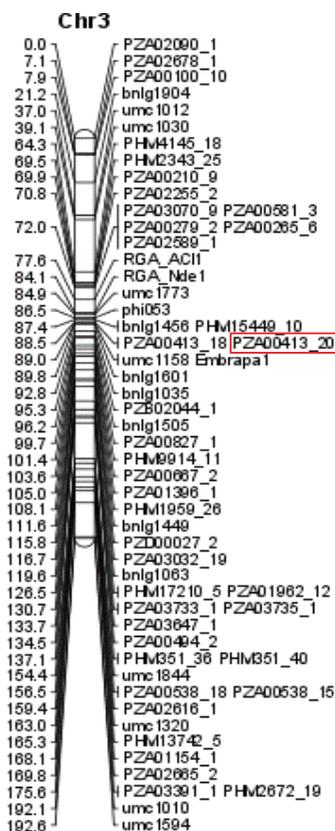


Marcador SNP Associado ao QTL de Efeito Maior Conferindo Resistência ao Mosaico-Comum-do-Milho



Planta de milho sintomática para a virose mosaico comum do milho, agente causal *Sugarcane mosaic virus* (SCMV).

Figura à direita: Grupo de ligação ao longo do cromossomo 3, mostrando a posição do SNP (PZA00413_20, circundado em vermelho) associado ao QTL de efeito maior (em azul) conferindo resistência a essa virose.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
213**

**Marcador SNP Associado ao QTL de
Efeito Maior Conferindo Resistência
ao Mosaico-Comum-do-Milho**

Isabel Regina Prazeres de Souza
Marcos de Oliveira Pinto

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2020*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
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/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Maria Cristina Dias Paes.

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Foto e Ilustração da capa
Isabel Regina Prazeres de Souza.

1ª edição
Publicação digital (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Souza, Isabel Regina Prazeres de.

Marcador SNP associado ao QTL de efeito maior conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho / Isabel Regina Prazeres de Souza, Marcos de Oliveira Pinto. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

14 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 213).

1. Marcador molecular. Genótipo. 3. Genética molecular. 4. Doença de planta. I. Pinto, Marcos de Oliveira. II. Título. III. Série.

CDD 575.1 (21. ed.)

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução.....	08
Material e Métodos	09
Resultados e Discussão	10
Conclusão.....	12
Referências	13

Marcador SNP Associado ao QTL de Efeito Maior Conferindo Resistência ao Mosaico-Comum-do-Milho¹

Isabel Regina Prazeres de Souza¹

Marcos de Oliveira Pinto²

Resumo – O mosaico-comum está entre as viroses mais importantes da cultura do milho no Brasil e no globo. No nosso País, o agente causal do mosaico-comum-do-milho foi identificado como sendo uma nova estirpe de SCMV, pertencente ao gênero Potyvirus. Para que seja possível a identificação de genótipos resistentes, de forma segura sobre a seleção fenotípica, existe a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). A SAM permite integrar a genética molecular com a seleção fenotípica, através da busca indireta por alelos desejáveis por meio do uso de marcadores ligados. A vantagem dos marcadores moleculares é que eles permitem comparar genótipos, em diferentes ambientes, tipos de tecido ou estágio de desenvolvimento da planta. Dentre os tipos de marcadores moleculares tem-se o SNP (polimorfismo de nucleotídeo único), o qual é baseado em variação em um único nucleotídeo em ponto específico do DNA. Em milho, Souza et al. (2019), utilizando populações $F_{2,3}$ derivadas do cruzamento entre as linhagens contrastantes quanto à resistência ao mosaico comum, L19 (suscetível) e L18 (resistente), mapearam no cromossomo 3 um QTL de efeito maior conferindo resistência a essa virose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação do marcador SNP PZA00413_20 (C/A) ao QTL de efeito maior, conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho. Na seleção de indivíduos das progênies de retrocruzamentos da linhagem L19, com a fonte de resistência L18, verificou-se que, por meio da fenotipagem, os genótipos homozigotos CC e o heterozigoto CA do SNP foram resistentes, e os genótipos homozigotos AA foram suscetíveis. Dessa forma, a genotipagem empregando o marcador SNP (C/A)

¹ Eng.-Agr., PhD. em Plant Science, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo;

² Bioquímico, Dr. em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Milho e Sorgo

permitiu a identificação dos genótipos resistentes, demonstrando sua associação ao QTL de efeito maior.

Termos para indexação: Potyvirus, *Zea mays* L., *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), seleção assistida por marcadores (SAM).

SNP Marker Associated with Major Effect QTL Conferring Resistance to Maize Common Mosaic.

