

EMILLY DOS SANTOS PEREIRA

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À
ANTRACNOSE FOLIAR EM SORGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436m
2018
Pereira, Emilly dos Santos, 1989-
Mapeamento de QTLs associados a genes de resistência à
antracnose foliar em sorgo / Emilly dos Santos Pereira. –
Viçosa, MG, 2018.
vii, 19 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aluizio Borém de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 16-19.

1. *Sorghum bicolor* - Melhoramento genético.
 2. Marcadores genético. 3. Locus de caracteres quantitativos.
 4. Antracnose. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.
- II. Título.

CDD 22. ed. 633.1742

EMILLY DOS SANTOS PEREIRA

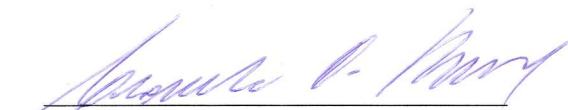
**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS A GENES DE RESISTÊNCIA À
ANTRACNOSE FOLIAR EM SORGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.




Maria Marta Pastina



Leonardo Duarte Pimentel



Cícero Beserra de Menezes



Aluizio Borem de Oliveira
(Orientador)

A DEUS, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por Sua presença, proteção e ajuda em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Luizmar Pereira (pelo apoio, conselhos e exemplo de vida) e Leonícia Pereira dos Santos (pelas inúmeras palavras de incentivo, orações e pelo amor incondicional prestado em todas as ocasiões).

À Universidade Federal de Viçosa, bem como ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia e a Embrapa Milho Sorgo pelo acolhimento e pela oportunidade da realização do mestrado em Fitotecnia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro.

Ao Professor Aluízio de Oliveira pela orientação e pela oportunidade.

Ao pesquisador Cícero Beserra de Menezes, pela sua coorientação, tempo dedicado e suporte para desenvolvimento do trabalho.

Ao pesquisador Jurandir Vieira de Magalhães, por suas contribuições, durante o desenvolvimento deste trabalho.

À querida Karine Bernardino, pela sua atenção, paciência, dedicação e por ter contribuído para minha formação. Muito obrigada!

Aos meus amigos (Talitha, Bruna, Hanna, Thaís, Helder e Raissa) que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade e o carinho que sempre me disponibilizaram.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e Mestrado em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, pela amizade e companheirismo.

À minha família, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

Ao meu namorado, ouvinte das minhas dúvidas, ansiedades, desânimos e conquistas, pelo apoio e pela valorização sempre entusiasta do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para ultrapassar a culpa pelo tempo que a cada dia lhe subtraía.

Agradeço a toda equipe da Embrapa Milho e Sorgo (Galpão de melhoramento de sorgo), por proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade.

A todos vocês, meu carinho, respeito e gratidão.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT:	vii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	3
Material genético	3
Avaliação fenotípica.....	4
Obtenção dos marcadores SNP	4
Análise dos dados fenotípicos	5
Mapeamento de QTL's.....	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
CONCLUSÃO.....	14
AGRADECIMENTOS	15
REFERÊNCIA	16

RESUMO

PEREIRA, Emilly dos Santos, M.sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2018. **Mapeamento de QTLs associados a genes de resistência à antracnose foliar em sorgo.** Orientador: D.sc. Aluizio Borem de Oliveira. Coorientador: D.sc. Cícero Beserra de Menezes.

O *Colletotrichum graminicola*, agente causador da antracnose no sorgo, esta presente em todas as áreas de cultivo. Em cultivares susceptíveis as perdas ocasionadas pela doença podem ultrapassar 50%. No Brasil as condições ambientais favorecem a elevada variabilidade do patógeno, tornando a principal doença da cultura. A utilização dos marcadores moleculares e métodos estatísticos tem possibilitado uma abordagem mais ampla para o melhoramento de plantas, através do mapeamento de características quantitativas de locos que controlam regiões genômicas. Assim a identificação e mapeamento dos genes de resistência por meio de marcadores moleculares vêm contribuindo para o entendimento da genética de resistência além de auxiliar programas de melhoramento na seleção e hibridação introgressiva de genes. Nesse contexto o objetivo da pesquisa foi identificar Trait quantitative locus (QTLs) associados com a resistência à antracnose foliar da linhagem CMSXS 180R, via genotipagem por sequenciamento, visando seu uso futuro em trabalhos de piramidação de genes para resistência a doenças em sorgo. Para a fenotipagem foram utilizadas 246 linhagens endogâmicas recombinantes oriundas do cruzamento entre os genitores CMSXS 180 (resistente) e CMSXS 110 (susceptível). A avaliação quanto à reação do patógeno, seguiu escala de notas no qual nota um era considerado tolerante e cinco era susceptível. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com três repetições, e a análise estatística foi realizada, via modelos mistos. Já o mapeamento dos dados foi via regressão linear geral. Para o isolado 1 foram detectados QTLs nos cromossomos 2 e 4. Já para o isolado 2 foram detectados QTLs nos cromossomos 1, 3, 4, 5 e 8. Dentre os marcadores observados, o mais promissor foi SNP na posição 64,33 Mpb, devido ao seu R^2 . Neste trabalho foram identificados novos QTLs, tanto para cromossomos já descritos na literatura como para um novo. Além disso, vale destacar que para o cromossomo 4 foi detectado um QTL muito próximo para ambos os isolados, assim podemos inferir que se tratar do mesmo QTL.

ABSTRACT:

PEREIRA, Emilly dos Santos, M.sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Mapping of QTLs associated with foliar anthracnose resistance genes in sorghum.** Advisor: D.sc. Aluizio Borem de Oliveira. Co- Advisor: D.sc. Cícero Beserra de Menezes.

