

Expressão diferencial do gene de resistência *ZmPR1* à antracnose foliar em linhagens endogâmicas de milho**Differential expression of the *ZmPR1* resistance gene to leaf anthracnose in maize inbred lines**

DOI:10.34117/bjdv6n8-133

Recebimento dos originais:08/07/2020

Aceitação para publicação:12/08/2020

Renato Gustavo Hoffmann Bombardelli

Mestrando em Genética e Melhoramento de Plantas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP)

Instituição: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP)

Endereço: Av. Pádua Dias, 11 - Agronomia, Piracicaba - SP, Brasil

E-mail: rghbombardelli@usp.br

Caroline de Jesus Coelho

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Ponta Grossa -PR, Brasil

E-mail: carolecoelho@hotmail.com

Rodrigo Rodrigues Matiello

Doutor em Agronomia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Ponta Grossa -PR, Brasil

E-mail: rrmatiel@uepg.br

RESUMO

O estudo de doenças que causam redução da produtividade de grãos da cultura do milho é de extrema importância, uma vez que, conhecendo-se os mecanismos envolvidos na resistência à patógenos possam ser desenvolvidas estratégias de seleção para minimizar a incidência destas doenças nas lavouras. Nos últimos anos, a antracnose foliar, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils., tem se destacado neste cenário, podendo ocasionar perdas significativas na produção do milho em condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram quantificar a expressão diferencial do gene *ZmPR1* à antracnose foliar nas linhagens endogâmicas L04-2 (resistente) e L70-2 (suscetível) do programa de melhoramento genético da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), assim como verificar o período após a inoculação do patógeno no qual ocorre a máxima expressão deste gene. As linhagens endogâmicas foram cultivadas em vasos plásticos de 3 L contendo substrato até o estágio de desenvolvimento V₄ (RITCHIE; HANWAY, 1989), quando foram inoculadas com suspensão de esporos de *C. graminicola* na concentração $6,2 \times 10^5$ conídios mL⁻¹. Após a inoculação das linhagens de milho, foram coletadas uma folha por planta em seis tempos (0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da extração do RNA. Após a extração, procedeu-se o tratamento das amostras com DNase e a síntese do cDNA, utilizado no experimento de RT-qPCR para quantificação da expressão do gene. O gene FPGS (folilpoliglutamato) foi utilizado como normalizador. Como controle experimental utilizou-se o tempo 0 horas após inoculação para

correção na expressão relativa. Para análise dos dados foi utilizado o programa GenEx Enterprise (v6.1). Os resultados obtidos evidenciaram que o pico de expressão diferencial do gene *ZmPR1* nas linhagens L04-2 e L70-2 foi às 96 horas após a inoculação e que a linhagem resistente apresentou expressão mais acentuada deste gene relacionado a resistência. Os resultados demonstraram forte regulação da expressão pela presença do patógeno (inoculação), sendo que a partir das 12 horas após a inoculação já se observou aumento na expressão diferencial.

Palavras-chave: *Zea mays*, *Colletotrichum graminicola*, RT-qPCR.

ABSTRACT

The study of diseases that cause a reduction in the grain yield of maize is extremely important, since that knowing the mechanisms involved in resistance to pathogens, selection strategies can be developed to minimize the incidence of these diseases in crops. In the recent years, leaf anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils., has stood out in this scenario, and may cause significant losses in maize production in conditions favorable to pathogen development. In this sense, the objectives of this work were to quantify the differential expression of the *ZmPR1* gene to leaf anthracnose in the inbred lines L04-2 (resistant) and L70-2 (susceptible) of the plant breeding program of the State University of Ponta Grossa (UEPG), as well to verify the period after inoculation with the pathogen in which the maximum expression of this gene occurs. The inbred lines were grown in 3 L plastic pots containing substrate until the stage of development V₄ (RITCHIE; HANWAY, 1989), when they were inoculated with suspension of spores of *C. graminicola* in the concentration 6.2×10^5 conidia mL⁻¹. After the inoculation of the maize lines, one leaf per plant was collected in six periods after the inoculation (0, 12, 24, 48, 72 and 96 hours) and stored in a freezer (-20°C) until the RNA extraction. After extraction, the samples were treated with Dnase, and cDNA was synthesized to be used in the RT-qPCR experiment to quantify gene expression. The FPGS (folylpoliglutamate) gene was used as a normalizer. As an experimental control, the time 0 hours after inoculation was used to correct the relative expression. For data analysis, the GenEx Enterprise program was used (v6.1). The results obtained showed that the peak of differential expression of the *ZmPR1* gene in the L04-2 and L70-2 strains was at 96 hours after inoculation, and that the resistant strain showed higher expression of this resistance-related gene. The results showed strong expression regulation due to the presence of the pathogen (inoculation), and from 12 hours after inoculation an increase in differential expression has already been observed.