Abstract – The mosaic is among the most important virus diseases affecting maize and sorghum in Brazil and in the world. In our country, the causal agent of the maize common mosaic was identified as a new SCMV strain of the genus Potyvirus. In order to allow the identification of resistant genotypes, in a safety way over the phenotypic selection, there is the molecular marker assisted selection. The advantage of molecular markers is to allow comparing genotypes, in different environments, types of tissue or stage of plant development. Among the types of molecular markers there is the SNP (single nucleotide polymorphisms), which is based on variation of a single nucleotide at a specific point in the DNA. In maize, Souza et al. (2019), using F2:3 populations derived from the crossing between inbred lines L19 (susceptible) and L18 (resistant), contrasting in their resistance to maize common mosaic, mapped on chromosome 3 a major effect QTL conferring resistance to this virus disease. The objective of this study was to evaluate the association of the SNP marker PZA00413_20 (C / A) with the major effect QTL, conferring resistance to the maize common mosaic. In the selection of individuals from backcross progenies of the L19 line, with the resistance source L18, we verified by phenotyping that the homozygous genotypes CC and the heterozygous CA of the SNP were resistant, and the homozygous genotypes AA were susceptible. Thus, genotyping using the SNP marker (C/A) allowed the identification of resistant genotypes, demonstrating its association with major effect QTL.

Index terms: Potyvirus, *Zea mays* L., Sugarcane mosaic virus (SCMV), *Marker assisted selection (MAS)*

Introdução

O *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) está entre as principais viroses que infectam o milho no Brasil (Gonçalves et al., 2007a). Além disso, outro aspecto importante é que incide sobre outras gramíneas cultivadas, como a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) (Gonçalves et al., 2007b, 2011; Barboza et al., 2008) e o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Espejel et al., 2006), além de infectar várias outras espécies como os capins massambará e colonião (Almeida, 1988).

O mosaico-comum-do-milho é causado por vírus do gênero Potyvirus (Kitajima, 1979), e seis espécies de potyvirus têm sido identificadas no globo, causando sintomas de mosaico em uma variedade de cultura de grãos e gramíneas, incluindo: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) (Shukla et al., 1994), *Zea mosaic virus* (ZeMV) (Sheifers et al., 2000), e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) (Deng et al., 2008). No Brasil, o SCMV tem sido, até o presente, o agente causal do mosaico em milho (Souza et al., 2012a, 2012b; Gonçalves et al., 2011).

Os sintomas do mosaico-comum podem ser facilmente identificados em plantas de milho: formam-se áreas cloróticas entremeadas com áreas verdes nas folhas, em padrão de mosaico.

Os potyvirus são transmitidos de maneira não persistente por vários afídeos, e o vetor mais eficiente na cultura do milho é o *Rhopalosiphum maidis* L. (Hemiptera: Aphididae) (Edwardson; Christie, 1991). Dessa forma, o manejo da doença por meio de controle químico não é efetivo, e a utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controle do vírus (Souza et al., 2008). A identificação de QTL de efeito maior associado à resistência à virose mosaico-comum em milho é importante para o desenvolvimento de cultivares resistentes (Souza et al., 2008, 2019). Um QTL de efeito maior conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho, causado pelo SCMV, foi identificado por Souza et al. (2019) no cromossomo 3, explicando uma grande proporção da variância genética, 50% e 70%, em avaliações em dois anos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação do marcador SNP PZA00413_20 (C/A), localizado na região flanqueadora, ao QTL de efeito maior conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho.

Material e Métodos

Genótipos

Foram utilizados os indivíduos das progênies RC₂S₂ derivadas do cruzamento das linhagens parentais L18 (fonte da resistência ao mosaico-comum) e L19 (suscetível), e depois foi usado o processo de retrocruzamentos com a linhagem suscetível, para recuperação do genoma. As plantas das gerações segregantes foram fenotipadas por meio de inoculações com o SCMV e genotipadas por meio do marcador SNP PZA00413_20 (C/A) localizado na região flanqueadora do QTL.

Inoculações

As inoculações, nos diferentes ciclos de retrocruzamentos, foram realizadas empregando a solução contendo SCMV mais carborundo na fricção mecânica da parte mediana das folhas das plântulas de milho, iniciando-se 15 dias após germinação, conforme descrito por Souza et al. (2008). Três inoculações foram realizadas em intervalo semanal.

As avaliações fenotípicas iniciaram-se 15 dias após a primeira inoculação e foram realizadas semanalmente por um período de um mês. Foi adotada a avaliação para mosaico-comum baseando-se na presença ou ausência de sintomas.

