

MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA QUANTITATIVA A *Puccinia polysora* EM MILHO*

KÁTIA R. BRUNELLI^{1**}, HERBERTE P. SILVA² & LUIS E. ARANHA CAMARGO¹

¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ - USP, Cx. postal 09, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, fax: (19) 434-4839, e-mail: leacamar@carpa.ciagri.usp.br; ²Empresa Brasileira de Sementes Ltda (EBS)/Dow Agrosociences, Rod Anhanguera Km 296, Cx. postal 81 CEP 14140-000, Cravinhos, SP, fax: (16) 651-1529, e-mail: herbertsilva@zipmail.com.br

(Aceito para publicação em 09/01/2002)

Autor para correspondência: Luis Eduardo Aranha Camargo

BRUNELLI, K.R., SILVA, H.P. & CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho. Fitopatologia Brasileira 27:134-140. 2002.

RESUMO

Este trabalho objetivou identificar marcadores microsatélites ligados a genes de resistência a *Puccinia polysora* e verificar o efeito fenotípico destes nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesão. Foram utilizadas duas linhagens (Z-95 e Z-93) contrastantes em níveis de resistência à doença, o híbrido (Z-95 x Z-93) e uma população F₂ obtida da autofecundação deste. Esses indivíduos foram fenotipados para resistência à doença em dois ensaios a campo e genotipados para 142 marcadores microsatélites. Para agilizar a genotipagem, o método de análise de segregantes agrupados (ASA) foi utilizado. Marcadores potencialmente ligados a genes de resistência identificados por este método foram utilizados para genotipar 165 indivíduos segregantes e confirmar a existência de ligação. Dois marcadores, *Phi 65* e *Phi 28*, ambos no cromossomo 9, mostraram-se significativamente associados ($p < 0,000001$ e $p < 0,000078$,

respectivamente) a um QRL (locos de resistência quantitativa) a *P. polysora*. A associação entre QRL e marcadores explicou, respectivamente, 12,9% e 5,10% da variação fenotípica para resistência. Em um terceiro ensaio em casa de vegetação, 94 plantas foram inoculadas com suspensão de uredósporos e avaliadas 15 dias após a inoculação quanto ao número de lesões e o comprimento de dez lesões. Estas plantas foram genotipadas com os marcadores *Phi 65* e *Phi 28*. Somente *Phi 65* mostrou-se significativamente associado ($P < 0,000032$) à redução no número de lesões. Nenhum marcador mostrou associação significativa com a variável comprimento de lesão. Por estarem ligados ao mesmo marcador, sugere-se que o QRL identificado nos ensaios a campo seja o mesmo identificado em casa de vegetação.

Palavras-chave adicionais: *Zea mays*, genes de resistência, mapeamento genético, ferrugem polissora, marcador molecular.

ABSTRACT

Mapping of resistance genes to *Puccinia polysora* in maize

The objectives of this study were to identify microsatellite markers linked to resistance gene of resistance to *Puccinia polysora* and to estimate the phenotypic effect of these genes on two monocyclic variables lesion, number and length. Two inbred lines with different degrees of resistance (Z-95 and Z-93), the hybrid (Z-95 X Z-93) and F₂ plants derived by selfing this hybrid were phenotyped for disease resistance, in two field trials and genotyped for 142 microsatellite markers using bulked segregant analysis (BSA). The molecular markers putatively linked to the disease resistance genes identified by this method were used to genotype 165 segregant individuals and to confirm linkage. Two markers, *Phi 65* and *Phi 28*, both located on chromosome nine, were significantly associated

($p < 0,000001$ and $p < 0,000078$) with a QRL (quantitative resistance loci) to *P. polysora*. The association explained 12.9 and 5.10% of the phenotypic variance in resistance for *Phi 65* and *Phi 28*, respectively. In a third trial performed in the greenhouse, 94 plants were inoculated with a uredospore suspension and evaluated 15 days after inoculation for the total number of lesions and the length of ten lesions. These plants were genotyped with *Phi 65* and *Phi 28*. Only *Phi 65* showed a significant association with lesions number ($p < 0,000032$). No marker showed significant association with lesion length. It is suggested that the QRL identified in the field trials is the same identified in the greenhouse experiment, since they are linked to the same marker.

INTRODUÇÃO

A ferrugem de polissora, causada pelo fungo *Puccinia polysora* Underw, foi, durante toda a década de 90, a doença foliar mais importante da cultura do milho. Relatos mostram perdas de 45 - 50% sob condições favoráveis (Rodrigues-

Arnon *et al.*, 1980). No Brasil, estas perdas podem atingir até 44,6% da produção em híbridos suscetíveis (Pinho *et al.*, 1999a). No patossistema milho/*P. polysora*, há relatos da existência de vários monogenes controlando resistência a este patógeno. Ullstrup (1977) demonstrou a existência de 11 monogenes de resistência, todos raça-específicos. Outro tipo de resistência, chamada poligênica, oligogênica ou "slow-rusting", também foi relatada. Essa resistência tem como característica a redução da taxa da epidemia através da dimi-

*Tese de mestrado do primeiro autor. ESALQ, Piracicaba (2000).

