus. Entretanto, novos estudos estão sendo realizados visando sua validação como gene de resistência ao SCMV.

Termos de indexação: SCMV, *Zea mays* L., Expressão gênica.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o mosaico comum é considerada como uma das principais viroses incidentes na cultura do milho, tendo como agente causal o potyvirus *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) (GONÇALVES et al., 2011; SOUZA et al., 2012a). O

emprego de genótipos susceptíveis e a presença de espécies hospedeiras têm contribuído para maior incidência da doença, podendo reduzir a produção do milho em até 50% (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). O método mais eficiente de controle dessa doença consiste no desenvolvimento de cultivares resistentes. Assim, a identificação de genes conferindo resistência ao mosaico comum é de suma importância para um programa de melhoramento de milho. Estudos sobre a resistência ao SCMV têm sido conduzidos com germoplasma de milho dos Estados Unidos, da China e da Europa (LOUIE et al., 1991; ZHANG-YING et al., 2008; UZAROWSKA et al., 2009; DING et al., 2012). Entretanto, informações envolvendo a base genética da resistência ao SCMV em germoplasma tropical de milho ainda são escassas. Recentemente, foi identificado um QTL de efeito maior localizado no cromossomo 3 associado à resistência ao mosaico comum do milho (SOUZA et al., 2012b).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão temporal de genes candidatos colocalizados com o principal QTL de resistência ao mosaico comum em linhagens de milho tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação viral em linhagens contrastantes quanto a resistência ao mosaico comum do milho

A experimentação foi conduzida em casa de vegetação em condições controladas de temperatura máxima diurna de 28 °C e mínima de 16 °C. As linhagens de milho L18 e L19, resistente e susceptível ao mosaico, respectivamente, foram cultivadas em vasos de 18 L e a inoculação com o vírus SCMV foi realizada na mais nova folha totalmente expandida de cinco plantas, quando as plântulas apresentavam de 3 a 4 folhas. O inóculo foi preparado pela maceração de folhas de milho com sintomas da doença em tampão fosfato 0,01M, pH 7,4, na proporção de 1:3 (peso/volume). O inóculo foi friccionado na folha com o auxílio de

carborudum 600 mesh e lavada em seguida com água. Como controle, os genótipos foram também submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente sem a presença do SCMV. Um disco de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foi coletado da folha de cada planta nos tempos de 0 h (antes da inoculação), 1 h, 24 h e 9 dias após a inoculação com ou sem SCMV. As amostras das cinco plantas de cada genótipo foram coletadas conjuntamente em microtubos de 1,5 mL, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. As plantas foram avaliadas fenotipicamente aos 15 dias após a inoculação, considerando-se a presença ou a ausência dos sintomas de mosaico.

Seleção de genes candidatos

Para a análise de expressão foram selecionados quatro genes candidatos (GC) co-localizados com o QTL de efeito maior associado à resistência ao mosaico, localizado no cromossomo 3 de milho (SOUZA et al., 2008, 2012b). O GC_04 foi identificado em genótipos temperados (Gene Bank CD993775.1) e descrito por Ding et al. (2012). Os candidatos GC_02, GC_37 e GC_43 foram geneticamente mapeados em uma população F_{2:3} derivada do cruzamento entre as linhagens de milho tropical L18 e L19, contrastantes quanto a resistência ao mosaico.

Extração de RNA e análise de expressão gênica

O RNA total foi isolado do tecido foliar de cinco plantas dos genótipos L18 (resistente) e L19 (susceptível ao SCMV) coletadas nos tempos de 0 h, 1 h, 24 h e 9 dias após a fricção, com ou sem inóculo. Para isso foi utilizado o kit "RNeasy Plant Mini", incluindo tratamento com DNase I, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, Germany). A síntese de cDNA foi realizada com 1 µg do RNA total, utilizando o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription", de acordo com as recomendações do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, USA). O PCR quantitativo foi realizado no equipamento ABI 7500 FAST utilizando o kit "Sybr Green Fast" e o gene 18S rRNA como controle endógeno (SOUSA et al., 2012). Os primers foram desenhados com o software Primer Express (Life Technologies, Carlsbad, USA) e a expressão relativa calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todas as reações foram realizadas em triplicatas e a expressão gênica da linhagem sensível L19 no tempo de 0 h, isto é, sem inoculação, foi utilizada como amostra calibradora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão temporal de quatro genes candidatos colocalizados com regiões genômicas

associadas à resistência ao SCMV foi avaliada em condições de casa de vegetação. Amostras foliares foram coletadas entre 0 e 9 dias após inoculação com ou sem o vírus. Somente as plantas da linhagem suscetível (L19) inoculadas com o SCMV apresentaram sintomas de mosaico após 15 dias, confirmando a eficiência da inoculação (Figura 1).