Genotipagem por marcador molecular SNP PZA00413_20 (C/A) localizado na região flanqueadora do QTL maior associado à resistência ao mosaico-comum em milho

O DNA genômico foi extraído de tecido foliar de plantas ou plântulas de milho pelo método CTAB, descrito por Saghai-Marrof et al. (1984), quantifi-

cado por meio do NanoDrop 1000 (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA) e diluído para a concentração de 10 ng/ μ L.

A reação de amplificação foi realizada com 3 μ L de KASP Master Mix 2X, 30 ng de DNA e 0,084 μ L de KASP Assay Mix 54X. Os ciclos de amplificação foram de uma desnaturação inicial a 94 °C durante 15 min, seguida por 10 ciclos a 94 °C durante 20 s, 61 °C a 55 °C durante 1 min e um adicional de 26 ciclos de amplificação a 94 °C durante 20 s e 55 °C durante 1 min. A intensidade da fluorescência das amostras foi quantificada por meio do leitor de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech, Hanns-Martin-Schleyer Germany) utilizando ROX na normalização do sinal. A genotipagem foi realizada empregando o software KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics Ltd, Hoddesdon, Herts, UK), **Figura 1**.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os resultados de linhagens e progênes de milho quanto à fenotipagem ao mosaico-comum e à genotipagem empregando o marcador SNP PZA00413_20 (C/A) localizado na região flanqueadora do QTL de efeito maior, conferindo resistência ao mosaico-comum em milho. Verifica-se que o genótipo homozigoto CC do SNP está associado à resistência e o genótipo homozigoto AA associado à suscetibilidade ao mosaico causado pelo SCMV. O genótipo heterozigoto CA do híbrido simples F1 e dos indivíduos 130G8_22 e 130G8_52, da progênie, está associado à resistência.

Esses resultados demonstram a importância de se identificar que o marcador PZA00413_20 (C/A), localizado na região flanqueadora, está associado ao QTL conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho. Além disso, esse marcador está localizado dentro do gene predito GRMZM2G122443, codificando uma glucosidase II. Os resultados obtidos permitirão a seleção assistida empregando esse marcador SNP na identificação dos indivíduos resistentes e suscetíveis ao mosaico, quando do desenvolvimento de linhagens e cultivares resistentes empregando a fonte de resistência L18.

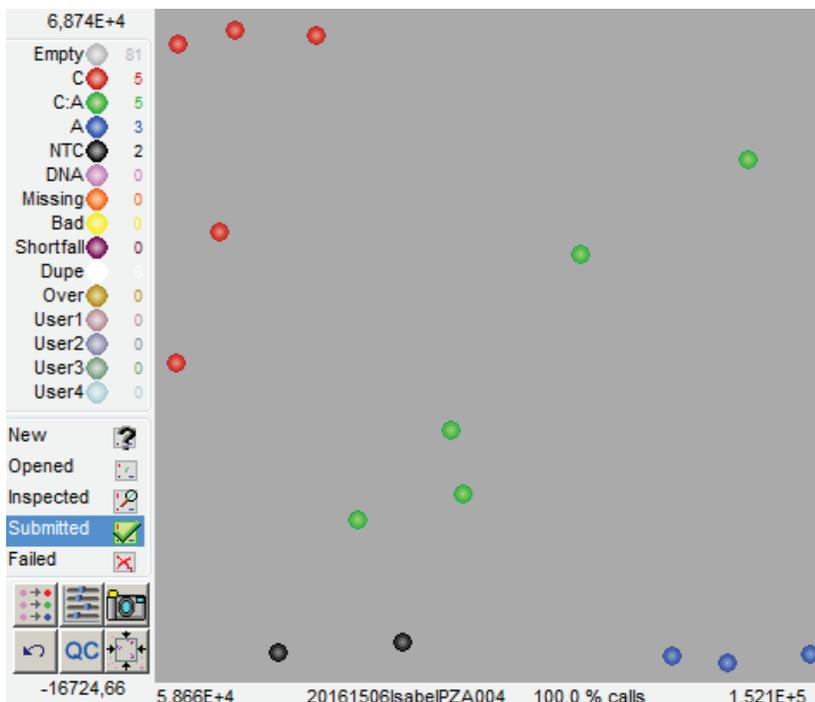


Figura 1. Genotipagem de linhagens, L18 (resistente) e L19 (suscetível) e de indivíduos das progênes de RC₂S₂ derivadas do cruzamento da L18 e L19, tendo como parental recorrente a L19, empregando o marcador SNP PZA00413_20 (C/A) localizado na região flanqueadora do QTL conferindo resistência ao mosaico-comum. Em azul estão representados os indivíduos portadores do genótipo homocigoto do SNP AA, derivado do parental L19; em verde estão representados os indivíduos heterocigotos do SNP CA; em vermelho estão representados os indivíduos portadores do genótipo homocigoto do SNP CC, derivado do parental L18; e em preto está representado o controle negativo (mix de reação adicionado de água).