**Bolsista Fapesp

nuição do número e tamanho das lesões, da diminuição da produção de uredósporos e do aumento do período de latência. Isso faz com que a população do patógeno seja drasticamente reduzida, diminuindo a quantidade de inóculo e conseqüentemente da doença (Scott & Zummo, 1989; Holland *et al.*, 1998). Pinho *et al.* (1999b) demonstraram que algumas destas características possuem alta herdabilidade (cerca de 87%), indicando que a seleção pode ser altamente efetiva.

Marcadores moleculares vêm contribuindo significativamente para identificar e caracterizar os efeitos fenotípicos de genes de resistência a pragas e doenças na cultura do milho (Simcox & Bennetzen, 1993; Lübberstedt *et al.*, 1998; Kerns *et al.* 1999). Vários são os marcadores moleculares usados em estudos de mapeamento, destacando-se entre eles os microssatélites (Yu *et al.*, 1994; Chin *et al.*, 1996). Microssatélites são seqüências de dois a seis nucleotídeos repetidas em tandem, altamente polimórficas, codominantes e flanqueadas por regiões conservadas e não repetidas de DNA. Em adição a isto, essas seqüências são distribuídas de maneira aleatória em genomas de organismos eucariotos (Hearne *et al.*, 1992). Tomadas em conjunto essas qualidades favorecem a utilização desses marcadores em estudos de mapeamento.

Para facilitar e agilizar o mapeamento de genes com marcadores, Michelmore *et al.* (1991) propuseram o uso da análise dos segregantes agrupados (ASA). Essa técnica consiste em comparar duas amostras de DNA obtidas a partir do agrupamento do ácido nucléico de indivíduos fenotipicamente extremos de uma população segregante. Esses agrupamentos devem conter quantidades iguais de DNA de indivíduos semelhantes para um dado fenótipo. Os agrupamentos simulam linhagens quase-isogênicas, pois teoricamente diferem entre si somente em regiões genômicas ligadas a genes que controlam a característica fenotípica inicialmente utilizada para selecionar plantas extremas e compor os agrupamentos. Assim, ao genotipar os agrupamentos com marcadores distribuídos pelo genoma, somente aqueles ligados aos genes acima mencionados revelarão polimorfismos entre os agrupamentos. Os autores defendem a aplicação do método por ele promover uma rápida cobertura do genoma, sendo eficiente na localização de marcadores ligados a genes de interesse. Outra vantagem do método é proporcionar uma economia em reagentes, pois agrupa-se em apenas duas amostras de DNA os indivíduos utilizados no estudo. Há vários relatos na literatura que comprovam a utilidade desta técnica para localização de genes de resistência. Kesseli *et al.* (1993) utilizaram o método com sucesso para identificar marcadores RAPD ligados a genes de resistência a *Plasmopara lactucae-radicis* Stanghellini & Gilbertson, em alface (*Lactuca sativa* L.). Chagué *et al.* (1996) utilizaram ASA para identificar quatro marcadores RAPD ligados a um gene de resistência ao vírus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Este trabalho visou identificar marcadores microssatélites ligados a QRLs - locos de resistência quantitativa (Young, 1996) - a ferrugem polissora, em uma população F₂ de milho e verificar se os QRLs encontrados exercem algum

efeito fenotípico nas variáveis monocíclicas tamanho e número de lesão.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os genótipos utilizados neste estudo pertencem ao programa de melhoramento da Empresa Brasileira de Sementes (EBS) Ltda./Dow Agrosiences e constaram de duas linhagens (Z-93 e Z-95) em avançado grau de endogamia, o híbrido (Z-95 x Z-93) e plantas F₂ provenientes da autofecundação deste híbrido. A linhagem Z-93 é uma linhagem superprecoce de grão dentado amarelo, oriunda de materiais temperados derivados do sintético Iowa Stiff Stalk Synthetic. Essa fonte genética é largamente utilizada em programas de melhoramento dos Estados Unidos, Europa e Argentina. Por sua vez, Z-95 é uma linhagem precoce de grão laranja, oriunda de um sintético proveniente de genótipos tropicais flints de coloração laranja. Em avaliações preliminares realizadas pela empresa, Z-93 comportou-se como linhagem suscetível a *P. polysora*, obtendo nota sete em uma escala de notas variando de um a nove (Agroceres, 1996), ao passo que Z-95 comportou-se como resistente, obtendo nota três, o que caracteriza resistência do tipo parcial.