Fonte: Célio Ramos

Figura 1. Linhagem de milho suscetível, L19, apresentando os sintomas típicos de mosaico.

As análises de expressão demonstraram elevada especificidade, uma vez que todos os genes apresentaram curva de dissociação compatível com a amplificação de fragmentos únicos. Os maiores níveis de expressão foram observados aos 9 dias após a inoculação para os quatro genes (Figura 2). Os genes GC_04 e GC_43 foram induzidos pelo vírus na linhagem L18, resistente ao mosaico, em todos os tempos avaliados. Já o gene GC_37 apresentou indução após 1 h e 9 dias da inoculação, tanto na linhagem resistente quanto na suscetível ao mosaico. O candidato GC_02 apresentou níveis elevados de expressão na linhagem resistente, em torno de 1.500 vezes superior ao observado na linhagem suscetível. Entretanto, a expressão elevada foi verificada tanto na ausência como na presença do patógeno. Diferentes autores têm demonstrado que muitos genes de resistência são diferencialmente expressos (MEYER et al., 2009), embora genes com expressão constitutiva também tenham sido caracterizados (THURAU et al., 2003).

O gene GC_04 codifica uma proteína de ligação a auxina (Gene Bank CD993775.1) descrito por Ding et al. (2012) como um dos genes candidatos colocalizados com QTL de resistência ao SCMV no cromossomo 3 em genótipos de milho temperados. Estudos baseados em interações planta-patógeno têm relatado o papel da auxina na patogênese e na defesa da planta (CHEN et al.; 2007; FU; WANG, 2011). Os genes GC_02, GC_37 e GC_43 estão co-localizados com o QTL de efeito maior no cromossomo 3 em milho tropical (SOUZA et al., 2012b) e apresentam SNPs entre os parentais L18 e L19. Esses genes apresentam ainda domínios

típicos de genes de resistência que têm sido associados com o reconhecimento do patógeno e com a ativação de respostas de resistência na planta (HAMMOND-KOSACK; PARKER, 2003).

CONCLUSÕES

O elevado nível de expressão do gene GC_002 apenas no genótipo resistente o torna um potencial candidato associado à resistência ao mosaico comum. Entretanto, novos estudos estão sendo realizados visando sua validação como gene de resistência ao SCMV.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da Embrapa e Fapemig e ao Célio Ramos das Neves pela excelente condução dos experimentos em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- CHEN, Z.; AGNEW, J. L.; COHEN, J. D.; HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J.; KUNKEL, B. N. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 20131-20136, 2007.
- 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. il. (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 26).
- FU, J.; WANG, S. Insights into auxin signaling in plant-pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 1-7, 2011.
- GONÇALVES, M.; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de Sugarcane mosaic virus, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 362-369, 2011.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 177-193, 2003.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOUIE, R.; FINDLEY, W. R.; KNOKE, J. K.; MCMULLEN, M. D. Genetic basis of resistance in maize to five maize dwarf mosaic virus strains. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 14-18, 1991.
- MEYER, J. D. F.; SILVA, D. C.; YANG, C.; PEDLEY, K. F.; ZHANG, C.; MORTEL, M. van de; HILL, J. H.; SHOEMAKER, R. C.; ABDELNOOR, R. V.; WHITHAM, S. A.; GRAHAM, M. A. Identification and analyses of candidate genes for Rpp4-mediated resistance to Asian soybean rust in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, p. 295-307, 2009.
- SOUSA, S. M.; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA A. C.; VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES C. T.; MAGALHÃES J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, Victoria, 2012. doi: 10.1071/FP12022.
- 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.; 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.
- 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.
- THURAU, T.; KIFLE, S.; JUNG, C.; CAI, D. The promoter of the nematode resistance gene Hs1pr8_1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 643-660, 2003.
- UZAROWSKA, A.; DIONISIO, G.; SARHOLZ, B.; PIEPHO, H.-P.; XU, M.; INGVARSDEN, C.; WENZEL, G.; LÜBBERSTEDT, T. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea*



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"

mays L.) by expression profiling. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 1-15, 2009.

