

## **Seleção de Marcadores Associados aQTLs de Resistência a Cercosporiose em Milho<sup>1</sup>**

Adriano Delly Veiga<sup>2</sup>, Renzo Garcia Von Pinho<sup>2</sup>, Luciane Vilela Resende<sup>2</sup>, Édila Vilela de Resende Von Pinho<sup>2</sup>, Laís Andrade Pereira<sup>2</sup> e Rafael Parreira Diniz<sup>3</sup>

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras/DA [Gadrveiga@yahoo.com.br](mailto:Gadrveiga@yahoo.com.br), [renzo@dag.ufla.br](mailto:renzo@dag.ufla.br), [luciane.vilela@dag.ufla.br](mailto:luciane.vilela@dag.ufla.br), [edila@dag.ufla.br](mailto:edila@dag.ufla.br), [andrade.lais@gmail.com](mailto:andrade.lais@gmail.com), <sup>3</sup>Universidade Federal de Lavras/DBI, [rafadiniz\\_rpd@yahoo.com.br](mailto:rafadiniz_rpd@yahoo.com.br).

**RESUMO** -A incorporação de resistência genética está entre os principais objetivos dos programas de desenvolvimento de híbridos para as regiões onde a doença é prevalente. A identificação de Locos de Caracteres Quantitativos (QTL) com o uso de marcadores moleculares possibilita o desenvolvimento mais rápido de cultivares resistentes e produtivas, via seleção assistida. O objetivo da pesquisa foi a seleção de marcadores associados aQTLs de resistência à cercosporiose em germoplasma de milho tropical. Foram utilizadas linhagens contrastantes em níveis de reação à doença, seu híbrido (L30 x L31) e a população segregante F<sub>2</sub>. Esses indivíduos foram fenotipados quanto a resistência à doença e genotipados com marcadores microssatélites. A associação dos marcadores moleculares ao QTL foi realizada por meio de análises de marca simples utilizando análise por meio da máxima verossimilhança. O tipo de efeito predominante para o controle da resistência a cercosporiose foi o aditivo. Os marcadores promissores para serem usados em estudos de seleção assistida são umc2082, umc1117 e umc1058.

**Palavras-chave:** microssatélites, verossimilhança, doenças.

### **Introdução**

Mesmo com o grande avanço nos programas de melhoramento de milho, no Brasil, o cultivo sob condições de estresses edafo-climáticos e biológicos dificulta a expressão do máximo potencial genético de produtividade das cultivares. Tem-se observado aumento da área de safrinha e de plantio direto com a cultura, o que tem propiciado o desenvolvimento de doenças durante todo o ano. Assim são observadas, alterações na severidade e dispersão destas, devido ao aumento do potencial de inóculo dos patógenos que sobrevivem nos restos da cultura anterior.

Mais recentemente, no Brasil, a cercosporiose, causada pelo fungo *Cercosporazeae-maydis* (Cz), tem sido considerada a principal doença na cultura do milho, principalmente na região centro-sul do país. Hoje, a incorporação de resistência genética a Cz está entre os principais objetivos dos programas de desenvolvimento de híbridos para as regiões onde essa doença é prevalente. O mapeamento e identificação de Locos de Caracteres Quantitativos (QTL) com o uso de marcadores moleculares possibilitam o desenvolvimento mais rápido de cultivares resistentes e produtivas, via seleção assistida por marcadores moleculares, dentre eles os microssatélites e os SNPs.

<sup>1</sup> Apoio Financeiro: Fapemig, CNPq

Com o uso destas ferramentas, para a investigação dos caracteres, aliado a  
disponibilidade de

<sup>1</sup> Apoio Financeiro: Fapemig, CNPq

metodologias estatísticas de identificação de QTL, é possível o monitoramento de regiões cromossômicas específicas que afetam a expressão do caráter, fornecendo informações sobre o número, localização e magnitude dos efeitos do loco ou locos que controlam os caracteres quantitativos.

Vários locos controladores de características quantitativas (QTL), com diferentes tipos de ação gênica, são associados com a resistência a cercosporiose, sugerindo uma possível resistência horizontal ou poligênica (Bubeck et al., 1993). Esses QTLs podem ser determinados pelo uso de marcadores moleculares do tipo RFLPs (Maroof et al., 1993), microssatélites (Juliatti et al., 2009) e por SNP (Pozar et al. 2009).

Diante do exposto o objetivo desta pesquisa foi a identificação de QTLs associados com a resistência à Cercosporiose em germoplasma de milho tropical.