Key-words: *Zea mays*, *Colletotrichum graminicola*, RT-qPCR.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância agrônômica para a agricultura brasileira e mundial, utilizado amplamente tanto para a alimentação animal, quanto humana. O aumento constante da área cultivada e a ampliação das épocas de semeadura têm contribuído para o aumento da produção da cultura no país. Contudo, o incremento na adoção do sistema plantio direto, com ausência de rotação de culturas, tem favorecido a incidência de um conjunto de doenças secundárias para a cultura, com destaque para as doenças foliares (BARBOSA, 2010).

A antracnose foliar, cujo agente causal é o fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils., tem se destacado de forma crescente no panorama atual da agricultura nacional. O patógeno pode afetar todas as partes da planta, mas a queima foliar e a podridão de colmo são os tipos de infecção mais comuns (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). Este fungo forma frutificações setosas chamadas de acérvulos, dentro dos quais são produzidos os conídios e conidióforos. Os conídios podem permanecer viáveis de semanas a meses, dependendo da umidade relativa do ar, desde que estejam recobertos pela matriz mucilaginosa (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; SILVA, 2006) e em sementes podem sobreviver por até três anos (WARREN, 1977).

A utilização de genótipos resistentes é a principal estratégia de manejo e a forma mais eficaz no controle da antracnose foliar em milho (COÊLHO et al., 2001; FERREIRA; CASELA, 2001; REZENDE et al., 2004; PROCHNO et al., 2016). Assim, em um programa de melhoramento, o conhecimento da herança envolvida na resistência à antracnose foliar é um quesito básico para combinar eficientemente os genitores e obter populações ou híbridos superiores. Dessa forma, o entendimento da base genética da resistência de milho à antracnose foliar associado ao mapeamento de locos de resistência quantitativa (QRLs) pode facilitar a identificação, a seleção assistida e a transferência desses QRLs entre as populações.

Apesar do conhecimento das respostas bioquímicas e fisiológicas às infecções fúngicas na cultura do milho, não se tem total entendimento sobre os mecanismos de expressão dos genes de resistência (REZENDE, 2004). O estudo da expressão dos genes responsáveis pela resistência à antracnose foliar em milho é de extrema importância, e abordagens genômicas podem contribuir consideravelmente para compreender os mecanismos envolvidos na resistência. Nesse sentido, tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são muito importantes em estudos de comparação de processos biológicos. A técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) tem sido promissora em pesquisas que relacionam genes de resposta das plantas aos estresses bióticos, podendo assim, ser usada para avaliar a expressão de genes durante a infecção de patógenos em plantas de milho (AOYAGI et al., 2014; ALVES et al., 2015).

A literatura indica que historicamente o progresso genético obtido pelos programas de melhoramento da cultura do milho em vários países se deu principalmente pelo aumento da resistência ou da tolerância aos estresses tanto bióticos quanto abióticos relacionados com as mudanças nos sistemas de produção (POZAR et al., 2009). Sendo assim, o presente trabalho objetivou quantificar a expressão diferencial do gene *ZmPRI* relacionado a resistência à antracnose foliar em linhagens endogâmicas de milho contrastantes para reação ao patógeno e, adicionalmente

identificar quanto tempo após a inoculação com *C. graminicola* ocorre a expressão máxima do gene *ZmPRI* envolvido na resistência à antracnose foliar em linhagens endogâmicas de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

As linhagens de milho L 04-2 e L 70-2, resistente e suscetível à antracnose foliar, respectivamente, foram cultivadas em vasos plásticos contendo aproximadamente 3 L de substrato, em casa de vegetação na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As linhagens endogâmicas utilizadas no presente trabalho pertencem ao programa de melhoramento de milho da UEPG e são originadas a partir de cruzamentos iniciais com um grupo de variedades de milho crioulo. As linhagens utilizadas nesse experimento foram caracterizadas para a resistência/suscetibilidade à antracnose foliar por Prochno et al. (2016).

2.2 MULTIPLICAÇÃO E PREPARO DO INÓCULO

A manutenção e multiplicação do isolado e o preparo do inóculo de *C. graminicola* foram realizados no Laboratório de Genética Molecular na Universidade Estadual de Ponta Grossa. O isolado "Ori" do patógeno foi cedido pela empresa DowAgroSciences Ltda. (Jardinópolis, SP), na forma de disco em meio de cultura com colônias do fungo, preservados pelo método Castellani (1939).