Ensaio em campo

Dois ensaios foram conduzidos no campo da estação experimental da companhia EBS Ltda./Dow Agrosiences, na cidade de Cravinhos (SP), no período de janeiro a maio de 1998 e janeiro a maio de 1999. Os experimentos receberam bordaduras com um híbrido altamente suscetível que foi plantado 30 dias antes da instalação do ensaio. Para garantir a presença do inóculo, as bordaduras foram inoculadas com uredósporos provenientes de campos infestados.

Ensaio de 1998: Neste experimento, a parcela experimental foi constituída de uma linha de 5 m com cinco plantas/m para as linhagens Z-93, Z-95 e o híbrido (F₁), e quatro linhas, de mesmo comprimento, para a geração F₂. Foram realizadas três repetições, totalizando 300 plantas F₂ e 75 plantas para os demais tratamentos. Este primeiro experimento foi utilizado para a seleção de plantas pertencentes aos extremos de resistência e suscetibilidade que compuseram os dois agrupamentos utilizados no estudo de genotipagem através do método de análise dos segregantes agrupados (ASA). Dez plantas de cada extremo foram selecionadas e genotipadas com marcadores microssatélites como descrito adiante.

Ensaio de 1999: Neste segundo experimento, a parcela experimental foi composta por uma linha de 5 m com cinco plantas/m para cada linhagem e híbrido e oito linhas, de mesmo comprimento, para a população F₂. Este segundo experimento foi utilizado para a confirmação da possível ligação entre marcadores e QRLs identificada a partir da genotipagem dos segregantes agrupados (ASA), bem como para estimar a magnitude dos efeitos fenotípicos da ligação

entre o(s) marcador(es) e o QRL. Das 200 plantas F₂ iniciais, 165 foram genotipadas com marcadores microssatélites como descrito adiante.

Avaliação da doença: Em ambos experimentos, a severidade da doença foi avaliada no estágio fenológico seis, que corresponde ao estágio de grãos leitosos, segundo Fancelli (1986). A severidade média do tecido foliar da planta inteira foi avaliada através de escala diagramática (Agroceres, 1996; Pinho *et al.*, 1999a). Essa escala possui uma diagramação de plantas inteiras apresentando notas de severidade que variam de um (0% de tecido atacado) a nove (75% de tecido atacado).

Efeito fenotípico da associação marcador-QRL nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesão

Este experimento foi realizado para verificar os efeitos da associação marcador-QRL nas variáveis monocíclicas comprimento e número de lesão. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do campo experimental do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com sete plantas para cada linhagem parental e híbrido e 94 plantas para a população F₂. A unidade experimental foi constituída de vasos com capacidade para 5 kg de solo contendo uma planta cada, espaçados de 50 cm. A adubação no plantio foi de aproximadamente 1,2 g de nitrogênio, 4,2 g de fósforo e 2,4 g de potássio por vaso. A adubação de cobertura foi realizada aos 15 dias após a emergência, aplicando-se 2 g de sulfato de amônia/vaso. A inoculação foi realizada quando as plantas apresentavam cinco a seis folhas. Cada cartucho recebeu 1 ml de suspensão de inóculo contendo 2 x 10⁴ uredósporos/ml de água. Essa inoculação foi realizada ao final da tarde, dispensando assim o uso de câmara úmida. Esses uredósporos foram coletados em plantas cultivadas em casa de vegetação.

A avaliação foi realizada aos 15 dias após a inoculação. Nesta avaliação foi utilizada uma folha por planta, exatamente aquela que recebeu a suspensão de esporos. Foram mensurados, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (aumento de 20 x), o número total de lesões por folha e o comprimento de dez lesões por folha. Após a coleta dos dados, estes foram submetidos a análise de variância e a comparações múltiplas de médias pelo Teste de Tukey. Estas análises foram feitas com o auxílio do programa Statistica versão 5.0 (StatSoft, EUA).

Genotipagem com marcadores microssatélites

O DNA de todas as plantas foi extraído conforme metodologia descrita por Hoisington *et al.* (1994), modificado para tubos de 1,5 ml, utilizando 200 µg de material vegetal e 600 µl de tampão de extração 1% CTAB (70 µM de NaCl; 50 µM de EDTA pH 8.0; 100 µM Tris-HCl pH 7,5; 1% p/v de CTAB e 140 µM de β-mercapto-etanol), com duas lavagens sucessivas de CIA (24/1 clorofórmio/álcool isoamílico). Os segregantes agrupados foram genotipados para 142 locos microssatélites (Research Genetics) utilizando-se *primers*

específicos para cada loco. As reações de amplificação foram feitas em volume final de 30 µl, contendo 30 ng de DNA molde, 0,65 unidade de *Taq* DNApolimerase (Promega), 1x tampão da *Taq*, 100 µM de cada DNTP, 0,125 µM de *primer* anverso, 0,125 µM de *primer* reverso, 2,5 µM de MgCl₂ e água Milli Q autoclavada para completar o volume. Os programas de amplificações foram extraídos de Ogliari *et al.* (2000). Após a amplificação, cada amostra recebeu 4 µl de tampão de carregamento e os fragmentos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (Promega) 3% em tampão TBE 1x, por aproximadamente 3 h, a 100 V. Logo após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (5 µg/ml de água destilada) e fotografados em processador de imagem ImageMaster®VDS (Amersham Pharmacia Biotech).