### **Material e Métodos**

Os genótipos utilizados pertencem ao programa de melhoramento de milho inserido na Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas duas linhagens contrastantes quanto à reação para a doença, a linhagem L30 (resistente) e a linhagem L31 (suscetível), para formação do híbrido F<sub>1</sub> e posteriormente a população segregante F<sub>2</sub>.

Para a avaliação da severidade da doença, foram utilizadas 60 plantas de cada genitor e do híbrido F<sub>1</sub> e 240 plantas F<sub>2</sub>, dispostas em três blocos contendo linhas de 4m. A avaliação foi realizada aos 95 dias após a emergência das plantas por meio de avaliação visual da área foliar afetada pela doença, com o auxílio de escala diagramática da Agrocere (1996).

Inicialmente os marcadores foram utilizados para verificar o polimorfismo entre as linhagens genitoras. Para esse estudo, foram utilizados 94 pares de primer microssatélites. As reações de PCR consistiram de 20 ng de DNA, 0,5μM de cada primer, 100μM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8,6), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25μL. Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 120 V por 2 horas.

Após a avaliação inicial de polimorfismo entre os genitores, os primers polimórficos foram utilizados para genotipagem de 93 indivíduos da população F<sub>2</sub>, sendo estes selecionados de acordo com a qualidade do DNA.

[Digite texto]

A associação dos marcadores com os QTLs por meio da máxima verossimilhança foi realizada utilizando o programa SAS / IML (SAS Institute, 2000). Os valores de média, efeitos aditivo e de dominância, variância, frequência de recombinação foram estimados por processos iterativos considerando a maximização de uma função de verossimilhança por meio do algoritmo EM. Para isso, utilizou-se um modelo de mistura condicional à segregação conjunta da marca e de um suposto QTL, dada sua frequência de recombinação.

Este método é baseado no princípio da iteração e o algoritmo foi executado em três etapas. Primeiro foi atribuído um valor inicial (arbitrário) de frequência de recombinação de 0,1 ( $r_0$ ) e obtido valores iniciais das médias de cada genótipo marcador e da variância que permitiram estabelecer estimativas das probabilidades (etapa esperança) de cada fenótipo apresentar os possíveis genótipos do QTL. Nessa etapa foram feitas inferências de probabilidades condicionais baseadas nos genótipos dos marcadores, já que os genótipos dos QTLs não são observáveis. Com estes resultados estimados, foram encontrados valores dos parâmetros que produzem a máxima verossimilhança e/ou até os valores convergirem para as equações de máxima verossimilhança.

O teste estatístico utilizado para verificar se há associação entre um marcador e um QTL, foi a razão de verossimilhança (LR) seguindo uma distribuição de qui-quadrado. Neste teste verificaram-se os valores encontrados para a razão entre as hipóteses H1 (presença de QTL) e H0 (hipótese de nulidade), em que, os parâmetros são estimados assumindo a ausência do QTL. Ou seja, H0:  $\mu_{MM}=\mu_{Mm}=\mu_{mm}$  com  $a$  e  $d=0$  ou  $r=0,5$ . Segundo a expressão:

$$LR = -2 \ln \left[ \frac{L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma^2, r; y_i)}{L(r=0,5)} \right]$$

Em que:

LR: razão de verossimilhança;

$\mu_1$ : média fenotípica referente ao genótipo dominante;

$\mu_2$ : média fenotípica referente ao genótipo heterozigoto;

$\mu_3$ : média fenotípica referente ao genótipo recessivo;

$\sigma^2$ : variância residual

$r$ : frequência de recombinação

$y_i$ : vetor com valor fenotípico dos indivíduos.

No entanto, após o uso do modelo de mistura, construiu-se uma distribuição empírica  $H_0$  por meio de permutações. Foram utilizadas 3000 permutações (N) para

[Digite texto]

reconstruir a distribuição da variável LR e determinar o valor crítico ( $\alpha=0.05$ ), que permite declarar a existência de um QTL associado ao marcador (Churchill e Deorge, 1994). Neste teste os valores máximos da razão de verossimilhança são armazenados e ao final de N análises, estes são ordenados por ordem de magnitude permitindo estimar o valor crítico para cada teste por marcador (Schuster e Cruz, 2008).

## Resultados

Dos 94 pares de primer utilizados no trabalho, 23 foram polimórficos entre os genitores (Tabela 1), 53 não apresentaram polimorfismo e 18 pares não tiveram definição após a revelação dos produtos de amplificação.