Colletotrichum graminicola, the causative agent of anthracnose in sorghum, is present in all growing areas. In susceptible cultivars, the losses caused by the disease may exceed 50%. In Brazil, the environmental conditions favor the high variability of the pathogen, making it the main disease of the crop. The use of molecular markers and statistical methods has enabled a broader approach to plant breeding by mapping the quantitative characteristics of loci that control genomic regions. Thus the identification and mapping of resistance genes by means of molecular markers have contributed to the understanding of resistance genetics, besides helping breeding programs in introgressive selection and hybridization of genes. In this context, the objective of the research was to identify Trait quantitative locus (QTLs) associated with resistance to foliar anthracnose of the CMSXS 180R line, through genotyping by sequencing, aiming at its future use in the work of gene pyramiding for resistance to diseases in sorghum. For phenotyping, 246 recombinant inbred lines from the crossover between CMSXS 180 (resistant) and CMSXS 110 (susceptible) were used. The evaluation of the reaction of the pathogen followed a note scale in which one was considered tolerant and five was susceptible. The experimental design was in randomized blocks with three replicates, and the statistical analysis was performed using mixed models. The data mapping was via general linear regression. For the isolate 1, QTLs were detected in chromosomes 2 and 4. On the other hand, for the isolate 2, QTLs were detected in chromosomes 1, 3, 4, 5 and 8. Among the observed markers, the most promising was SNP at position 64.33 Mpb, due to its R². In this work, new QTLs were identified for both chromosomes already described in the literature and for a new one. In addition, it is worth mentioning that for chromosome 4 a very close QTL was detected for both isolates, so we can infer that it is the same QTL.

INTRODUÇÃO

Agronomicamente o sorgo pode ser dividido em cinco tipos, são eles: granífero; forrageiro; sacarino; biomassa e vassoura (Pereira Filho & Rodrigues *et al.*, 2015). O sorgo granífero é o de maior expressão econômica, estando entre os cinco cereais mais cultivados no mundo, atrás apenas do arroz, trigo, milho e cevada (FAO, 2016). A cultura do sorgo está sujeita à ocorrência de uma série de estresses bióticos, como insetos e microrganismos, e abióticos, como temperatura, irradiação e deficiência hídrica, que reduzem seu potencial de produção (Wang *et al.*, 2014).

As doenças causadas por fungos estão entre os principais problemas do cultivo do sorgo. De acordo com Silva *et al.* (2015) dentre os principais patógenos que atacam o sorgo no Brasil estão: antracnose (*Colletotrichum sublineolum*), míldio (*Peronosclerospora sorghi*), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), ferrugem (*Puccinia purpurea*), ergot (*Claviceps africana*) e a podridão seca (*Macrophomina phaseolina*).

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* Henn in Kabát & Bubak. (syn. *C. graminicola* (Ce.) Wils.), é considerada a mais importante das doenças que atacam o sorgo. Atualmente a doença está presente em todas as áreas de cultivo, o que indica ampla faixa de condições ambientais para seu desenvolvimento, evidenciando a existência de diferentes ecótipos do patógeno (Silva *et al.*, 2008). Em condições ambientais com elevada umidade e temperatura entre 25° e 30° C, as perdas na produtividade de grãos e/ou forragem ultrapassam 50% em cultivares susceptíveis (Cota *et al.*, 2017). Entre as medidas de controle destacam-se o uso de sementes certificadas, a rotação de culturas, controle químico e genótipos geneticamente resistentes (Zanette *et al.*, 2009).

O *Sorghum bicolor* possui uma ampla variabilidade genética, que favorece a obtenção de fontes de resistência para produção de híbridos resistentes. Contudo, o uso dessa resistência é comprometido pela alta variabilidade da população do patógeno, que favorece a rápida adaptação às cultivares resistentes (Lima & Menezes, 2002; Costa *et al.*, 2011). No Brasil, estudos conduzidos por Silva *et al.* (2008) encontraram 70 raças de *C. sublineolum* a partir de 289 isolados obtidos de seis regiões produtoras de sorgo do país. Esta variabilidade genética encontrada na população do patógeno sugere a

necessidade de identificação de diferentes genes de resistência no hospedeiro (Costa *et al.*, 2008).

O autor Costa *et al.* (2011) em estudos genéticos de resistência do sorgo à antracnose foliar, utilizando cinco linhagens de sorgo (BR008, BR005, BR013, BR009 e SC283) contrastantes com relação ao tipo reação apresentado (resistência e susceptibilidade) a antracnose, constatou que a resistência é controlada por genes de resistência vertical com dois alelos, predominando no modelo os efeitos de dominância completa. Contudo, a relação de dominância ou recessividade da resistência em linhagens de sorgo varia de acordo com os diferentes isolados do patógeno.

Assim, apesar de surgirem novas cultivares resistente a antracnose, a durabilidade dessa resistência vem diminuindo nos últimos anos, pois é difícil prever qual isolado vai quebrar a resistência. Outro fator que tem dificultado é que mesmo cruzando as fontes de resistência entre si não é possível distinguir em nível de campo de qual parental contribuiu para resistência. Assim a identificação e mapeamento dos genes de resistência a doenças por meio de marcadores moleculares vêm sendo um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético. Deste modo, os marcadores surgem como uma ferramenta para o entendimento da genética de resistência a doenças (Guimarães *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos de mapeamento genético da resistência à antracnose têm sido conduzidos. Boora *et al.* (1998) identificaram marcadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) ligados a um gene recessivo de resistência à antracnose, porém esses marcadores não foram mapeados. Mehta *et al.* (2005) realizaram estudos de segregação e ajustaram em 3:1 a proporção de fenótipos resistentes e suscetíveis na geração F₂, sugeriu que um único gene dominante, *Cg1*, na linhagem de sorgo SC748-5 confere resistência a antracnose. Este gene foi mapeado por Perumal *et al.* (2009) utilizando marcadores *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Simple Sequence Repeats* (SSR). Entre eles, o marcador Xtxa6227, foi mapeado a 1,8 cM do gene no grupo de ligação 5, e o Xtxp549, a 3,6 cM.