As plantas do segundo experimento foram genotipadas com os marcadores que se mostraram potencialmente ligados no estudo de ASA. Num primeiro instante, apenas 73 dos 165 indivíduos do segundo ensaio a campo foram utilizados. Estes representaram os indivíduos mais extremos da população em termos de resistência e suscetibilidade. Os demais indivíduos da população (92), por sua vez, foram genotipados somente com aqueles marcadores que se mostraram ligados aos genes de interesse na genotipagem realizada com os 73 indivíduos extremos.

Finalmente, para verificar se os genes mapeados nos estudos em campo possuíam algum efeito fenotípico nas variáveis monocíclicas número total de lesões e comprimento de lesão, os 94 indivíduos F₂ avaliados em casa de vegetação foram genotipados somente com os marcadores significativamente associados com a resistência identificados na última genotipagem descrita acima.

Análises estatísticas

Análises estatísticas para verificação de ligação entre locos marcadores e genes de resistência a *P. polysora* foram realizadas por meio de análise de variância, onde genótipos marcadores para cada loco marcador foram considerados variáveis independentes e a severidade da doença, variável dependente (Edwards *et al.*, 1987). Testes de regressão linear foram utilizados para estimar as magnitudes das variâncias fenotípicas para resistência explicadas pelas associações genes-marcadores (R²). Para verificar o efeito fenotípico do QRL nas variáveis monocíclicas foram realizados os mesmos testes estatísticos, sendo que na análise de variância e no teste de regressão linear, genótipos marcadores foram as variáveis independentes e número de lesões ou comprimento de lesão foram as variáveis dependentes. As análises foram feitas com auxílio do programa Statistica versão 5.0 (StatSoft, EUA).

RESULTADOS

As médias de severidade da doença nas linhagens genitoras foram significativamente (p<0,05) contrastantes nos dois experimentos, ao passo que a severidade média da doença na população F₁ foi intermediária, porém igualmente distinta

das médias dos genitores (Tabela 1). A distribuição da severidade da doença na população F_2 foi, para os dois experimentos, contínua, indicando que mais de um gene pode estar agindo no fenótipo resistência (Figura 1).

Para o experimento em casa de vegetação, houve diferença significativa entre os tratamentos Z-95, Z-93 e F_1 ($p < 0,05$) para a variável número de lesão. Para a variável comprimento de lesão não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre Z-95 e Z-93, havendo contudo diferença destes para o híbrido (F_1) (Tabela 1). A exemplo dos ensaios em campo, a distribuição fenotípica da população F_2 para ambas variáveis foi contínua (Figura 2).

Análise de segregantes agrupados

Dos 142 locos marcadores testados, 98 mostraram-se não informativos, ou seja, não revelaram polimorfismos entre as linhagens genitoras. Dos 44 locos informativos, sete revelaram polimorfismo entre os segregantes agrupados (*Phi* 64, *Bngl* 125, *Mag*01F03, *Phi* 73, *Bngl* 589, *Bngl* 240, *Phi* 65), demonstrando potencial de estarem ligados a QRL a *P. polysora* (Figura 3).

Ligação entre locos marcadores e o QRL

Para verificar a ligação entre os marcadores candidatos (identificados na análise dos segregantes agrupados) e QRLs a *P. polysora*, os mesmos foram utilizados para genotipar indivíduos da população segregante avaliados no experimento de 1999. Inicialmente, somente as 73 plantas extremas em resistência/susceptibilidade foram testadas. Essa primeira etapa permitiu eliminar marcadores falsos positivos economizando tempo e reagentes, já que somente parte da população foi genotipada. Por marcador falso positivo entende-se aquele que revela polimorfismo entre os agrupamentos mas que, na verdade, não está ligado a nenhum gene de interesse. Podem ser fruto de interpretação errônea de géis, artefatos da reação de PCR ou ainda podem ocorrer ao se utilizar uma pequena quantidade de plantas para a composição dos agrupamentos, onde o genótipo das poucas plantas amostradas pode não

TABELA 1 - Severidade média de ataque de *Puccinia polysora* nas linhagens de milho (*Zea mays*) Z-93, Z-95 e F_1 nos dois ensaios a campo e médias do número de lesões e comprimento de dez lesões por folha, avaliadas em casa de vegetação. (Tukey a 5% de probabilidade)

| Genótipo | Ensaio a campo* | | Ensaio em casa de vegetação* | |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | Severidade Média (ensaio 97/98) | Severidade Média (ensaio 98/99) | Nº total de lesões | Comprimento Médio de lesão (mm) |
| Z-95 | 3,3 a | 2,42 a | 47,83 a | 0,75 a |
| F_1 | 4,5 b | 4,21 b | 71,2 a | 0,87 b |
| Z-93 | 7,7 c | 6,30 c | 135 b | 0,74 a |