Por meio da metodologia da máxima verossimilhança, dos 23 marcadores polimórficos entre os genitores, verificou-se uma associação significativa de três destes com QTLs que controlam a resistência a cercosporiose. As análises com esses marcadores apresentaram valores de máxima verossimilhança (LR) acima do valor crítico fixado na distribuição de  $H_0$  considerando um  $\alpha$  de 5%, rejeitando dessa forma, a hipótese de efeito nulo e apresentando valores de  $a$  e/ou  $d$  (efeitos aditivo e de dominância) diferentes de zero.

Na Tabela 2 são apresentados os marcadores associados com QTLs que controlam a resistência da cercosporiose e seus respectivos valores encontrados de: média da severidade da doença, valores e significância dos efeitos aditivos e de dominância do QTL associado, valores de variância, frequência de recombinação que representa a distância entre a marca e o QTL associado, valor da razão de máxima verossimilhança e sua probabilidade.

Para os QTLs encontrados, existe a predominância dos efeitos aditivos e estes atuam no sentido de reduzir a doença (sinal negativo da estimativa de  $a$ ), com maior redução do QTL associado ao marcador umc2082. O sinal negativo dos valores do efeito aditivo também indica que para estes locos encontrados o alelo favorável foi originado do parental resistente. A predominância dos efeitos aditivos foi observada pela maioria dos trabalhos relacionados com o controle da resistência a cercosporiose em milho, como no trabalho realizado por Clementes (2000), o qual encontrou cinco QTLs consistentes nos ambientes com efeitos aditivo nos cromossomos 1, 2, 5 e 7.

## Conclusão

O tipo de efeito predominante para o controle da resistência a cercosporiose foi o aditivo. Os marcadores mais promissores para serem usados em estudos de seleção assistida são umc2082, umc1117 e umc1058.

## Literatura Citada

AGROCERES. Guia Agroceres de Sanidade. São Paulo: Sementes Agroceres, 1996. 72 p.

BUBECK, D. M.; GOODMAN, M. M.; BEAVES, W. D.; GRANT, D. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Science*, Madison, v. 33, n. 4, p. 838-847, July/Aug. 1993.

CHURCHILL, G.A.; DEORGE, R.W. Empirical threshold for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963-971, 1994.

JULIATTI, F. C.; BRANDÃO, A. M. Cercosporiose em milho (*Cercosporazea-maydis* Tehon&Daniels) afeta plantios de milho no cerrado brasileiro. Uberlândia, MG: ICIAG-UFU, 2000. (Boletim técnico informativo).

MARROF, M. A. S.; ZUE, Y. G.; XIANG, Z. X.; STROMBERG, E. L.; RUFENER, G. K. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot disease in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 93, n. 4, p. 539-546, Sept. 1996.

POZAR, G; BUTRUILLE, D.; DINIZ, H. S.; VIGLIONI, J. P. Mapping and Validation of Quantitative Trait Loci for Resistance to *Cercospora* Infection in Tropical Maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.118, n. 3, p. 553-564, 2009.

SAS: STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. User's guide statistical version 9. 4. Ed, 2009. Cary, NC: SAS. 1 CD-ROM.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. Estatística genômica: aplicada a população derivadas decruzamentos controlados. Viçosa: UFV, 2008. 568p.

Tabela 1. Pares de primer polimórficos entre os parentais L30 e L31.

Nº	Primers	Nº	Primers	Nº	Primers	Nº	Primers
1	bmc 1714	8	umc 1042	15	bnlg 1006	22	bnlg 278
2	bnlg 1258	9	bnlg 1265	16	mmc 041	23	bnlg 381
3	umc 1117	10	bnlg 1621	17	mmc 0241		
4	phi 074	11	umc 1086	18	umc 1033		
5	phi 006	12	bnlg 1520	19	umc 1056		
6	umc 2082	13	umc 1037	20	bnlg 1250		
7	umc 1071	14	umc 1058	21	umc 1016		

[Digite texto]

Tabela 2. Relação dos marcadores de microssatélites associados à resistência a cercosporiose e as informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), grau de dominância (d/a), variância, porcentagem de recombinação (r), razão de máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade.

<i>Marcador</i>	<i>média</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d/a</i>	<i>ação<sup>e</sup></i>	<i>Var.</i>	<i>r</i>	<i>LR</i>	<i>Ho crítico</i>
umc1117	4.52	-2,13*	-1,7	0,78	DP	0,93	0.36	47,86	32,7
umc2082	4.54	-2,16*	-1,69	0,79	DP	0,89	0.31	52,25	41,7
umc1058	4.67	-1,91*	-1,75	0,92	DC	1,59	0.42	30,9	30,1

\*significativo a 5% de probabilidade

e:tipo de ação gênica: DP: dominância parcial, DC: dominância completa