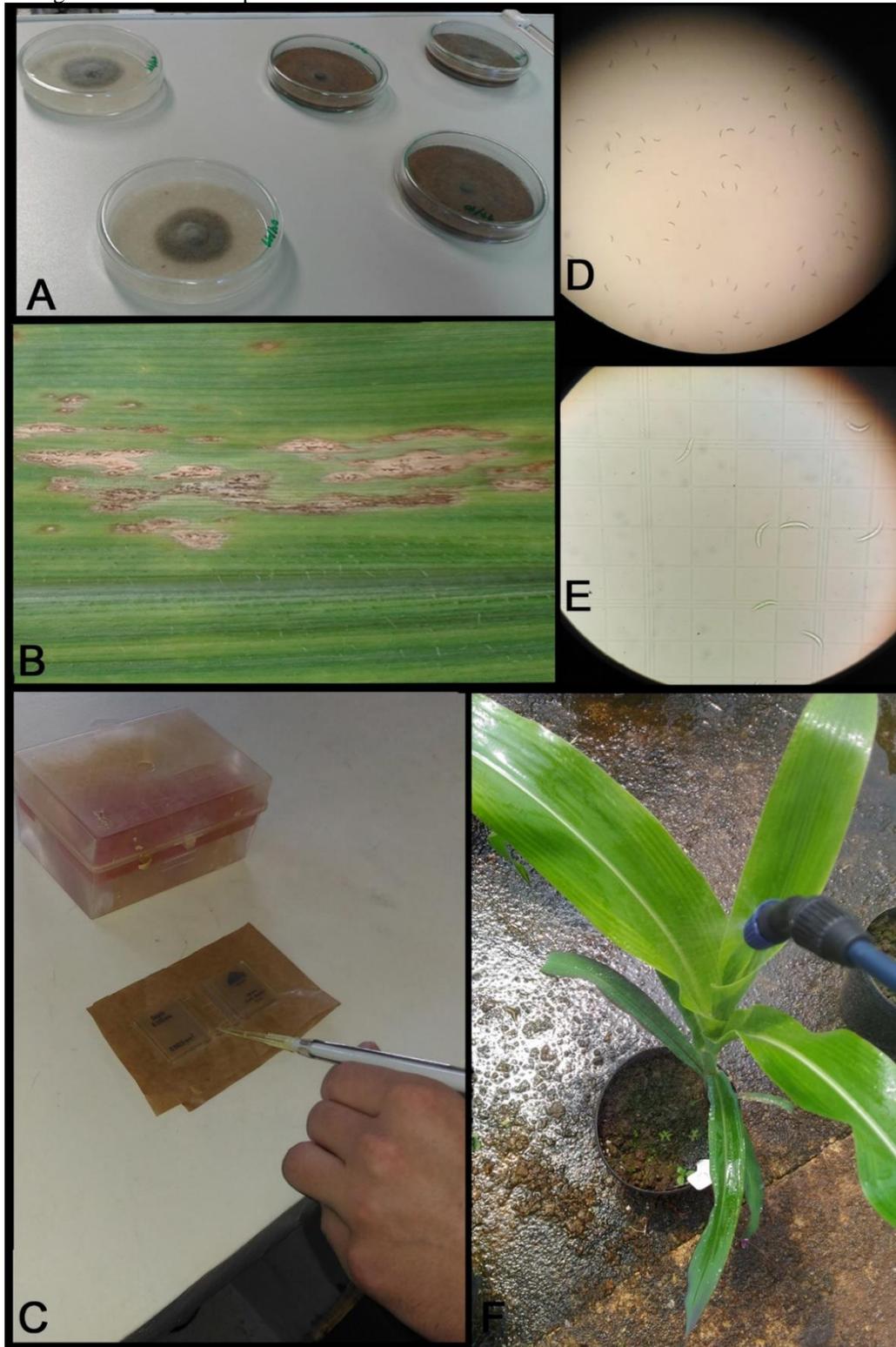
Inicialmente a multiplicação do patógeno foi realizada por meio da transferência dos discos com colônias do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (40 g de aveia, 10 g de Ágar em 1 L de água destilada), sendo mantidos à temperatura ambiente sobre as bancadas do laboratório por aproximadamente 20 dias até a esporulação completa das colônias (Figura 1-A). As multiplicações subsequentes do patógeno foram realizadas repetindo-se o procedimento anterior.

Para a preservação da patogenicidade do isolado, reisolamentos periódicos do patógeno foram realizados. Para o reisolamento, plantas de milho cultivadas em vasos plásticos contendo substrato, foram inoculadas por pulverização com suspensão de esporos de *C. graminicola* na superfície das folhas até o ponto de escorrimento. Imediatamente após a inoculação, os vasos contendo as plantas foram cobertos com sacos plásticos de modo a simular uma câmara úmida, na qual foram mantidos por 48 horas, objetivando fornecer as condições ideais de umidade para o desenvolvimento do patógeno. Após a retirada da câmara úmida as plantas foram mantidas no laboratório, sob temperatura ambiente, até o aparecimento dos sintomas típicos da antracnose foliar (Figura 1-B).