* Médias nas colunas seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

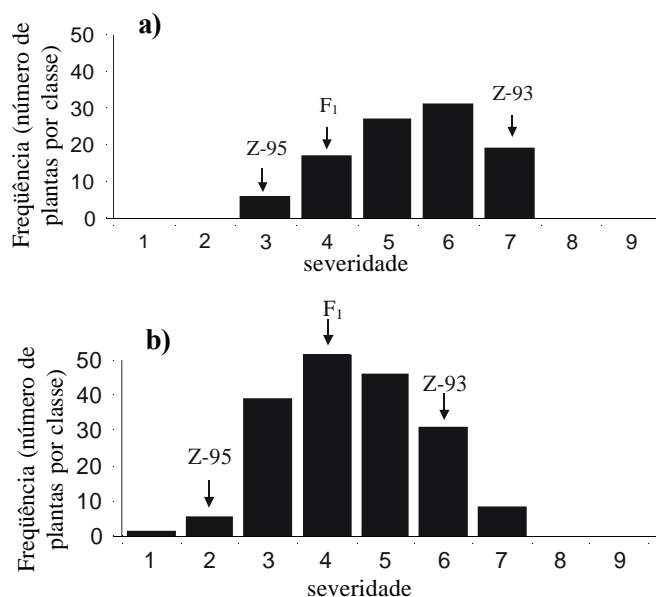


FIG. 1 - Distribuição fenotípica de notas de severidade da ferrugem de polissora do milho (*Zea mays*) na população F_2 no estágio fenológico seis, aproximadamente 80 dias após o plantio, nos ensaios de a) 1997 e b) 1998. Z-95, F_1 e Z-93 representam as médias destes tratamentos.

retratar o estado genotípico da população naquele loco. Além dos sete marcadores potencialmente ligados ao QRL, outros 15 (*Bngl* 381, *Bngl* 108, *MagE*05, *Phi* 29, *Phi* 79, *Bngl* 278,

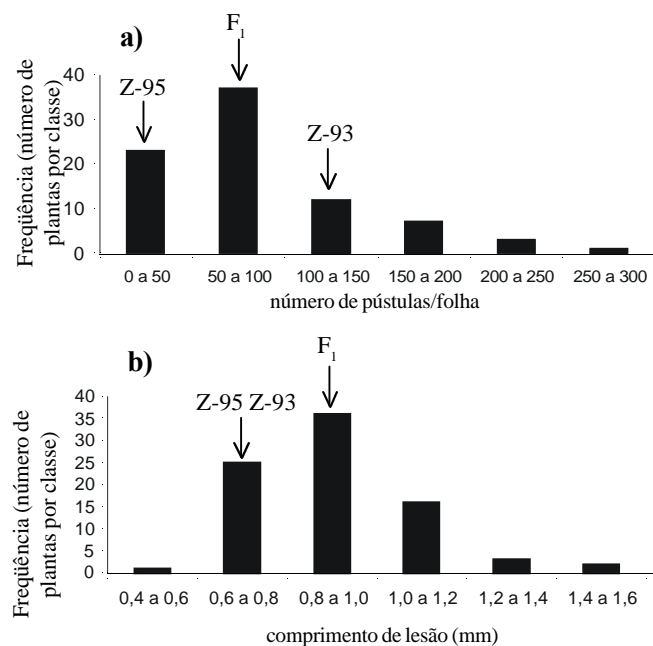


FIG. 2 - Distribuição de plantas de milho (*Zea mays*) da população F_2 para as a) variáveis número de lesões/folha e b) média do comprimento de 10 lesões/folha (mm).