Apesar de poucos, alguns estudos de mapeamento de QTLs tem sido conduzidos visando a resistência a antracnose. Klein *et al.* (2001) identificaram um QTL de resistência a antracnose próximo ao marcador SSR Xtxp95 no grupo de ligação 6. Mohan *et al.* (2010) mapearam QTLs de resistência utilizando marcadores

microssatélites nos grupos de ligação 4 e 6. Em um recente estudo, utilizando 14.739 marcadores *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs), Upadhyaya et al. (2013) mapearam oito loci de resistência à antracnose em sorgo, através de mapeamento associativo. Burrell et al. (2015), utilizando uma população *Recombinant Inbred Lines* (RILs) derivada do cruzamento entre BTx623 (suscetível) e SC748 (resistente), identificaram no cromossomo 5 um QTL associado a resistência a antracnose em sorgo.

Atualmente, marcadores moleculares SNP, que são baseados no polimorfismo de um único nucleotídeo (Cho et al., 1999), são amplamente utilizados em estudos de mapeamento de QTLs em diversas espécies (Ye et al., 2011). Os marcadores SNP quando comparados com aos marcadores: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); RAPD e AFLP (Grodzicker et al. 1974; Teasdale, 1994; Vos et al., 1995), apresentam maior abundância no genoma. Outro avanço foi o desenvolvimento da tecnologia *Genotyping-by-Sequencing* (GBS) (Elshire et al, 2011) que possibilita obter alta densidade de marcadores ao longo do genoma de forma mais eficiente, uma vez que pode ser trabalhado simultaneamente um grande número de amostras.

Assim a utilização de marcadores SNP, junto com a técnica de GBS poderá auxiliar na identificação e mapeamento de QTLs ligados a resistência à antracnose foliar em sorgo, contribuindo para futura piramidação de genes de resistência numa mesma linhagem ampliando o tempo de utilização da linhagem parental, tornando a resistência duradoura e de amplo espectro. Nesse contexto, o trabalho tem como objetivo identificar QTLs associados com a resistência à antracnose foliar da linhagem CMSXS 180R, via genotipagem por sequenciamento, visando seu uso futuro em trabalhos de piramidação de genes para resistência a doenças em sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Um conjunto de linhagens recombinantes (RILs) foi desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo com finalidade de utilização para mapeamento de QTL. A partir do cruzamento das linhagens CMSXS 180R (resistente à antracnose) e CMSXS 110 (susceptível à antracnose) obtiveram-se 246 progênies que foram conduzidas pelo método *Single Seed Descent* (SSD) até a geração F_{2:8}.

Avaliação fenotípica

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação durante os meses de setembro a outubro de 2016, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – MG (19°28' latitude sul e 44°15'08" longitude oeste), coordenado pelo Núcleo de Fitopatologia. O delineamento foi em blocos casualizados com três repetições, cada vaso representava uma parcela.

As RIL's e seus parentais foram semeados em vasos plásticos de 23x18x18 cm (diâmetro superior, inferior e altura, respectivamente). Foram semeadas dez sementes de cada genótipo por vaso. Aos 15 dias após a emergência foi realizado um desbaste mantendo-se quatro plantas por vaso. As plantas permanecerem em condições de casa de vegetação até o final do ensaio, durante esse período as plantas receberam os tratamentos indicados para cultura, que podem ser encontrados no livro sorgo do plantio à colheita.

A inoculação foi realizada com os isolados monospóricos de *C. sublineolum* (cv 136-13) e (cv 157-13), os quais se encontram depositados na micoteca da Embrapa Milho e Sorgo. A inoculação foi realizada 28 dias após a germinação com suspensão de conídios de 10^{-6} conídios ml^{-1} , que foram aplicadas isoladamente às plantas com auxílio de pulverizador manual. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 18 horas em temperatura média de 25 ± 2 °C e passado este período, foram retiradas desta condição, permanecendo em casa de vegetação a 26 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente $70 \pm 5\%$.

As plantas foram avaliadas quanto à reação ao patógeno, 10 dias após a inoculação, utilizando-se escala de notas com valores de 1 a 5, proposta por Cardwell *et al.* (1989), em que: 1 - presença de pequenas pontuações necróticas, 2 - presença de pequenas manchas avermelhadas, 3 - lesões necróticas, algumas vezes alongadas, mas, sem a presença de esporulação, 4 - lesões necróticas com a presença de acérvulos no centro e 5 - lesões necróticas, algumas vezes coalescidas, com a presença de abundante esporulação.