O reisolamento do patógeno foi realizado utilizando-se o método indireto de isolamento de fungos fitopatogênicos. A metodologia consistiu na deposição de quatro fragmentos de folha com sintomas da doença, previamente desinfestados em álcool 70% e em solução de hipoclorito de sódio 1%, de forma equidistante em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram mantidas sob temperatura ambiente nas bancadas do laboratório. Após a colonização da superfície do meio de cultura, discos contendo micélio do fungo foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar, mantidas em bancada até a obtenção das colônias completamente esporuladas.

O inóculo do patógeno foi preparado para uma concentração de $6,2 \times 10^5$ conídios mL^{-1} , com auxílio de uma câmara de Neubauer (Figura 1-C, D e E). A inoculação das plantas de milho foi realizada no estágio de desenvolvimento V₄ (RITCHIE; HANWAY, 1989) por meio de um pulverizador costal de bomba manual, com pulverização de aproximadamente 7 mL da suspensão de conídios em cada planta (Figura 1-F). Foi coletada uma folha por planta das linhagens resistente e suscetível, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação do patógeno. Para cada um dos tempos de coleta foram utilizadas três repetições biológicas, ou seja, três plantas por linhagem no tempo após inoculação. As folhas coletadas das linhagens foram identificadas e armazenadas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que fosse realizada a extração do RNA total.

Figura 1 – Cultivo do patógeno e ajuste da concentração da suspensão de esporos à inoculação através de pulverização da suspensão de esporos. A – Cultivo do isolado em placas de petri até a completa esporulação das colônias; B – Sintoma da antracnose foliar; C – Contagem de esporos utilizando-se a câmara de Neubauer; D – Visualização dos conídios em microscópico óptico 10X; E – visualização dos conídios em microscópico óptico 40X; F – Pulverização da suspensão de esporos na região do cartucho da planta de milho.



2.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Para a extração de RNA total das folhas de milho inoculadas com *C. graminicola*, utilizou-se o kit comercial Total RNA Purification Kit (NORGEN Biotek corp). Após a fragmentação das amostras em nitrogênio líquido a extração de RNA foi realizada segundo o protocolo do fabricante. Posteriormente as amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até sua utilização.

A concentração e pureza do RNA total extraído foram determinadas a partir das relações de absorvância A_{260}/A_{280} (RNA / proteínas) e A_{260}/A_{230} (RNA / polissacarídeos e polifenóis), utilizando-se de um espectrofotômetro (NanoVue GE Healthcare®) (Tabela 1).

A integridade do RNA extraído foi visualizada em gel de agarose 1%. As amostras de RNA total (2,0 µL) foram coradas com 2,0 µL de GelRed 0,1 X acrescido 2,0 µL de tampão de carregamento (0,25 de azul de bromofenol e 0,4 de sacarose). À esquerda de cada conjunto de amostras foi adicionado o marcador de 100 pb (NORGEN Biotek corp.). As amostras foram submetidas à corrida eletroforética por aproximadamente 1,5 h a 70 V e fotodocumentadas sob luz UV no aparelho AlphaImager HP, versão 3400 (Figura 2) A presença dos fragmentos referentes ao RNA ribossômico 28S e 18S confirmaram a integridade das amostras de RNA extraídas.

As amostras contendo o RNA extraído foram tratadas com DNase, para eliminação do DNA presente nas amostras, utilizando-se o kit comercial DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações técnicas do fabricante.

Para a síntese dos cDNAs (DNA complementar), aproximadamente 1,5 µg de RNA total foi submetido a transcrição reversa utilizando o kit comercial First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, UK Limited), seguindo as recomendações técnicas do fabricante. Alíquotas de cDNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% para a verificar a integridade das amostras que posteriormente foram diluídas para a concentração de 10 ng µL⁻¹ e armazenadas em freezer (-20 °C).

2.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

A análise de expressão gênica foi realizada por ensaio de RT-qPCR no equipamento G8830A AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Para a quantificação da expressão do gene de resistência *ZmPRI* (proteína relacionada a patogênese 1) foi utilizado o seguinte par de primers: Forward CCTACGGCGAGAACCTCTT e Reverse TCGTAGTACTGCTTCTCGGACA (BALMER et al., 2013). Como controle interno foi utilizado o gene de normalização (endógeno) *FPGS* (folilpoliglutamato) através dos primers: Forward ATGTTTCGGGTGGAAAACCTT e Reverse ATCTCGTTGGGGATGTCTTG (MANOLI et al.,

