



Mapeamento de QTL para Resistência à Ferrugem-polissora

Cynthia Maria Borges Damasceno¹
Maria Marta Pastina²
Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães³
Rodrigo Veras da Costa⁴
Luciano Viana Cota⁵
Dagma Dionísia da Silva⁶

A Ferrugem-polissora e sua Importância

Dentre as doenças que têm preocupado técnicos e especialistas envolvidos com a cultura do milho no Brasil, a ferrugem-polissora, causada pelo fungo *Puccinia polysora* Underwood, tem merecido grande destaque em razão da sua agressividade e do potencial de danos causados à cultura. Perdas na produtividade superiores a 50% têm sido relatadas com frequência nas principais regiões produtoras. Uma das principais medidas para o manejo dessa doença envolve o uso de cultivares resistentes. No entanto, esse fungo apresenta uma elevada variabilidade para patogenicidade, o que permite uma rápida adaptação às cultivares resistentes disponíveis no mercado. Vários genes de resistência à ferrugem-polissora foram reportados em milho (STOREY;

HOWLAND, 1957; ULLSTRUP, 1965; SCOTT et al., 1984; HOLLAND et al., 1998; LIU et al., 2003; CHEN et al., 2004), como revisado em Damasceno et al. (2015). Assim, é de grande importância um contínuo trabalho de pesquisa focado na busca por novos genes de resistência mais efetivos no controle da doença e de maior durabilidade. O programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo tem investido na fenotipagem de um grande número de genótipos para identificação de fontes de resistência. Em 2012, quatrocentos e noventa genótipos da Embrapa Milho e Sorgo foram fenotipados quanto a reação à ferrugem-polissora, sendo eles: 91 linhagens-elites, 164 híbridos entre linhagens de diferentes grupos heteróticos e 235 híbridos entre linhagens do mesmo grupo heterótico. Com base nessas análises, um grupo de 10 híbridos simples mais

¹Bióloga, Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, cynthia.damasceno@embrapa.br

²Eng.-Agrôn., D.Sc. em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, marta.pastina@embrapa.br

³Eng.-Agrôn., Ph.D em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, paulo.guimaraes@embrapa.br

⁴Eng.-Agrôn., D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

⁵Eng.-Agrôn., D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

⁶Eng.-Agrôn., D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

resistentes foi selecionado, cujas linhagens progenitoras foram contrastantes quanto à resistência. Assim, uma população F2 derivada do cruzamento entre as linhagens 521162 (suscetível) x 371081-4 (resistente) foi desenvolvida visando o mapeamento de regiões genômicas (QTLs, *Quantitative Trait Loci*) associadas com a resistência à ferrugem-polissora (DAMASCENO et al., 2015).

Genotipagem por Sequenciamento

Com o avanço e a redução dos custos das tecnologias de última geração em sequenciamento de DNA (*Next-Generation Sequencing*), é possível obter grandes números de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*-) para estudos de diversidade genética, construção de mapas genéticos, e, também, para a realização de estudos de associação genômica ampla (GWAS) (ELSHIRE et al., 2011).

A plataforma de genotipagem por sequenciamento ou GBS (*Genotyping by Sequencing*) se baseia em um sistema multiplex, de custo reduzido, e eficiente para detecção em larga escala de polimorfismos do tipo SNP ao longo do genoma, mesmo em espécies de alta diversidade e com genomas complexos. O método de GBS consiste na construção de bibliotecas genômicas, com redução de complexidade do genoma pelo uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação, evitando-se a porção repetitiva do genoma. O uso de *tags*, análogas a códigos de barra de identificação, permite realizar o sequenciamento em multiplex em uma plataforma de sequenciamento de última geração (por exemplo, Illumina), reduzindo consideravelmente os custos da tecnologia (ELSHIRE et al., 2011), e identificando uma alta densidade de marcadores do tipo SNP (em média, 60.000 SNPs/genoma). A genotipagem com marcadores de alta densidade e alta cobertura do genoma permite um maior

poder de resolução do mapeamento genético, contribuindo para a eficiência dos programas de melhoramento.

Mapeamento de QTLs

O termo *Quantitative Trait Loci* (QTLs) tem sido comumente utilizado para denominar regiões cromossômicas que contêm locos que controlam a expressão de caracteres poligênicos, ou seja, caracteres com padrão contínuo de variação fenotípica (FALCONER; MACKAY, 1996; LIU, 1998; LYNCH; WALSH, 1998). Com o advento dos marcadores moleculares, tornou-se possível o mapeamento de QTLs, que, além de estimar o número, a posição, os efeitos, as interações alélicas entre (epistasia) e dentro de locos (dominância), também permite um melhor entendimento da base genética da correlação entre caracteres (QTLs ligados ou pleiotrópicos) (FALCONER; MACKAY, 1996; MALOSETTI et al., 2007, 2008), e da interação entre QTLs e ambiente (MALOSETTI et al., 2004, 2008; VAN EEUWIJK et al., 2005, 2007; BOER et al., 2007; PASTINA et al., 2012; SABADIN et al., 2012).