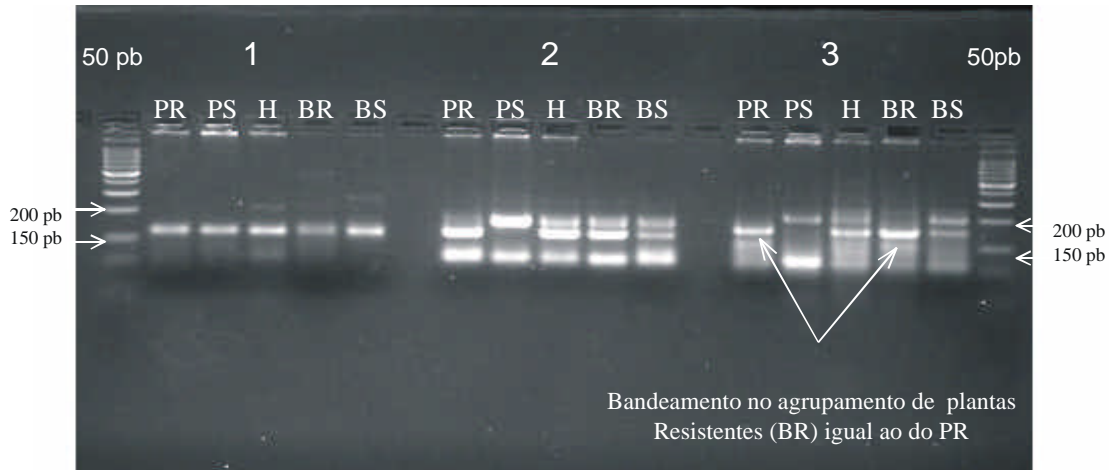


FIG. 3 - Exemplo de marcadores microssatélites (1) não informativo – *Bngl 180*, (2) informativo, mas não ligado – *Bngl 278* (não há polimorfismo entre os agrupamentos, embora haja entre linhagens genitoras) e (3) informativo potencialmente ligado ao QRL de interesse – *Bngl 589* (polimorfismo entre linhagens genitoras e entre agrupamentos). Na figura, PR representa o genitor resistente, PS o genitor suscetível, H o híbrido, BR o agrupamento de plantas resistente e BS o agrupamento de plantas suscetível.

Bngl 657, *Phi 82*, *Phi 115*, *Phi 15*, *Phi 33*, *Phi 28*, *Bngl 430*, *Phi 59*, *MacTo2B10*) também foram testados por estarem localizados próximos àqueles primeiros, conforme mapa genético consenso do milho disponível em <http://www.agron.missouri.edu>.

Dos 22 locos marcadores analisados, dois (*Phi 65* e *Phi 28*) mostraram associação significativa ($p < 0,000001$ e $p < 0,000078$, respectivamente) com resistência a *P. polysora*. Esses marcadores estão localizados no cromossomo 9 nas posições 03 e 01. Para estes marcadores, o restante da população segregante (107 indivíduos) também foi genotipada e o teste de regressão linear foi aplicado para verificar a magnitude do efeito fenotípico da ligação entre marcador/QRL. A associação entre o loco marcador *Phi 65* e o QRL explicou 12,9% da variação fenotípica para resistência verificada entre as plantas F_2 , ao passo que a associação com *Phi 28* explicou 5,10% (Tabela 2).

Para a associação *Phi 65*/QRL, a severidade média para a classe genotípica homocigota para alelos do genitor resistente foi de 4,45, enquanto que aquela homocigota para alelos do genitor suscetível foi de 6,0 (Tabela 2). Para a classe heterocigota, a média foi de 4,68, não diferindo estatisticamente da primeira classe. Assim, o alelo do genitor resistente contribuiu em 22% na redução da severidade da doença quando em heterocigose no loco em questão. Quando em homocigose, a diminuição foi de 25%. Na associação *Phi 28*/QRL, a severidade média da classe homocigota para alelos do genitor resistente foi de 3,79, ao passo que para a classe homocigota para alelos do genitor suscetível foi de 4,91, o que representa uma diferença de 23% de severidade. A classe heterocigota obteve média de severidade 5,07, não diferindo estatisticamente da classe homocigota para alelos do pai suscetível.

Efeito do QRL identificado no cromossomo 9 nas variáveis monocíclicas comprimento e número de lesões

Todas as 94 plantas F_2 avaliadas em casa de vegetação quanto às variáveis comprimento e número de lesões foram genotipadas com os marcadores *Phi 65* e *Phi 28*, ligados ao QRL a *P. polysora*. Somente *Phi 65* mostrou-se estatisticamente associado ($p < 0,000032$) à característica número de lesões/folha. A associação entre este marcador e a variável explicou 19,54% (R^2) da variação em número de lesões [$CV\% = 6,2\%$ para dados transformados com $\text{Log}(x+1)$], observada entre classes genotípicas. O número médio de lesões foi de 145 para indivíduos homocigotos para alelos do genitor suscetível e de 63 para homocigotos para alelos do genitor resistente. Quando o genótipo recebeu um alelo de cada genitor, o número médio de lesões foi de 83, não diferindo estatisticamente dos indivíduos homocigotos para alelos do

TABELA 2 - Locos marcadores associados à resistência à ferrugem polissora de milho (*Zea mays*) avaliada em campo

| Marcador | Localização ^a | Média de severidade ^b | R ^{2c} | P ^d | Nº de indivíduos genotipados | |
|----------|--------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------|------------------------------|-----|
| Phi 28 | 9.01 | s | 4,91 b | 5,10 | < 0,000078 | 157 |
| | | r | 3,79 a | | | |
| | | h | 5,07 b | | | |
| Phi 65 | 9.03 | s | 6,0 a | 12,90 | < 0,000001 | 149 |
| | | r | 4,45 b | | | |
| | | h | 4,68 b | | | |

^a Posição dos locos microssatélites no mapa genético consensual de milho.