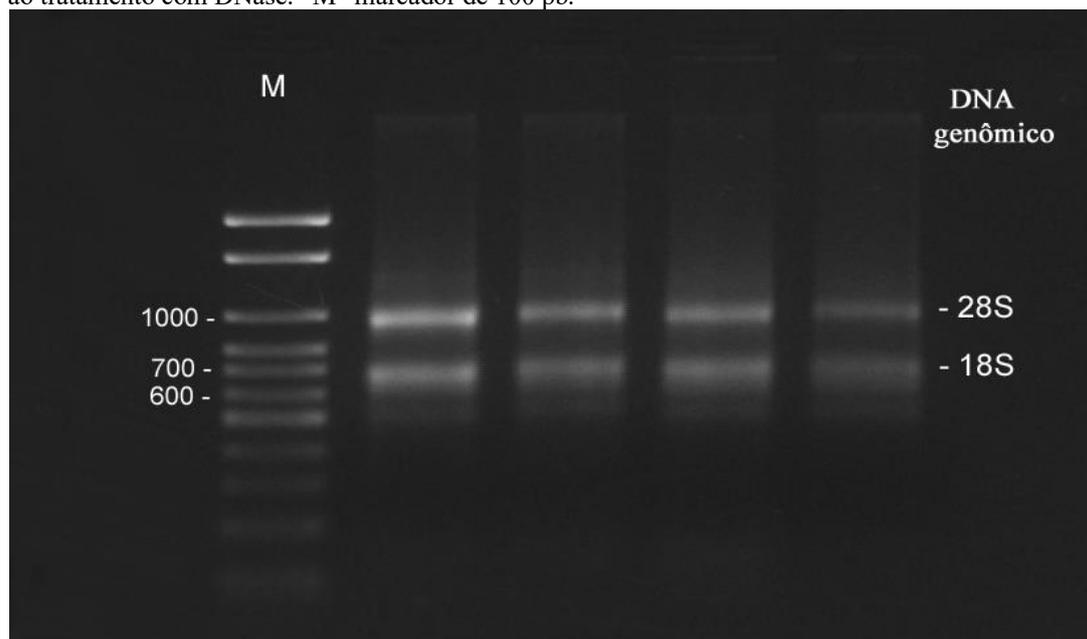
2012). Para verificar a estabilidade do gene normalizador utilizou-se o algoritmo *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004).

Para as reações de amplificação utilizaram-se os seguintes reagentes: 10 µL Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies), 0,3 µL ROX (Reference dye Agilent) (1:500), 0,8 µL de cada primer forward/reverse em concentração de 10 mM, 2 µL de cDNA (10 ng µL⁻¹) e água ultrapura estéril para completar 20 µL de reação. Em cada experimento de RT-qPCR foi incluído um controle negativo (água), visando a confirmação da ausência de contaminantes na reação. O equipamento foi programado para a seguinte ciclagem: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. A curva de dissociação foi composta pela seguinte programação: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 10 segundos a 94°C. Os níveis de expressão diferencial do gene foram calculados por meio do método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando-se o programa GenEx Enterprise (v6.1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A integridade do RNA total extraído foi confirmada por meio de corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Na Figura 2 é possível observar o perfil eletroforético de quatro amostras de RNA total antes do tratamento com a DNase. Verificou-se, para estas amostras, a presença bem definida dos fragmentos que representam as moléculas de rRNA 28S e 18S, confirmando a integridade das mesmas (Figura 2).

Figura 2 – Visualização do perfil eletroforético em gel de agarose 1% da integridade de amostras de mRNA extraídas, anterior ao tratamento com DNase. “M” marcador de 100 pb.



A quantificação do RNA total extraído, por meio do espectrofotômetro NanoVue GE Healfcare® indicou que as amostras apresentaram quantidade adequada, com concentrações variando de 156,4 a 949,8 ng μL^{-1} . As relações de absorvância estão em conformidade com o recomendado para experimentos de RT-qPCR. A relação A 260/280 variou de 1,917 a 2,161, indicando baixa contaminação por proteínas, enquanto a relação A 260/230 variou de 0,377 a 2,437, indicando baixa contaminação por polissacarídeos e polifenóis na grande maioria das amostras utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações de RNA total obtidas pela extração de amostras de folhas de linhagens (LR 04-2 – resistente e LS 70-2 – suscetível) de milho inoculadas com *C. graminicola* em diferentes períodos após a inoculação (T₀ – 0 horas após a inoculação, T₁₂ – 12 horas após a inoculação, T₂₄ – 24 horas após a inoculação, T₄₈ – 48 horas após a inoculação, T₇₂ – 72 horas após a inoculação e T₉₆ – 96 horas após a inoculação).