De modo geral, o mapeamento de QTLs fundamenta-se no estabelecimento de associações entre caráter quantitativo (fenótipo) e marcadores moleculares (genótipo). Para isso, é necessário o desenvolvimento de uma população que apresenta variabilidade genética e elevado desequilíbrio de ligação (DOERGE, 2002). Além disso, são necessários métodos genético-estatísticos sofisticados, com forte suporte computacional, por causa da complexidade das análises, e também do grande volume de dados que têm sido gerados a partir das novas tecnologias de genotipagem em larga escala, como a genotipagem por sequenciamento (GBS).

Atualmente, vários métodos estatísticos estão disponíveis para o mapeamento de QTLs em

populações experimentais, sendo que os mais comuns envolvem o uso do teste *t* e análise de variância, regressão linear simples e múltipla, regressão não linear, mapeamento por intervalo simples e compostos, e mapeamento por múltiplos intervalos (WELLER, 1986; LANDER; BOTSTEIN, 1989; LANDE; THOMPSON, 1991; STUBER et al., 1992; ZENG, 1993, 1994; JANSEN; STAM, 1994; KAO et al., 1999). No entanto, o mapeamento de QTLs por múltiplos intervalos apresenta como vantagem, em relação aos demais métodos, o fato de buscar simultaneamente múltiplos QTLs, o que permite estimar, além do número, posição e efeitos, as interações entre QTLs (epistasia).

Genes e QTLs de efeito maior associados com a resistência à ferrugem-polissora têm sido identificados no braço curto do cromossomo 10 de milho, nas mais diversas populações de mapeamento (SCOTT et al., 1984; HOLLAND et al., 1998; LIU et al., 2003; CHEN et al., 2004; ZHOU et al., 2007; JINES et al., 2007). Por exemplo, a partir do cruzamento entre as linhagens endogâmicas P25 e Qi319, Liu et al. (2003) e Chen et al. (2004) identificaram dois genes dominantes, *RppP25* e *RppQ*, localizados no braço curto do cromossomo 10 de milho. Holland et al. (1998) e Jines et al. (2007) identificaram QTLs associados à resistência à ferrugem-polissora utilizando mapeamento em famílias $F_{2:3}$ ou linhagens recombinantes (RILs), respectivamente. Em ambos os casos, o QTL que explica a maior parte da variância foi mapeado no cromossomo 10, próximo ao loco *Rpp9*. Holland et al. (1998) também identificaram mais dois QTLs de efeito menor, localizados nos cromossomos 3 e 4. Esses estudos fornecem informações importantes com grande potencial de utilização na seleção assistida para resistência à ferrugem-polissora em programas de melhoramento. Marcadores moleculares fortemente ligados aos locos de resistência podem diminuir a necessidade das avaliações fenotípicas para identificar e

selecionar plantas resistentes, o que contribui para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento genético.

Resultados

Análise Fenotípica da População de Mapeamento

Uma progênie de 250 famílias $F_{2:3}$ derivadas do cruzamento entre as linhagens 371081-4 (resistente) e 531542 (suscetível) foi fenotipada para resistência à ferrugem-polissora em casa de vegetação, considerando o delineamento de blocos aumentados com uma repetição. Os genitores da população (371081-4 e 531542), o indivíduo F_1 e dois híbridos comerciais foram adicionados como testemunhas em cada bloco incompleto. As análises fenotípicas foram realizadas a partir da abordagem de modelos mistos, considerando os efeitos de blocos e genótipos como fixo e aleatório, respectivamente. A herdabilidade da resistência na progênie $F_{2:3}$ foi de 0,73, sendo que os efeitos de blocos e de genótipos foram significativos a 1% de probabilidade a partir dos testes de Wald e LRT (Likelihood Ratio Test), respectivamente. As médias preditas (Best Linear Unbiased Predictions, BLUP) foram utilizadas no mapeamento de QTLs.

