

AValiação DA RESISTÊNCIA AO MOSAICO COMUM EM MILHO EM FUNÇÃO DO TEMPO APÓS A INOCULAÇÃO

Sílvia Neto Jardim Belicuas¹, Isabel Regina Prazeres de Souza², Claudia Teixeira Guimarães³, Elizabeth de Oliveira Sabato⁴ e Ubiraci Gomes de Paula Lana⁵

Resumo

Uma das doenças mais severas que acometem o milho é o mosaico comum, causado pelo potyvirus *SCMV*. Assim como o tempo necessário para o desenvolvimento do vírus no hospedeiro varia e pode ser vírus e/ou hospedeiro dependente, a manifestação resistência também parece variar em função de alguns fatores. Neste trabalho foi investigada a relação entre o tempo de inoculação com o patógeno e o tempo da expressão de QTL de resistência a esta doença. Verificou-se na população estudada que os QTL identificados se expressam em todo o período de infecção do hospedeiro, entretanto isto ocorre com intensidade variável, o que deve ser levado em consideração em um programa de seleção assistida por marcadores, por exemplo. Estudos futuros são necessários para desvendar os mecanismos da resistência de milho ao vírus do mosaico em função do tempo após a inoculação pelo patógeno.

Introdução

O mosaico é uma das doenças mais devastadoras em milho e vem causando perdas significativas de produção em todo o mundo nos últimos anos. Os sintomas da doença incluem a presença nas folhas de manchas verde claro com áreas verde escuro configurando um aspecto de mosaico, e as plantas doentes são, normalmente, menores em altura e em tamanho de espigas e de grãos (CASELA *et al.*, 2006). A doença é causada pelo potyvirus *Sugar Cane Mosaic Virus* (SCMV) e devido à transmissão não persistente por afídeos, o seu controle por meios químicos é ineficiente, sendo o uso de cultivares resistentes a estratégia mais apropriada para o seu manejo. A herança da resistência ao mosaico comum em milho é descrita pela maioria dos estudos como uma característica quantitativa controlada por poucos genes. O ciclo viral, após a inoculação realizada pelos insetos vetores, envolve a desmontagem do vírus, a replicação do RNA e a formação de novas partículas virais. O tempo necessário para cada uma das etapas do ciclo viral pode variar, e pode ser vírus e/ou hospedeiro dependente. Uma vez que o desenvolvimento dos sintomas da doença e da manifestação da resistência é resultado da interação entre moléculas do vírus e da planta hospedeira, o tempo necessário para que estes se manifestem também pode variar. Neste trabalho, a expressão dos QTL de resistência ao mosaico comum em milho foi avaliada ao longo do tempo após a inoculação artificial em uma população F_{2,3}.

¹ Primeira Autora é Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km65, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970. E-mail: silvia@embrapa.br

² Segunda Autora é Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km65, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970. E-mail: isabel@embrapa.br

³ Terceira Autora é Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km65, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970. E-mail: claudia@embrapa.br

⁴ Quarta Autora é Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km65, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970. E-mail: beth@embrapa.br

⁵ Quinto Autor é Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km65, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970. E-mail: ubiraci@embrapa.br

Material e Métodos

Material Genético

Uma população com 122 progênies $F_{2,3}$ segregando para a resistência ao mosaico foi obtida pelo cruzamento entre as linhagens L18 (resistente) e L19 (susceptível) do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