ZHANG-YING, X.; SHU-HONG, Z.; XIN-HAI1, L.;
CHUAN-XIA, X.; MING-SHUN, L.; ZHUAN-FANG,
H.; DE-GUI, Z.; YE-HONG, L.; LI, B.; SHI-UANG, Z.

Identification and mapping of a novel sugarcane mosaic virus resistance gene in maize. **Acta Agronomica Sinica**, v. 34, n. 9, p. 1494-1499, 2008.

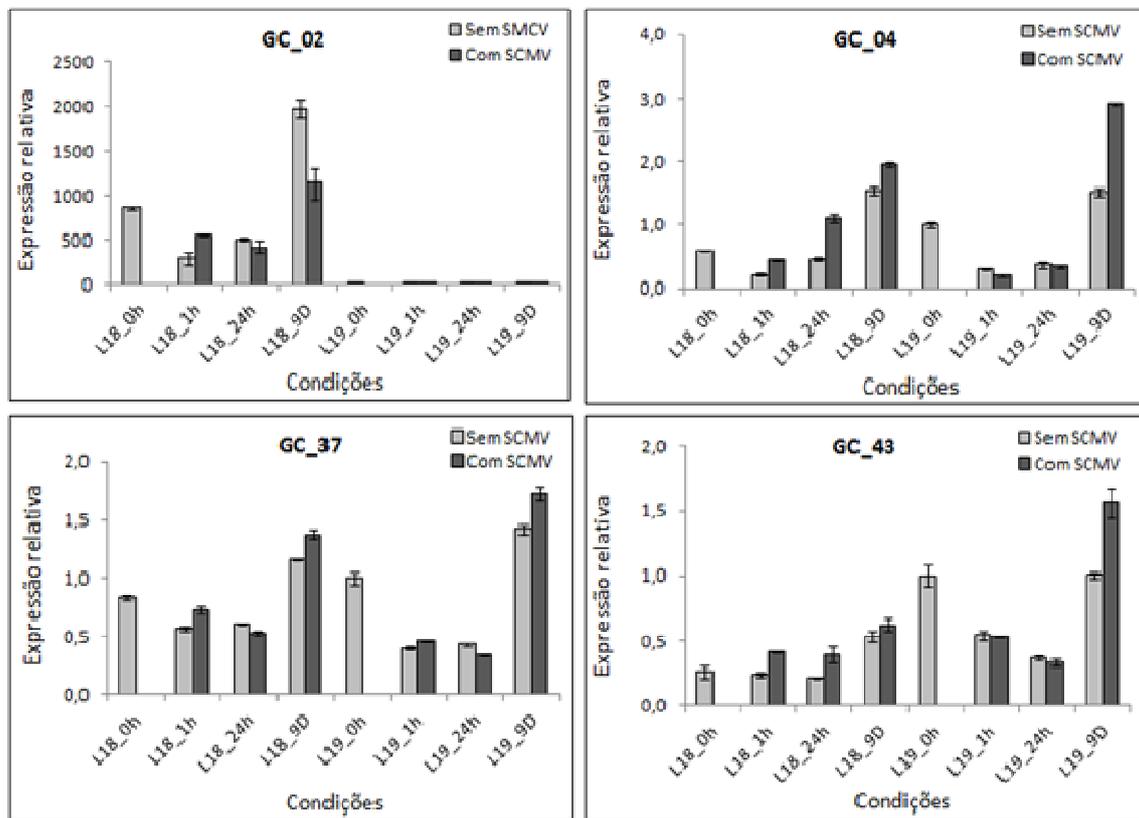


Figura 2. Padrão temporal de expressão de quatro genes candidatos colocados com regiões genômicas associadas à resistência ao mosaico comum do milho.