Obtenção dos marcadores SNP

Para obtenção dos marcadores SNP, foram germinadas 10 sementes de cada uma das RILs, em papel de germinação, e amostras de folha de cada linhagem foram coletadas para a extração de DNA, seguindo o procedimento padrão do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, para extração de DNA de folhas jovens

(Lana *et al.*, 2010). Após a extração e quantificação, o DNA coletado foi encaminhado para o *Institute for Genomic Diversity* (IGD) da Universidade de Cornell, onde foi realizada a genotipagem com base na técnica de GBS. Finalizada a genotipagem, os dados brutos foram imputados através do software NPUTE (Roberts *et al.*, 2007). Esse procedimento é utilizado a fim de recuperar a informação de marcadores para os quais os genótipos não foram identificados. Após a imputação dos dados brutos, não foi possível obter a informação de todos os genótipos, tornando necessário submeter os dados a uma nova filtragem. Os dados já imputados foram filtrados novamente considerando *minor allele frequency* (MAF) de 0.4 e 20% de dados perdidos, com o auxílio do software Tassel (Bradbury *et al.*, 2007).

Análise dos dados fenotípicos

Para obtenção do componente de variância genético, o qual permite estimar a herdabilidade, ajustou-se um modelo estatístico no qual o efeito de genótipo foi aleatório. Além disso, este modelo foi utilizado para a obtenção das médias *best linear unbiased prediction* (BLUPs), com as quais estimou-se a correlação genética entre os isolados, por meio do software R (R Core Team, 2014). A significância dos efeitos aleatórios (componentes de variância) foi determinada pelo Teste da Razão de Verossimilhanças- LRT (*Likelihood ratio test*) (Neyman & Pearson, 1928). Também foi obtido o valor do Coeficiente de Variação (CV), que reflete a precisão experimental e a estimativa de herdabilidade, que mede o quanto da variabilidade observada é herdável. A fórmula matemática para estimar a herdabilidade da amostra foi:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \frac{\sigma_R^2}{r}}$$

No qual:

h^2 é a herdabilidade;

σ_g^2 é a variância genética;

σ_R^2 é a variância residual;

r é o número de repetições.

A análise fenotípica dos dados foi realizada com base na abordagem de modelos mistos, para obtenção das médias ajustadas via *Best Linear Unbiased Estimator* (BLUE). Os efeitos de RILs e Blocos foram considerados fixos. A significância dos

efeitos fixos foi determinada pelo Teste de Wald (Wald, 1943), com distribuição χ^2 aproximada. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GenStat (Payne *et al.*, 2012). Utilizando o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} é o valor fenotípico observado para genótipo i no bloco j ;

μ é a média geral;

g_i é o efeito fixo do genótipo i ($i=1, \dots, 246$);

b_j é o efeito fixo do bloco j ($j=1, \dots, 3$);

e_{ij} corresponde ao erro experimental.

Mapeamento de QTL's

A análise de mapeamento de QTL para resistência à antracnose foi realizada utilizando o software Tassel (Bradbury *et al.*, 2007). Os dados genotípicos utilizados são os referentes aos SNPs (Cho *et al.*, 1999) obtidos pela técnica de GBS (Elshire *et al.*, 2011). A associação entre fenótipo e marcadores moleculares SNPs foi determinada por uma regressão simples. Sendo:

$$y_i = \beta_0 + x_{ij}\beta_j + e_i$$

No qual:

y_i é o valor do fenótipo assumido pelo i ;

β_0 é a média;

x_{ij} representa a variável para o genótipo do QTL, a qual pode assumir o valor igual a 1 caso o genótipo seja Q_jQ_j ou 0 se q_jq_j ;

β_j é o efeito do QTL assumido por Q_j ($j=1, \dots, m$), no qual Q_j representa o QTL associado ao marcador j ;

e_i corresponde ao resíduo.

Para determinar a significância de cada teste foi utilizado o \log_{10} (p-valor). Assim, a significância para cada marcador individualmente assumiu o valor de 0,001, atribuindo um maior rigor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos, por meio das análises estatísticas no programa GenStat, para os componentes de variância, coeficiente de variação e herdabilidade, são demonstrados a seguir (Tabela 1). Os coeficientes de variação (CV %) foram relativamente baixos para trabalhos de fenotipagem para antracnose, sendo 23,09% para isolado 1 e 22,23% para isolado 2. Estes valores estão abaixo dos obtidos por Silva (2006) em trabalho de resistência genética com híbridos de sorgo ao *Colletotrichum sublineolum*. Segundo Ramalho *et al.*, (2012), experimentos com baixo coeficiente de variação corroboram com estimativas de parâmetros genéticos mais precisos e acurados, importantes para as tomadas de decisões ao longo de um programa de melhoramento. As estimativas de herdabilidade foram altas, os valores obtidos foram de 77,20 (ISO1) a 81,29 (ISO2), próximos aos obtidos por Patil *et al.* (2017) em trabalho avaliando locos de resistência à antracnose foliar em sorgo. Os valores assumidos pela herdabilidade também podem ser vistos como um indicador de precisão experimental, verificando assim uma situação favorável ao processo de seleção artificial.

Tabela 1. Componentes de variância, herdabilidade, coeficiente de variação avaliada na população de RIL's derivada do cruzamento entre os genitores CMSXS 180 (Resistente) e CMSXS110 (Susceptível) para a resistência à antracnose.