Avaliação Fenotípica Temporal

A avaliação da resistência ao mosaico foi realizada por meio de inoculação artificial na Estação Experimental da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG em junho de 2008. Quinze plantas de cada família $F_{2,3}$ L18 x L19, além dos parentais e do híbrido F_1 foram avaliadas em blocos casualizados, com duas repetições. O inóculo foi preparado pela maceração de folhas de cultivares susceptíveis previamente inoculados com SCMV e apresentando sintomas marcantes em presença de 10 mM tampão fosfato pH 7.0 na proporção de 1:5 (p/v). As plantas foram inoculadas no estágio de três folhas pela fricção nas duas folhas mais jovens de 1 mL de inóculo e 600 mesh Carborundum, e em seguida lavadas com água destilada, conforme descrito por Souza et al. (2008). O inóculo foi repetido sete dias depois para assegurar a sua eficiência. A susceptibilidade ou a resistência foi avaliada pelo aparecimento dos sintomas do mosaico aos 30, 37, 44, 51 e 58 dias após a inoculação. O escore da resistência foi obtido pela fórmula: $R\ score = (\text{número de plantas resistentes} / \text{número total de plantas por fileira}) \times 100$. A média do $R\ score$ das famílias $F_{2,3}$ nas duas réplicas foi empregada para o posterior mapeamento de QTL.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens de dez plantas de cada uma das 122 progênies $F_{2,3}$, dos parentais L18 e L19 e do híbrido F_1 , de acordo com método descrito por Saghai-Marooif et al. (1984). O DNA genômico foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) com um padrão de concentração conhecida para sua quantificação e avaliação de integridade, de acordo com Sambrook et al. (1989).

Marcadores microsatélites

Um total de 500 marcadores microsatélites foram avaliados entre as linhagens parentais e o híbrido F_1 para a identificação de polimorfismos, sendo posteriormente aplicados na população de mapeamento. As seqüências dos iniciadores estão disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com protocolo descrito em Jardim (2007) e os fragmentos amplificados foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 4% em tampão TAE 1X de acordo com Sambrook et al. (1989).

Mapa de Ligação

A segregação de cada loco microsatélite foi avaliada quanto aos desvios da segregação esperada para a população de $F_{2,3}$ (1:2:1) por meio do teste Qui-quadrado ($p < 0,05$). As análises de ligação foram realizadas com $LOD > 3,0$ e frequência de recombinação menor que 0,4; utilizando o programa MapMaker/EXP versão 3.0 (Lander et al., 1987). As distâncias em centiMorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

Mapeamento de QTL

O mapeamento de QTL para a resistência ao mosaico foi realizado pela metodologia de intervalo composto ou CIM (JANSEN; STAM, 1994; ZENG, 1994) implementada pelo programa QTL Cartographer versão 2.5 para Windows (WANG et al., 2006). Para controlar a interferência de múltiplos QTL foi utilizado o modelo 6 e a regressão *forward* utilizando 20 cofatores e uma janela de 10 cM. A localização mais provável dos QTL dentro do intervalo bem como as estimativas de seus efeitos genéticos foram determinadas pelo método da Máxima Verossimilhança (FISHER, 1921) com testes realizados a cada 1 cM. O QTL foi declarado presente na posição em que o valor de LOD foi superior ao limite de significância determinado por 1000 permutações segundo Churchill; Doerge (1994).

Resultados e Discussão

Um total de 104 marcadores microssatélites polimórficos entre L18 e L19 foram usados para a construção do mapa de ligação, gerando dez grupos de ligação com 2054,7 cM e com distância média entre os marcadores de 21,63 cM.

Pelo método de mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1994; JANSEN; STAM, 1994) foram mapeados dois QTL para resistência ao mosaico na população $F_{2:3}$ L18 x L19 no cromossomo 3 (QTL_{3,1} e QTL_{3,2}) com base no índice fenotípico R score (Figura 1). Esses dois QTL foram expressos em todas as etapas de avaliação fenotípica (30, 37, 44, 51 e 58 dias após inoculação), entretanto a variância fenotípica explicada por cada um destes QTL sofreu oscilações em relação ao tempo de inóculo (Tabela 1).