Genotipagem por SNPs

Marcadores moleculares SNPs foram obtidos via genotipagem por sequenciamento (GBS) para a progênie F_2 derivada do cruzamento 371081-4 x 531542. O DNA genômico de 250 indivíduos F_2 foi digerido com a enzima *ApeKI* e sequenciado no equipamento Genome Analyzer II (Illumina, San Diego, Califórnia, Estados Unidos) no Institute for Genomic Diversity da Universidade de Cornell, Ithaca, Estados Unidos. Os dados brutos do sequenciamento foram alinhados em relação ao genoma de referência do milho (B73 RefGen_v3) utilizando o software BWA (LI;

DURBIN, 2009). Os SNPs foram identificados por meio do pipeline GBS disponível no software TASSEL (BRADBURY et al., 2007), sendo obtidos 937.586 SNPs ao longo dos dez cromossomos do milho. Os dados perdidos foram imputados utilizando o software FILLIN (SWARTS et al., 2014). Após a imputação, os SNPs foram filtrados com porcentagem de dados perdidos superior a 20% e com distorção em relação a segregação esperada (1:2:1) para uma progênie F_2 , considerando 5% de probabilidade e correção de Bonferroni para múltiplos testes. Assim, um total de 3.241 marcadores permaneceram para as análises posteriores.

Mapeamento de QTLs

O mapeamento de QTLs foi realizado com base na abordagem de marcas individuais via regressão linear (SOLLER et al., 1976), utilizando o pacote R/qtl (BROMAN et al., 2003), disponível no software R (R CORE TEAM, 2016). O nível de significância foi obtido com 1.000 permutações para cada marcador (DOERGE; CHURCHILL, 1996), sendo

obtido o LOD de 4,66, considerando 5% de probabilidade. Assim, um QTL altamente significativo (LOD 34,06) foi mapeado na posição 120,92 Mb do cromossomo 6. O QTL explica aproximadamente 55% da variância fenotípica da resistência à ferrugem-polissora, e ainda não foi reportado QTL para resistência a essa doença na região-alvo. Na Tabela 1, são também apresentados os efeitos aditivo e de dominância, e o intervalo de confiança para o QTL mapeado.

Atualmente, está em andamento a análise de possíveis genes candidatos presentes no intervalo de confiança do QTL, sendo essa região um importante alvo para a seleção assistida visando o aumento da resistência à ferrugem-polissora em milho.

Tabela 1. Efeitos aditivo e de dominância, cromossomo, posição, LOD, porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL e intervalo de confiança para o QTL identificado para resistência à ferrugem-polissora, utilizando análise de marcas individuais via regressão linear.

QTL	Cromossomo	Posição (Mb)	Efeito Aditivo	Efeito de Dominância	LOD	% da Variância Fenotípica explicada pelo QTL	Intervalo de Confiança (LOD – 1,5)	
							LI	LS
S6_120917191	6	120,92	0,65	-0,21	34,06	54,89	118,60	128,13

LI: limite inferior; LS: limite superior

Referências

- BOER, M.; WRIGHT, D.; FENG, L.; PODLICH, D.; LUO, L.; COOPER, M.; VAN EEUWIJK, F. A mixed model QTL analysis for multiple environment trial data using environmental covariables for QTLxE, with an example in maize. **Genetics**, Austin, v. 177, p. 1801-1813, 2007.
- BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2633-2635, 2007.
- BROMAN, K. W.; WU, H.; SEN, S.; CHURCHILL, G. A. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. **Bioinformatics**, v. 19, p. 889-890, 2003.
- CHEN, C. X.; WANG, Z. L.; YANG, D. E.; YE, C. J.; ZHAO, Y. B.; JIN, D. M.; WENG, M. L.; WANG, B. Molecular tagging and genetic mapping of the disease resistance gene *RppQ* to southern corn rust. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 945-950, 2004.
- DAMASCENO, C. M. B.; PASTINA, M. M.; GUIMARAES, P. E. de O.; COSTA, R. V. da; COTA, L. V.; SILVA, D. D. da **Identificação de fontes de resistência à ferrugem Polissora em milho e desenvolvimento de população de mapeamento**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 13 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 212).
- DOERGE, R. W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, p. 43-52, 2002.
- DOERGE, R. W.; CHURCHILL, G. A. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, Austin, v. 142, n. 1, p. 285-294, 1996.
- ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S.; MITCHELL, S. E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e19379, 2011.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. New York: Longman, 1996. 464 p.
- HOLLAND, J. B.; UHR, D. V.; JEFFERS, D.; GOODMAN, M. M. Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical-by-corn-belt maize populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 232-241, 1998.
- JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 185-199, 1994.
- JINES, M. P.; BALINT-KURTI, P.; ROBERTSON-HOYT, L. A.; MOLNAR, T.; HOLLAND, J. B.; GOODMAN, M. M. Mapping resistance to Southern rust in a tropical by temperate maize recombinant inbred topcross population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, p. 659-667, 2007.
- KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 152, p. 1203-1216, 1999.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Austin, v. 124, p. 743-756, 1991.
- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Austin, v. 21, p. 185-199, 1989.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1754-1760, 2009.

LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611 p.