T ₀	ng μL^{-1}	A 260/280	A 260/230	T ₁₂	ng μL^{-1}	A 260/280	A 260/230
LR ₁	392,0	1,988	1,456	LR ₁	528,8	2,037	1,013
LR ₂	369,6	1,970	1,668	LR ₂	949,8	2,021	2,312
LR ₃	262,8	1,944	0,989	LR ₃	307,6	2,031	1,977
LS ₁	488,8	2,010	1,034	LS ₁	248,0	2,033	0,932
LS ₂	342,8	1,926	1,561	LS ₂	263,6	2,015	2,140
LS ₃	405,6	2,024	2,223	LS ₃	276,8	2,000	1,972
T ₂₄	ng μL^{-1}	A 260/280	A 260/230	T ₄₈	ng μL^{-1}	A 260/280	A 260/230
LR ₁	505,2	1,980	1,863	LR ₁	441,6	2,052	0,995
LR ₂	544,4	1,996	1,906	LR ₂	337,6	2,014	2,306
LR ₃	287,6	1,933	2,096	LR ₃	362,0	2,038	2,076
LS ₁	250,8	1,917	1,533	LS ₁	156,4	2,005	0,377
LS ₂	348,4	1,998	1,902	LS ₂	245,2	2,064	0,676
LS ₃	304,4	1,931	1,702	LS ₃	404,0	2,020	2,338
T ₇₂	ng μL^{-1}	A 260/280	A 260/230	T ₉₆	ng μL^{-1}	A 260/280	A 260/230
LR ₁	329,6	2,025	2,348	LR ₁	530,8	2,080	2,430
LR ₂	392,8	2,042	1,403	LR ₂	255,2	2,120	1,957
LR ₃	336,0	2,029	2,340	LR ₃	216,8	2,109	0,998
LS ₁	214,8	2,157	0,430	LS ₁	316,8	2,129	2,437
LS ₂	223,2	2,138	1,836	LS ₂	258,0	2,143	0,570
LS ₃	173,2	2,133	2,112	LS ₃	294,8	2,161	1,159

Atualmente reconhece-se a necessidade da validação de genes normalizadores de dados de expressão gênica em estudos utilizando-se da técnica de RT-qPCR (EXPÓSITO-RODRÍGUES et al., 2008; MIGOCKA; PAPERNAK, 2010; MANOLI et al., 2012). A adoção de uma sistemática de validação de genes de referência como prática rotineira permite melhorar a acurácia dos resultados das análises de RT-qPCR. Para isto certos algoritmos estatísticos como o *GeNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper* foram idealizados para auxiliar na pesquisa para validação dos genes de referência (COELHO, 2015).

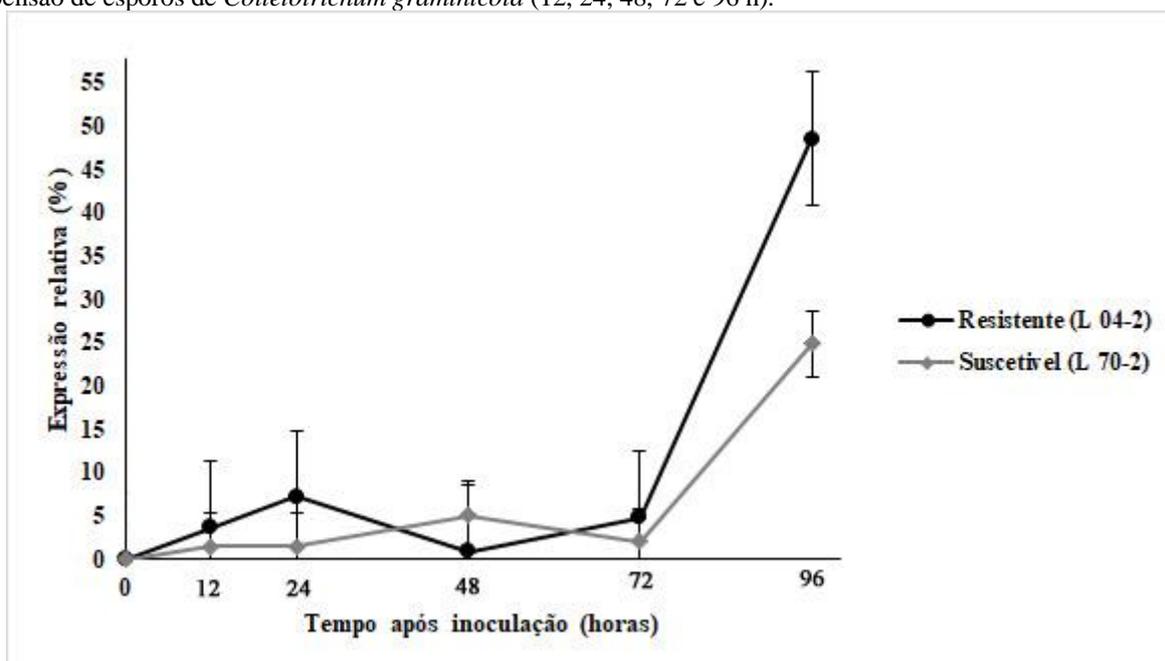
Para Manoli et al. (2012), a utilização de subunidades ribossômicas é ainda sujeita a controvérsias. Estudando candidatos a genes de referência para a cultura do milho, constataram que o gene 18S rRNA é um dos genes com maior instabilidade de expressão, e embora isto ocorra, este

gene ainda tem sido utilizado como gene normalizador em diversos experimentos de expressão gênica (MARON et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2014).