^b Média de severidade para cada classe genotípica, onde r = indivíduos homocigotos para alelos marcadores do pai resistente, s = indivíduos homocigotos para alelos do pai suscetível e h = heterocigotos. Dentro de cada loco marcador, médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

^c porcentagem da variação fenotípica da resistência a *Puccinia polysora* explicada pela associação do loco marcador e o gene, estimada por regressão linear

^d nível de probabilidade da análise de variância

pai resistente. Nenhum dos dois marcadores mostrou-se associado à característica comprimento de lesão.

DISCUSSÃO

O problema da introgressão de poligenes em programas de melhoramento vegetal está na dificuldade de manipulação destes genes, em razão de sua baixa expressão fenotípica. A utilização de marcadores moleculares ligados a estes genes, por outro lado, permite que estes possam ser manipulados indiretamente, o que compreende a essência da seleção assistida por marcadores (Dudley, 1993)

Neste trabalho, foi identificada uma região genômica no cromossomo 9 associada à resistência à ferrugem polissora por meio de sua ligação a dois marcadores microssatélites. Microssatélites ainda são marcadores de recente aplicação em estudos de mapeamento de genes de interesse, especificamente de genes de resistência. Este trabalho representa um primeiro relato da utilização destes marcadores para tal finalidade em milho. Microssatélites são descritos na literatura como marcadores altamente polimórficos. Embora isso seja comprovado em muitos trabalhos (Yu *et al.*, 1994; Chin *et al.* 1996; Senior *et al.* 1996), tal tendência não foi verificada neste estudo. Apenas 31% dos locos marcadores testados revelaram diferenças alélicas entre as linhagens genitoras. Esse fato pode ter ocorrido devido a proximidade genética das linhagens genitoras, embora esta explicação seja desfavorecida pelo fato das linhagens provirem de *backgrounds* genéticos distintos, a julgar pelos seus *pedigrees*. Uma segunda explicação poderia ser a utilização de géis de agarose na resolução dos fragmentos microssatélites. Trabalhos envolvendo estudos de diversidade genética (Powell *et al.*, 1996; Chin *et al.* 1996) indicam géis de poliácridamida como o polímero ideal para a melhor resolução dos fragmentos amplificados por este tipo de marcador. No presente trabalho, no entanto, optou-se pelo uso de agarose de alta resolução (Promega), a exemplo de Ogliari *et al.* (2000), devido à praticidade e ao baixo custo. Isso pode ter contribuído para que polimorfismos de poucos pares de base não fossem detectados. Uma última explicação seria o fato de que os próprios marcadores microssatélites podem não ser tão polimórficos quanto se supõe, pelo menos entre as linhagens cultivadas de milho.

O estudo de ASA identificou a associação entre o marcador *Phi 65* (posição 03 do cromossomo 9) e um QRL a *P. polysora*. A genotipagem da população extrema identificou mais um marcador (*Phi 28*) associado a resistência a *P. polysora*, na posição 01 do mesmo cromossomo. Isso pode ser um indicativo de que os dois marcadores estão ligados a um único QRL e que *Phi 28* está mais distante deste, a julgar pelo seu baixo valor de R^2 (5,10%). Holland *et al.* (1998), utilizando a genotipagem de famílias F_3 localizaram marcadores ligados a dois genes de resistência quantitativa a esta doença nos cromossomos 3 e 4, explicando cada associação (gene/marcador) 13 e 15% da expressão fenotípica, valores próximos ao relatado neste estudo, no caso do

marcador *Phi 65*. Marcadores RFLP foram testados em regiões dos cromossomos 3, 4 e 10, que sabidamente contêm genes conhecidos de resistência a ferrugem comum. No entanto, estes autores genotiparam todas as famílias utilizadas no estudo além de terem avaliado progênies F_3 , o que permite repetibilidade de genótipos em locos marcadores e melhor avaliação fenotípica. Estas abordagens são mais eficientes para detectar associações entre QRL e marcadores do que o método ASA, o que pode explicar o fato de Holland *et al.* (1998) terem relatado um número maior de QRLs.

Genes de resistência a ferrugem comum (*Puccinia sorghi* Schw.) e carvão [*Ustilago maydis* (D.C.) Cda.] já foram localizados nesta região cromossômica (Kerns *et al.*, 1999). Assim, esta região parece abrigar um agrupamento de genes de resistência a, pelo menos, três patógenos. A ocorrência de agrupamentos de genes de resistência já foi descrita em milho e em outras espécies vegetais. Ullstrup (1977) descreveu um agrupamento gênico no cromossomo 10 contendo vários genes de resistência às ferrugens comum (*P. sorghi*) e polissora (*P. polysora*). McMullen & Simcox (1995) descreveram uma família gênica no cromossomo 3 controlando resistência ao vírus do mosaico do milho e à ferrugem comum (*P. sorghi*).