LIU, Z. X.; WANG, S. C.; DAI, J. R.; HUANG, L. J.; CAO, H. H. Studies of genetic analysis and SSR linked marker location of gene resistance to southern rust in inbred line P25 of maize. **Acta Genetica Sinica**, Peiping, v. 30, p. 706-710, 2003.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 980 p.

MALOSETTI, M.; VOLTAS, J.; ROMAGOSA, I.; ULLRICH, S. E.; VAN EEUWIJK, F. A. Mixed models including environmental variables for studying QTL by environment interaction. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, p. 139-145, 2004.

MALOSETTI, M.; VAN DER LINDEN, C. G.; VOSMAN, B.; VAN EEUWIJK, F. A. A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. **Genetics**, Austin, v. 175, p. 879-889, 2007.

MALOSETTI, M.; RIBAUT, J. M.; VARGAS, M.; CROSSA, J.; VAN EEUWIJK, F. A. A multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 161, p. 241-257, 2008.

PASTINA, M. M.; MALOSETTI, M.; GAZAFFI, R.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G. R. A.; OLIVEIRA, K. M.; PINTO, L. R.; SOUZA, A. P.; VAN EEUWIJK, F. A.; GARCIA, A. A. F. A mixed model QTL analysis for sugarcane multiple-harvest-location trial data. **Theoretical and**

Applied Genetics, Berlin, v. 124, p. 835-849, 2012.

R CORETEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 13 out. 2016.

SABADIN, P. K.; MALOSETTI, M.; BOER, M. P.; TARDIN, F. D.; SANTOS, F. G.; GUIMARÃES, C. T.; GOMIDE, R. L.; ANDRADE, C. L. T.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; CANIATO, F. F.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G. R. A.; OLIVEIRA, B. F.; SCHAFFERT, R. E.; GARCIA, A. A. F.; VAN EEUWIJK, F. A.; MAGALHAES, J. V. Studying the genetic basis of drought tolerance in sorghum by managed stress trials and adjustments for phenological and plant height differences. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 124, p. 1389-1402, 2012.

SCOTT, G. E.; KING, S. B.; ARMOUR, J. W. J. Inheritance of resistance to southern corn rust in maize *Zea mays* Populations. **Crop Science**, Madison, v. 24, p. 265-267, 1984.

SOLLER, M.; BRODY, T.; GENIZI, A. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 47, p. 35-39, 1976.

STOREY, H. H.; HOWLAND, A. K. Resistance in maize to the tropical American rust fungus, *Puccinia polysora* Underw. I. Genes Rpp1 and Rpp2. **Heredity**, Edinburg, v. 11, p. 289-301, 1957.

STUBER, C. W.; LINCOLN, S. E.; WOLFF, D. W.; HELENT-JARIS, T.; LANDER, E. S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Austin, v. 132, p. 823-839, 1992.

SWARTS, K.; LI, H.; NAVARRO, J. A. R.; AN, D.; ROMAY, M. C.; HEARNE, S.; ACHARYA, C.; GLAUBITZ, J. C.; MITCHELL, S.; ELSHIRE, R. J.; BUCKLER, E. S.; BRADBURY, P. J. Novel methods to optimize genotypic imputation for low-coverage, next-generation sequence data in crop plants. **The Plant Genome**, v. 7, n. 3, p. 1-12, 2014.

ULLSTRUP, A. J. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to an American race of *Puccinia polysora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, p. 425-428, 1965.

VAN EEUWIJK, F. A.; MALOSSETTI, M.; YIN, X.; STRUIK, P. C.; STAM, P. Statistical models for genotype by environment data: From conventional ANOVA models to eco-physiological QTL models. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 56, p. 883-894, 2005.

VAN EEUWIJK, F. A.; MALOSSETTI, M.; BOER, M. P. Modelling the genetic basis of response curves underlying genotype x environment interaction. In: SPIERTZ, J. H. J.; STRUIK, P. C.; VAN LAAR, H. H. (Ed.). **Scale and complexity in plant systems research: gene-plant-crop relations**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 115-126.

WELLER, J. I. Maximum likelihood techniques for the mapping and analyses of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics**, Washington, v. 42, p. 627-640, 1986.

ZENG, Z. B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 10972-10976, 1993.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1457-1468, 1994.

ZHOU, C. J.; CHEN, C. X.; CAO, P. X. Characterization and fine mapping of RppQ, a resistance gene to southern corn rust in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 278, p.723-728, 2007.

Comunicado Técnico, 218

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
 www.embrapa.br/fale-conosco
1ª edição
Versão Eletrônica (2016)

MINISTÉRIO DA
 AGRICULTURA, PECUÁRIA
 E ABASTECIMENTO



Comitê de publicações

Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Antonio Cláudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda de Castro.
Revisão de texto: Antonio Cláudio da Silva Barros.
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.

Expediente