No presente trabalho, optou-se pela utilização do gene *FPGS* como normalizador que, de acordo com resultados obtidos por Manoli et al. (2012) e Coelho (2015) está dentre os genes de referência que apresentam maior estabilidade em experimentos de expressão gênica com o milho. Para confirmar a estabilidade nas amostras utilizadas no presente estudo, utilizou-se o algoritmo *BestKeeper*, no qual foi obtido valor de desvio padrão de 0,69 dos Cqs (quantification cycle) no experimento de RT-qPCR. Segundo Pfaffl *et al.* (2004) valores de desvio maiores que 1 caracterizam inconsistência do gene como normalizador, sendo assim, confirma-se a estabilidade do *FPGS* para o presente estudo.

O padrão de expressão do gene *ZmPRI* foi verificado por meio da utilização da PCR quantitativa em tempo real (Figura 3). O tempo 0 horas após a inoculação foi utilizado como controle experimental e ao longo do período após inoculação do patógeno *C. graminicola* a expressão do *ZmPRI* foi fortemente regulada pela ação do patógeno, havendo aumento da expressão já em 12 horas após a inoculação. De 12 a 72 horas após a inoculação observou-se um padrão de expressão semelhante para ambos os genótipos. Após 72 horas verificou-se um incremento significativo na expressão do gene, atingindo um maior pico de expressão 96 horas após a inoculação, sendo que a linhagem resistente apresentou expressão muito superior à linhagem suscetível (Figura 3).

Figura 3 – Expressão relativa do gene *ZmPRI* nas linhagens L04-2 e L70-2, em função do período após inoculação de suspensão de esporos de *Colletotrichum graminicola* (12, 24, 48, 72 e 96 h).



A análise de expressão diferencial do gene relacionado a patogenicidade *ZmPRI* evidenciou expressão similar ao encontrado na literatura científica. O pico de expressão do gene *ZmPRI* observado nas linhagens endogâmicas de milho L04-2 e L70-2 são similares aos resultados obtidos por Balmer *et al.* (2013), que, ao avaliarem plantas de milho (variedade Jubilee - West Coast Seed) inoculadas com suspensão de esporos de *C. graminicola* nas folhas, obtiveram pico de expressão do gene *ZmPRI* 48 horas após a inoculação com uma leve queda na expressão às 96 horas após a inoculação.

Estudos recentes demonstram também a influência de outros microrganismos na expressão do gene *ZmPRI* em relação aos patógenos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium moniliforme*. Ferrigo *et al.* (2014) ao estudarem o efeito do fungo *Trichoderma harzianum* (T22) sobre o patógeno *Fusarium verticillioides* em milho observaram que em sementes de milho previamente tratadas com o fungo T22 a expressão do gene *ZmPRI* foi significativamente maior às 48 e 72 horas após a inoculação do patógeno do que em sementes inoculadas com o patógeno sem tratamento prévio do fungo T22. Os autores concluíram também que o fungo T22 induz resistência sistêmica nas plantas de milho, havendo uma redução na presença de sintomas ocasionados por *F. verticillioides* nas raízes das sementes que receberam tratamento prévio com o fungo T22.

Gond *et al.* (2015) ao estudarem o efeito da bactéria endofítica *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *subtilis* sobre o patógeno *Fusarium moniliforme* em milho pipoca da Índia, observaram que a expressão do gene *ZmPRI* teve seu pico em 24 horas após a inoculação do patógeno em sementes de milho. A maior expressão se deu em sementes previamente inoculadas com a bactéria, concluindo assim que a bactéria *B. subtilis* induziu as sementes de milho a terem uma melhor percepção do patógeno, aumentando a síntese de moléculas de defesa contra o fungo e, conseqüentemente, a expressão do gene *ZmPRI*.

Verifica-se que os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os observados por Ferrigo *et al.* (2014) e Gond *et al.* (2015), uma vez que se demonstrou que o pico de expressão do gene *ZmPRI* ocorreu no momento de transição da ação do patógeno sobre a planta de milho. Transição esta que está relacionada a passagem da infecção superficial da semente de milho pelo patógeno, ao rompimento e penetração do pericarpo e início da colonização dos tecidos internos. De acordo com Balmer *et al.* (2013) após 96 horas da inoculação do fungo *C. graminicola* nas folhas de milho, o patógeno está em uma fase de transição de biotrófico para necrotrófico. Esta interação patógeno-planta resulta em uma resposta mais expressiva de defesa da planta para o combate da infecção.