Tabela 1. Linhagens de milho, L18 (fonte do QTL conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho) L19 (suscetível), híbrido F1, e indivíduos das progênes de RC₂S₂ derivadas do cruzamento de L18 e L19, tendo como parental recorrente a L19, genotipados com o marcador SNP PZA00413_20 (C/A), localizado na região flanqueadora do QTL, e fenotipagem quanto à resistência ao mosaico-comum causado pelo SCMV.

Genótipo	Genotipagem	Fenótipo
L18	C:C	Resistente
L19	A:A	Suscetível
F1 (L18 x L19)	C:A	Resistente
130G8_02	C:C	Resistente
130G8_03	A:A	Suscetível
130G8_09	A:A	Suscetível
130G8_15	C:C	Resistente
130G8_20	A:A	Suscetível
130G8_22	C:A	Resistente
130G8_30	C:A	Resistente
130G8_61	C:C	Resistente
130G8_52	C:A	Resistente

Conclusão

Por meio da genotipagem empregando o SNP PZA00413_20 (C/A) e fenotipagem para resistência, foi possível identificar a associação do marcador ao QTL de efeito maior, conferindo resistência ao mosaico-comum-do-milho. Os genótipos homocigotos CC e o heterocigoto CA do SNP foram resistentes, e os genótipos homocigotos AA foram suscetíveis. A associação da genotipagem do SNP PZA00413_20 (C/A) à fenotipagem evidenciou a importância de poder utilizar esse marcador na seleção de genótipos resistentes, quando do emprego da fonte de resistência L18.

Referências

ALMEIDA, A. C. L. **Deteção, caracterização e aspectos epidemiológicos do complexo viral do mosaico-comum-do-milho (*Zea mays* L.)**. 1998. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1998.

BARBOZA, A. A. L.; SOUTO, E. R.; CARNELOSSI, P. R.; MARCUZ, F. S.; MARRAFON, M. A. Propriedades de isolados virais de *Saccharum* spp., causadores de mosaico em cana-de-açúcar no Paraná e São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 109-112, 2008.

DENG, C. L.; WANG, W. J.; WANG, Z. Y.; JIANG, X.; CAO, Y.; ZHOU, T.; WANG, F. R.; LI, H.F.; FAN, Z. F. The genomic sequence and biological properties of *Pennisetum mosaic virus*, a novel monocot-infecting potyvirus. **Archives of Virology**, v. 153, p. 921-927, 2008.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. **The potyvirus group**. Gainesville: Florida Agricultural Experiment Station, 1991. (Monograph, 16).

ESPEJEL, F.; JEFFERS, D.; NOA-CARRAZANA, J. C.; RUIZ-CASTRO, S.; SILVA-ROSALES, L. Coat protein gene sequence of a Mexican isolate of Sugarcane mosaic virus and its infectivity in maize and sugarcane plants. **Archives of Virology**, v. 151, p. 409-412, 2006.

GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo *Sugarcane mosaic virus* e *Maize rayado fino virus* provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007a.

GONÇALVES, M. C.; SANTOS, A. S.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M.; HAKAKAVA, R. Caracterização de um isolado do *Sugarcane mosaic virus* que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 32-39, 2007b.

GONÇALVES, M. C.; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de *Sugarcane mosaic virus*, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 362-369, 2011.

KITAJIMA, E. W. Citopatologia e localização de vírus do milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infectadas e nos vetores. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 241-254, 1979.

SHEIFERS, D. L.; SALOMON, R.; MARIE-JEANNE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y. M.; STANDING, K. G. Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology**, v. 90, p. 505-513, 2000.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

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**, v. 11, n. 2, p. 120-135, 2012a.

SOUZA, I. R. P.; CARNEIRO, N. P.; GIOLITTI, F.; LENARDON, S. L.; SABATO, E. O.; GOMES, E. A.; NODA, R.; SOUZA, F. A. de. **Análise do N-terminal da proteína capsidial de SCMV infectando milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012b. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 59).

SOUZA, I. R. P. de; GUILHEN, J. H. S.; ANDRADE, C. de L. T. de; PINTO, M. de O.; LANA, U. G. de P.; PASTINA, M. M. Major effect qtl on chromosome 3 conferring maize resistance to *Sugarcane mosaic virus*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 18, n. 3, p. 322-339, 2019.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARÃES, C. T. M.; SCHUESTER, I.; OLIVEIRA, E.; REDINBAUGH, M. Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. **Hereditas**, v. 145, n. 4, p. 167-173, 2008.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