CMSXS Componentes de variância		
	Isolado 1	Isolado 2
Variância genética (σ_g^2)	0,43**	0,28**
Variância residual (σ_R^2)	0,38	0,20
Herdabilidade (%)	77,20	81,29
Média	2,67	2,00
CV(%)	23,09	22,36

** nível de significância à 1%

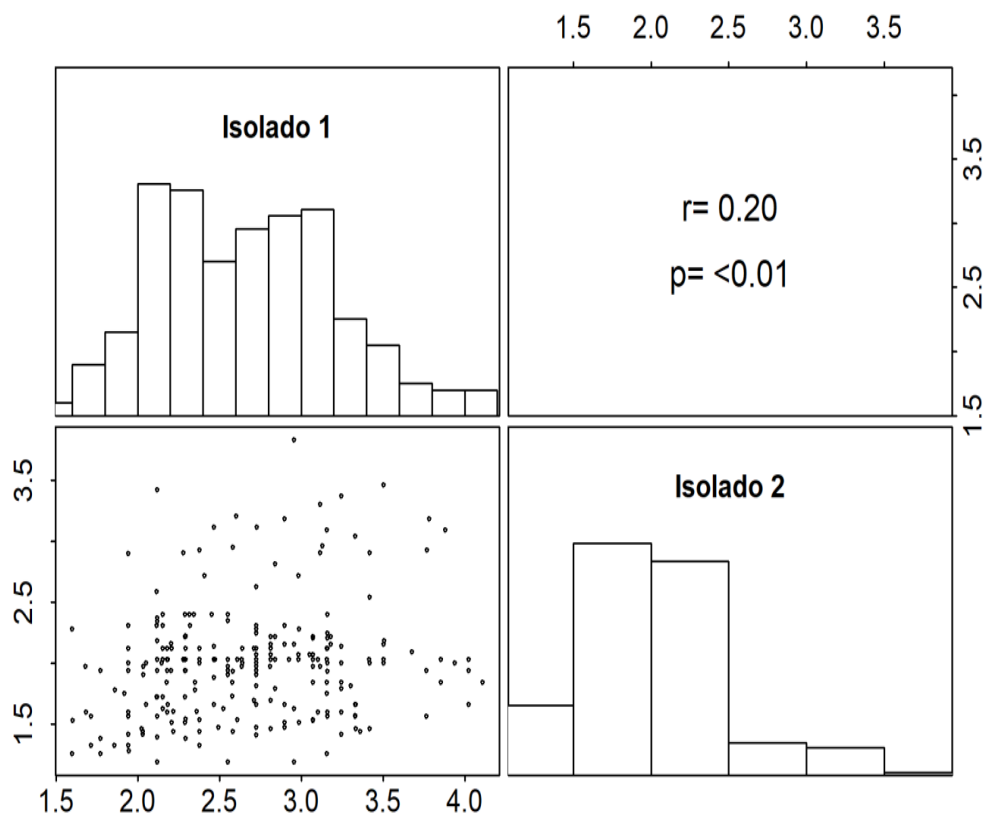


Figura 1. Estimativas de correlação genética, na população de RILs, obtida através do cruzamento entre os genitores CMSXS 180R e CMSXS 110, inoculados com o isolado 1 (CV. 136-13) e isolado 2 (CV. 157-13).

Como foram usados dois isolados optou-se por fazer uma correlação entre os mesmos. A correlação é uma ferramenta que possibilita ao melhorista quantificar a relação entre os caracteres analisados em uma população (Churata & Osuna, 1996). Assim como apresentado na Figura 1, verifica-se uma correlação positiva e significativa entre os isolados 1 e 2 de 0,20 (p -valor <0.01), no entanto devido a sua baixa magnitude supõe-se que os mecanismos patogênicos dos isolados são diferentes.

Após a genotipagem via GBS foram obtidos um total de 2.920.921 milhões de marcadores. Contudo posteriormente foram aplicados os filtros, Marcas sem filtro; Marcas sem indel; Marcas final (minor SNP); dados perdidos e MAF que reduziu esse valor para 64.014 mil marcadores. Dentre os 10 cromossomos que compõe o genoma do sorgo, o cromossomo 3 foi o que apresentou maior número de marcadores, com 10.807 SNPs e densidade de 145,31 SNPs/Mpb, seguido do cromossomo 8 com 7.609 SNPs e uma densidade de 137,59 SNPs/Mpb (Tabela 2). Já o cromossomo 6 foi o que apresentou menor densidade de marcadores (53,94 SNPs/Mpb).

Tabela 2. Resumo dos dados de marcadores SNP gerados via GBS para a população de RILs, obtida através do cruzamento entre os genitores CMSXS 180R e CMSXS 110.

Cromossomo	Número de SNPs	Densidade (marcadores/Mpb)
1	4.289	58,33
2	8.463	109,18
3	10.807	145,31
4	5.388	79,29
5	6.262	100,68
6	3.354	53,94
7	4.341	67,69
8	7.609	137,59
9	6.733	113,55
10	6.768	111,1
Total	-	-

As análises de QTLs foram realizadas para ambos os isolados, utilizando como abordagem análise de regressão simples. O limiar para aceitação de um QTL foi determinado pelo $-\text{Log}_{10}^{-3}$ (p-valor), que representa a significância de 0,001 para cada teste. Já o critério adotado para o posicionamento dos QTLs foi o valor máximo de $-\text{Log}_{10}$ de (p-valor) relativo ao intervalo.

Foram detectados QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5 e 8 dos 10 que compõem o genoma do sorgo (Figuras 2). Ao todo foram identificados 8 QTLs, sendo 3 para o isolado 1 (Figura 2A) e 5 para o isolado 2 (Figura 2B). Para o isolado 1, foram localizados QTLs nos cromossomos 2 e 4. Já para o isolado 2, os QTLs foram localizados nos cromossomos 1, 3, 4, 5 e 8. Assim como a baixa correlação entre os isolados, a localização dos QTLs em cromossomos e posições diferentes pode ser um indicativo de que os mecanismos de patogenicidade são diferentes entre os isolados.