4 CONCLUSÕES

A linhagem L04-2 (resistente à antracnose foliar) apresentou maior expressão diferencial do gene *ZmPRI* com relação a linhagem L70-2 (suscetível);

O pico de expressão do gene *ZmPRI* se deu as 96 horas após a inoculação com suspensão de esporos de *Colletotrichum graminicola*;

Pelo fato dos níveis de expressão do gene *ZmPRI* terem sido superiores na linhagem resistente L04-2, sugere-se grande contribuição deste gene para a resistência desta linhagem à antracnose foliar.

REFERÊNCIAS

ALVES, M.S.; SOARES, Z.G.; VIDIGAL, P.M.P.; BARROS, E.G.; PODDANOSQUI, A.M.P.; AOYAGI, L.N.; ABDELNOOR, R.V.; GUIMARÃES, F.C.M.; FIETTO, L.G. Differential expression of four soybean bZIP genes during *Phakospora pachyrhizi* infection. **Functional & Integrative Genomics**. v. 15, n. 6, p. 685-696, 2015.

AOYAGI, L.N.; CAITAR, V.S.L.; CARVALHO, M.C.C.G.; DARBEN, L.M.; PODANOSQUI, A.P.; KUWAHARA, M.K.; NAPOMUCENO, A.L.; ABDELNOOR, R.V.; GUIMARÃES, F.C.M. Genomic and Transcriptomic Characterization of the Transcription Factor Family R2R3-MYB in Soybean and its involvement in the resistance responses to *Phakospora pachyrhizi*. **Plant Science**. v. 229, p. 32-42, 2014.

BALMER, D.; PAPAJEWSKI, D.V.; PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Induced resistance in maize is based on organ-specific defense response. **The Plant Journal**, v. 74, p. 213-225. 2013.

BARBOSA, C.A. Manual da cultura do milho. Viçosa: AgroJuris, 574p. 2010.

BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 596-608, 1999.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226. 1939.

COELHO, C.J. **Tolerância ao alumínio em milho tropical: herança genética, mapeamento de QTLs e expressão gênica**. 2015. 99 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, p.131, 2008.

FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Antracnose do Milho (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 6p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 13).

FERRIGO, D.; RAIOLA, A.; PICCOLO, E.; SCOPEL, C.; CAUSIN, R. *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemica resistance against *Fusarium verticillioides*. **Journal of Plant Pathology** v. 96, n. 1, p. 133-142, Mar. 2014.

GOND, S.K.; BERGEN, M.S.; TORRES, M.S.; WHITE Jr, J.F.; KHARWAR, R.N. Effect of bacterial endophyte on expression. Of defense genes in Indian popcorn against *Fusarium moniliforme*. **Symbiosis** v. 66, n. 3, p. 21, Out. 2015.

GUIMARÃES, C. T.; SIMOES, C.C.; PASTINA M.M.; MARON L.G. MAGAÇHÃES, J.V.; VASCONCELLOS, R.C. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC Genomics**, v.15, p.1-14, 2014.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MANOLI, A.; STURARO, A.; TREVISAN, S.; QUAGGIOTTI, S.; NONIS, A. Evaluation of reference genes for qPCR in maize. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 807-815, 2012.

MARON, L. G.; PIÑEROS, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; MAGALHAES, J.V.; PLEIMAN, J.K.; MAO, C.; KOCHIAN, L.V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, v. 61, N. 5, p. 728-740, 2010.

MIGOCKA, M.; PAPERNAK, A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. **Molecular Breeding**, v.28, p.343-357, 2010.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: *BestKeeper* - Excel - based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509-515, 2004.

POZAR, G.; BUTRUILLE, D.; SILVA, H.D.; MCCUDDIN, Z.P.; PENNA, J.C.V. Mapping and validation of quantitative trait loci for resistance to cercospora infection in tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 3, p. 553-564, 2009.

PROCHNO, H. C.; COELHO, C. J.; ROMANEK, C.; SILVA, D. F. G.; TASIOR, D.; OLIVEIRA, E. A. T.; GARDINGO, J. R.; MATIELLO, R. R. Genetic resistance of maize inbred lines to anthracnose leaf blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 16, p. 55-61, 2016.

REZENDE, V.F. **Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho**. 2004, 103 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

REZENDE, V.F.; VENCOSKY, R.; CÁRDENAS, F.E.N.; SILVA, H.P.; BEARZOTI, E.; CAMARGO, L.E.A. Mixed inheritance model for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 115-122. 2004.

RITCHIE S.; HANWAY J.J. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology/Cooperative Extension Service, Ames, 21p. (Special Report, 48), 1989.

Brazilian Journal of Development

SILVA, V.A. **Resposta de cultivares de milho a *Colletotrichum graminicola***. Jaboticabal, 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

WARREN, H.L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in corn kernels. **Phytopathology**, v. 67, p. 160-162, 1977.