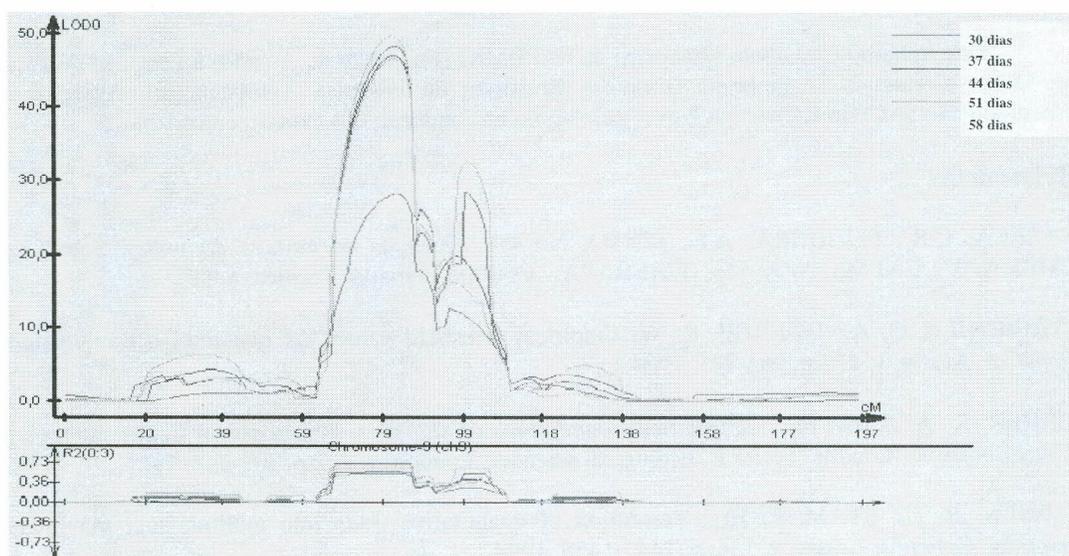


Figura 1. Mapeamento de QTL para a resistência o mosaico em milho no cromossomo 3, aos 30, 37, 44, 51 e 57 dias após a inoculação. Limite de significancia obtido por 1000 permutações segundo Churchill e Doerge (1994).

Tabela 1. QTL associados à resistência ao mosaico em milho por meio de mapeamento por intervalo composto na população $F_{2:3}$ L18 x L19 para o índice R Score. Localização genômica, porcentagem de variância fenotípica e genotípica.

Época de Avaliação (dias após a inoculação)	Cromossomo	Marcador	LR	Variância Fenotípica (%)
30	3	4	130.66	32.55
30	3	8	58.31	02.13
37	3	4	216.79	52.46
37	3	8	91.52	19.78
44	3	4	222.66	35.48
44	3	8	131.56	31.90
51	3	4	214.97	49.69
51	3	8	76.45	08.18
58	3	4	229.12	43.76
58	3	8	150.82	43.07

Conclusões

Por meio do mapeamento por intervalo composto foi possível identificar dois QTL no cromossomo 3 para a resistência ao mosaico na população $F_{2,3}$ L18 x L19 de milho. Estes QTL expressam a resistência em todo o período de infecção do hospedeiro com intensidade variável, o que deve ser levado em consideração em um programa de seleção assistida por marcadores, por exemplo. Estudos futuros são necessários para desvendar os mecanismos da resistência de milho ao vírus do mosaico em função do tempo após a inoculação pelo patógeno.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Agradecemos especialmente ao Célio Ramos das Neves pelo apoio na condução dos experimentos.

Referências

- CASELA, C.R.; FERREIRA, A.F.; PINTO, N.F.J.A. *Doenças na cultura do milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA – CNPMS, 2006. 14p. (EMBRAPA – CNPMS. Circular Técnica, n. 83).
- CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, Austin, v. 138 p. 963-971, 1994
- FISHER, R. A. A. *On the mathematical foundations of statistics*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, London, v. 222 p. 309-368, 1921.
- JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, Austin, v. 136, p. 1447-1455, 1994.
- JARDIM, S.N. *Mapeamento Comparativo de Regiões Genômicas de Milho (Zea mays L.) Associadas com a Tolerância ao Alumínio*. (Tese de doutorado. UFMG. 70 páginas). 2007.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, London, v.12, p.172-75, 1944.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.3
- SOUZA, I.R.P., SCHUELTER, A.R., GUIMARÃES, C.T., SCHUSTER, I., OLIVEIRA, E., REDINBAUGH, M. Clustering of QTL conferring SCMV resistance in tropical maize. *Hereditas*, v. 145, p.167-173, 2008.
- WANG S., C. J. BASTEN, AND Z.-B. ZENG (2006). *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)
- ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, Austin, v. 136, p. 1457-68, 1994.