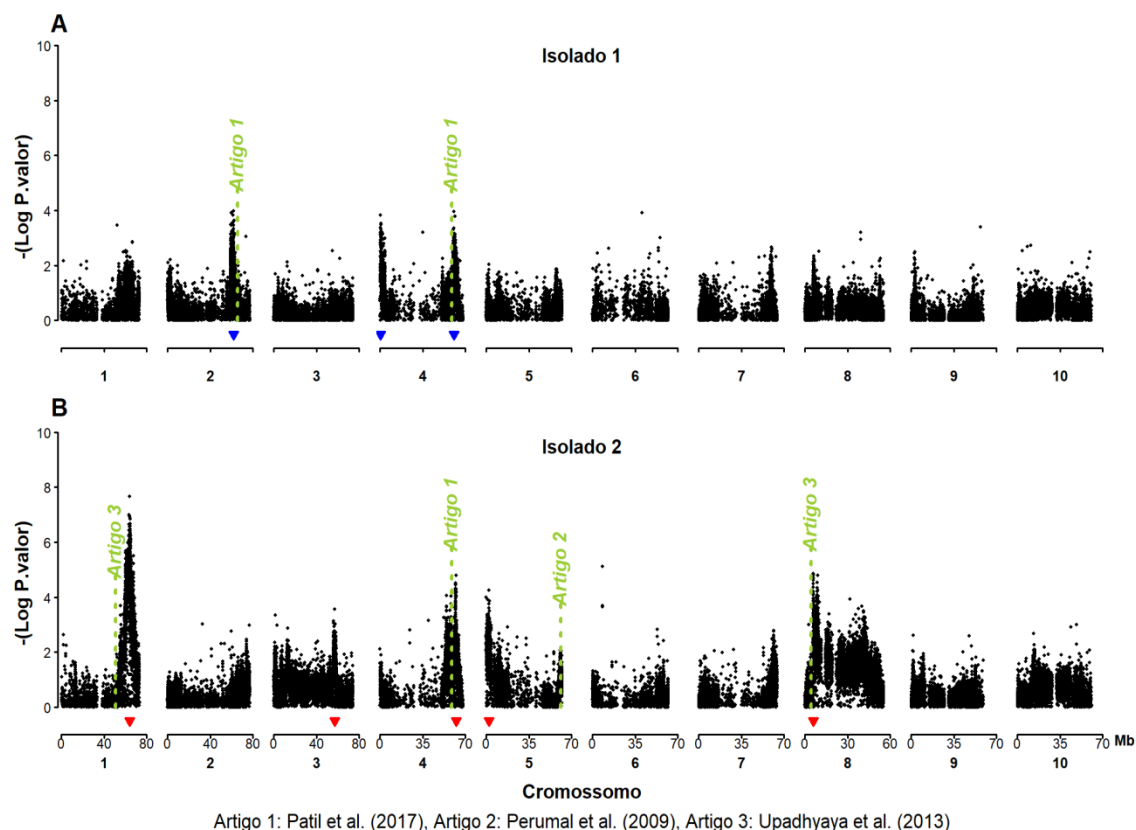


Figura 2. Resultado da análise de mapeamento de QTLs em mega pares de base, na população de RILs derivada do cruzamento entre os genitores CMSXS 180 (Resistente) e CMSXS 110(Susceptível) para resistência a antracnose utilizando dois isolados de *C. sublineolum*. O triângulo invertido em azul corresponde aos QTL's identificados para o isolado 1 (CV. 136-13). O triângulo invertido em vermelho azul corresponde aos QTL's identificados para o isolado 1 (CV. 157-13)

Para o isolado 1 foi detectado QTL no cromossomo 2, na posição (61,83 Mpb) que exibiu $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) igual a 3,99, explicando 6,00% da característica variância fenotípica, sendo também o QTL mais significativo para o isolado 1 (Tabela 3). Patil *et al* (2017), em estudos para resistência a antracnose, também detectaram QTLs no cromossomo 2, entretanto em posições diferentes, sugerindo que outras regiões estejam relacionadas com o controle da resistência a antracnose.

Ainda para o isolado 1 no cromossomo 4, foram localizados dois QTLs, no início (0,42 Mpb) e no final do cromossomo (60,77 Mpb), que exibiram $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) 3,84 e 3,96, respectivamente (Tabela 3). Estudos conduzidos por Mohan *et al*.

(2010) para identificação de locos que controlam a resistência em doenças foliares em sorgo, identificaram para antracnose, um QTL no cromossomo 4 localizados a 0 e 11,4 cM. Apesar da posição do QTL está em Centimorga, a partir da informação de posição física para o marcador xtpx12 no cromossomo 4 (48.576.949) (Mace & Jordan, 2011), foi possível sugerir que o QTL encontrado no cromossomo 4, no presente estudo, está próximo ao intervalo detectado por Mohan *et al.*, (2010). O segundo QTL do cromossomo 4 está próximo do marcador detectado por Patil *et al.* (2017), que identificou um QTL para essa mesma região flanqueado pelos marcadores na posição chr04_58,61 e chr04_60,68, corroborando com o resultado obtido neste trabalho.

Para o isolado 2 foi detectado um QTL no cromossomo 1 na posição (64,33 Mpb), que exibiu $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) igual a 7,66, explicando 12,07% da característica variância fenotípica explicada (Tabela 3), sendo o QTL mais significativo encontrado. Upadhyaya *et al.*, (2013) em trabalho de identificação de marcadores moleculares associados à resistência à antracnose em sorgo, também localizaram QTLs consistentes, delimitado pelos marcadores nas posições de 50,789,413 e 50,814,514 Mpb do cromossomo 1, para dois anos consecutivos.