No presente trabalho, detectou-se, através do estudo realizado em casa de vegetação, diferenças significativas entre genótipos para o marcador *Phi 65* com relação ao número de lesões foliares. Desta forma, sugere-se que o QRL identificado nos ensaios em campo exerça um efeito fenotípico nesta importante variável monocíclica. Assim, levando-se em conta que uma redução no número de lesão igualmente acarreta uma diminuição da taxa de progresso da doença (Bergamin Filho & Amorim, 1996), o QRL aqui descrito pode ser classificado como do tipo *slow rusting* segundo Scott & Zummo (1989). Esses genes são desejáveis do ponto de vista do melhoramento por serem mais estáveis frente a variações genéticas do patógeno. No entanto, por terem baixa expressão fenotípica, o piramidamento de vários destes genes em um único genótipo, com o auxílio de marcadores moleculares, surge como uma proposta interessante na obtenção de híbridos com altos e duráveis níveis de resistência a este patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCERES. Guia Agroceres de Sanidade. São Paulo. Sementes Agroceres S.A. 1996.
- BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico. São Paulo. Ceres. 1996.
- CHAGUÉ, V., MERCIER, J.C., GUÉNARD, M., COURCEL, A. De & VEDEL, F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. Theoretical and Applied Genetics 92:1045-1051. 1996.
- CHIN, E.C.L., SENIOR, M.L. & SMITH, J.S.C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. Genome 39:866-873. 1996.
- DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: Manipulation of genes affecting quantitative traits. Crop Science 33:660-668. 1993.

- EDWARDS, M.D., STUBER, C.W. & WENDEL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. - numbers, genomic, distribution and types of genes action. *Genetics* 116:113-125. 1987.
- FANCELLI, A.L. Plantas alimentícias - Guia prático para aulas, estudos e discussões. Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", 1986.
- HEARNE, C.M., GHOSH, S. & TODD, J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics* 8:288-294. 1992.
- HOISINGTON, D., KHAIRALLAH, M. & GONZÁLEZ DE LEÓN, D. Laboratory Protocols - Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd. México. CIMMYT. 1994.
- 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* 96:232-241. 1998.
- KESSELI, R., HANNEKE, W., STANGHELLINI, M., VANDERMARK, G. & MICHELMORE, R. Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radicis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:722-728. 1993.
- KERNS, M.R., DUDLEY, J.W. & RUFENER II, G.K. QTL for resistance to common rust and smut in maize. *Maydica* 44:37-45. 1999.
- LÜBBERSTEDT, T., KLEIN, D. & MELCHINGER, A.E. Comparative quantitative trait loci mapping of partial resistance to *Puccinia sorghi* across four populations of European flint maize. *Phytopathology* 88: 1324-1329. 1998.
- McMULLEN, M.D. & SIMCOX, K.D. Clustering of disease resistance loci in the maize genome. *Maize Newsletter* 69: 52-53. 1995.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I. & KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 88:9828-9832. 1991.
- OGLIARI, J.B., BOSCARIOL, R.L. & CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. *Genetics and Molecular Biology*. 23:395-398, 2000.
- PINHO, R.G.V., RAMALHO, M.A.P., SILVA, H.P., RESENDE, I.C. & POZAR, G. Danos causados pelas ferrugens polissora e tropical no milho. *Fitopatologia Brasileira* 24:400-409. 1999a.
- PINHO, R.G.V., RAMALHO, M.A.P., RESENDE, I.C., POZAR, G. & OLIVATTO, A.V.D. Controle genético da resistência do milho às ferrugens polissora e tropical. *Fitopatologia Brasileira* 24:394-399. 1999b.
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M. VOGEL, J., TINGEY, S. & RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238. 1996.
- RODRIGUES-ARNON, R., SCOTT, G.E. & KING, S.B. Maize yield losses caused by southern corn rust. *Crop Science* 20:812-814. 1980.
- SCOTT, G.E. & ZUMMO, N. Effect of genes with slow-rusting characteristics on southern corn rust in maize. *Maize Newsletter* 70:50-54. 1989.
- SENIOR, M.L., CHIN, E., AUSTIN, D., LEE, M. & SMITH, S. Mapping simple sequence repeats in maize. *Maize Newsletter* 70:50-54. 1996.
- SIMCOX, K.D. & BENNETZEN, J.L. The use of molecular markers to study *Septosphaeria turcica* resistance in maize. *Phytopathology* 83:1326-1330. 1993.
- ULLSTRUP, A.J. Disease of corn. *In*: Sprague, G.F. (Ed.) *Corn and Corn Improvement*. Madison American Society of Agronomy Press. 1977. pp 391-500.
- YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34:479-501. 1996.
- YU, Y.G., SAGHAI MARROF, M.A., BUSS, G.R., MAUGHAN, P.J. & TOLIN, S.A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84:60-64. 1994.