Também para o isolado 2 no cromossomo 3 foi localizado um QTL na posição (57,40 Mpb) que exibiu $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) de 3,56 explicando 5,29% da característica variância fenotípica observada (Tabela 3). Deste modo, além de QTLs já identificados em outros estudos de resistência à antracnose também foi, identificada uma nova região do genoma, que pode estar relacionada com a resistência à antracnose.

Para o cromossomo 4, foi localizado um QTL na posição (62,37 Mpb), que exibiu $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) de 4,79, explicando 7,34% da característica variância fenotípica observada (Tabela 3). Vale ressaltar que para o isolado 1 também foi localizado um QTL no cromossomo 4 na posição 60,77 Mpb. Essa proximidade entre os QTLs identificados sugere que se trata do mesmo QTL para ambos os isolados, no cromossomo 4. Como mencionado anteriormente para o isolado 1, estudos conduzidos por Patil *et al.* (2017), também identificou um QTL no cromossomo 4 para essa mesma região flanqueado pelos marcadores na posição chr04_58,61 e chr04_60,68, corroborando com os resultados.

No cromossomo 5 foi identificado um QTL no início do cromossomo localizado na posição (1,99 Mpb), que exibiu $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) 4,26 ($p < 0,001$), explicando 6,45%

da característica variância fenotípica observada (Tabela 3). Analisando os marcadores para o isolado 2 no cromossomo 5 foi possível detectar um pico de QTL entre o intervalo (57,339,867 a 57,339,868 Mpb) ao nível de significância 5% (Figura 2). Estudos conduzidos por Mehta *et al* (2005), sugere que a resistência a antracnose foliar deriva de um único gene dominante, *Cg1*, na linhagem de sorgo SC748-5. Este gene foi mapeado por Perumal *et al.* (2009), que identificou os marcadores que o flaqueavam, Xtxa6227 e Xtxp549 no grupo de ligação 5. Apesar da posição está em centimorga, a partir da informação de posição física para o marcador Xtxp549 no cromossomo 5 (60,979,037Mpb) (Mace & Jordan, 2011), é possível sugerir que o QTL encontrado no cromossomo 5, no presente estudo, está associado ao gene *Cg1*.

Já para o cromossomo 8 foi identificado um QTL no início do cromossomo localizado na posição de 5,94 Mpb, que exibiu $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) 4,84, da característica variância fenotípica explicada 7,44% da característica (Tabela 3). Em trabalho de identificação de marcadores moleculares associados à resistência à antracnose em sorgo os autores Upadhyaya *et al.* (2013), também localizaram QTLs consistentes no cromossomo 8, para dois anos consecutivos, delimitado pelos marcadores na posição 4,236734 e 4,287997 Mpb, ou seja, detectado bem próximo ao QTL identificado no presente trabalho.

Tabela 3. Cromossomo (Cr), posição (Pos), intervalo de confiança, efeito, $-\text{Log}_{10}$ (p-valor) e coeficiente de determinação (R^2), e alelos dos QTL's identificados para resistência à antracnose na população de RILs derivadas do cruzamento entre os genitores CMSX180 (Resistente) r CMSXS110 (Susceptível).

Características	Cr	Pos (Mb)	Intervalo de confiança	Efeito alélico	$-\text{Log}_{10}$ (p-valor)	CMSXS110 Susceptível	CMSX180 Tolerante	$R^2(\%)$
ISO1	2	61,83	60,935354-62,885908	-0,195	3,99	T	C	6,00
ISO1	4	0,42	0,403047-1,027201	-0,192	3,84	C	A	5,75
ISO1	4	60,77	59,46657-60,998631	0,195	3,96	C	G	5,95
ISO2	1	64,33	64,225086- 4,557865	-0,218	7,66	T	C	12,07
ISO2	3	57,40	56,288994-58,569797	0,145	3,56	T	C	5,29
ISO2	4	62,37	62,25432-62,733249	0,17	4,79	A	T	7,34
ISO2	5	1,99	1,614645-2,009137	-0,159	4,26	C	A	6,45
ISO2	8	5,94	5,615027-6,619724	0,173	4,84	A	G	7,44

Iso1- Isolado (Cv. 136-13); Iso2- Isolado (Cv. 157-13); Cr- Cromossomo; Pos (Mb) Posição em mega pares de base e R^2 variância fenotípica observada.

Deve-se destacar que dos 8 QTLs mapeados, 4 apresentaram alelos favoráveis vindo do genitor CMSXS180 (Resistente), e 4 do CMSXS110 (Susceptível). Em estudos conduzidos por Mohan *et al.* (2010), através da segregação transgressiva, observou-se que QTLs para resistência a antracnose podem ser oriundos de ambos os pais, já no presente estudo este fato foi corroborado através do efeito dos próprios alelos. Assim, mesmo genótipos susceptíveis podem ser úteis na piramidação de genes para resistência, contribuindo com alelos de resistência.

Quando os resultados do estudo de mapeamento dos QTLs são interpretados separadamente para os isolados, verifica-se que para o isolado 1 o genitor CMSXS 180 apresentou maior contribuição de alelos favoráveis, pois dos três QTLs mapeados, dois tiveram efeitos de resistência em função do alelo doado pelo genitor resistente. Já para o isolado 2, dos cinco QTLs mapeados, apenas 2 tiveram efeitos em função do alelo doado pelo genitor resistente.

Visto que a maior contribuição de alelos favoráveis, para os QTLs detectados para o isolado 2, foi devido ao pai susceptível fica evidente que alelos de resistência para antracnose podem ser provenientes de ambos os genitores, ou seja, que tanto o genitores resistentes quanto o genitor susceptível podem apresentar alelos que conferem resistência ou susceptibilidade a antracnose e isso é variável de acordo com o isolado do patógeno, assim como apresentado por Costa *et al.* (2008).

Os valores de variância fenotípica explicada por cada QTL confirmam a hipótese de herança quantitativa, na qual os efeitos individuais de cada gene contribuem com uma fração, em geral, pequena da variação fenotípica total (Okogbenin & Fregene, 2003). Os QTLs mapeados são potencialmente exploráveis em programas de seleção assistida. Para o isolado 1, pode-se destacar o QTL na posição 61,83 Mpb no cromossomo 2. Já para o isolado 2, os QTLs foram na posição 64,33 Mpb no cromossomo 1; 5,94 Mpb no cromossomo 8, estes QTLs apresentaram os maiores valores de R^2 . O próximo passo é realizar um estudo mais aprofundado dessas regiões para confirmar a estabilidade desses QTLs para sua possível validação.

A validação desses marcadores para antracnose poderá contribuir com redução no tempo de pesquisa através da piramidação de dois ou mais genes de resistência em uma cultivar ou linhagem comercial, reduzindo a necessidade de fenotipagem, tempo na obtenção de híbridos resistentes e mantendo a resistência no campo por mais tempo.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram identificados novos QTLs, tanto em cromossomos já descritos na literatura como para um novo. Essa nova região foi identificado um QTL no cromossomo 3 que explicou 5,29% da variância fenotípica observada. Dentre os QTLs identificados, o SNP mais promissor foi o localizado na posição 64,33 Mpb no cromossomo 1 de sorgo, para o isolado 2. Esse QTL explicou 12,07% da resistência à antracnose. Apesar de não ser um valor tão expressivo, quando comparado com outros trabalhos já publicados para antracnose foliar em sorgo ele apresenta potencialidade para utilização na seleção assistida visando a sua introgressão em linhagens de sorgo suscetíveis à antracnose.

No estudo também foram identificados QTLs muito próximos no cromossomo 4 em ambos os isolados. Essa proximidade sugere que um mesmo gene ou genes ligados

estejam controlando a resistência à antracnose, nessa região. Caso seja o mesmo gene, tem-se a possibilidade de identificar um marcador que confira resistência aos dois isolados, simultaneamente. Já se forem genes ligados à seleção, simultânea, para resistência aos isolados trabalhados também será possível devido à pequena distância entre os genes, o que garante uma baixa taxa de recombinação entre eles. Assim em ambas as hipóteses o tempo de transferência da resistência, poderá ser reduzido, o que é o desejado para o programa de melhoramento.

AGRADECIMENTOS

Em nome do Pesquisador Cícero Besera Menezes, agradecemos as equipes do Núcleo de Fitopatologia e Núcleo de Biologia Aplicada, pelo suporte na condução dos experimentos e análise dos dados. Suporte financeiro: CNPq e Embrapa.

REFERÊNCIA

- Boora KS, Frederiksen R & Magill C (1998) DNA-based markers for a recessive gene conferring anthracnose resistance in sorghum. *Crop Science*, v. 38: 1708-1709.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y & Buckler ES. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635.
- Burrell AM, Sharma A, Patil, NY, Collins D, Willian FA, Rooney WL & Klein PE (2015) Sequencing of n anthracnose-reistant sorghum genotype and mappinf of a major QTL reveal strong candidate genes for anthracnose resistance. *Crop Science*, 55:790-799.
- Cardwell KF, Hepperly PR & Frederiksen RA (1989) Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. *Plant Disease Journal*, 73:255-257.
- Cho RJ, Mindrinos M, Richards DR, Sapolsky RJ, Anderson M, Drenkard E, Dewdney J, Reuber TL, Stammers M, Federspiel N, Theologis A, Yang WH, Hubbell E, Au M, Chung EY, Lashkari D, Lemieux B, Dean C, Lipshutz RJ, Ausubel FM, Davis RW & Oefner PJ. (1999) Genome mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*. 23:203-7.
- Churata BGM & Osuna JTA (1996) Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente e análise de trilha em caracteres avaliados no composto do milho (*Zea Mays*) arquitetura. *Revista Ceres*. 43:628-636.
- Costa RV, Casela CR, Zambolim L, Santos FG, Ferreira AS (2008) Controle Genético da Resistência do Sorgo à Antracnose Foliar (*Colletotrichum sublineolum*). Disponível:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/491777/1/Com162.pdf>>. Acesso em: 13 de novembro de 2017.
- Costa RV, Zambolim L, Casela CR, Ferreira AS & Santos FG (2008) Manejo da antracnose do sorgo pela utilização de híbridos triplos. 1 ed. Sete Lagoas: Embrapa milho e sorgo, 31p.
- Costa RV, Zambolim L, Cota LV, Silva DD, Rodrigues JAS, Tardin FD & Casela CR (2011) Genetic control of sorghum resistance to leaf anthracnose. *Plant Pathologyv*, 60: 1162-1168.
- Cota LV, Souza AGC, Costa RV, Silva DD, Lanza FE, Aguiar FM & Figueredo JEF (2017) Quantification of yield losses caused by leaf anthracnose on sorghum in brazil. *Journal of phytopathology*, 165: 479-485.
- Elshire, RJ, Glaubitz, J. C, Sun Q.; Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES & Mitchell, SE (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6: 1-10.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 20 de fev. 2018.

- Grodzicker T, Anderson C Sharp PA & Sambrook J (1974) Conditional lethal mutants of adenovirus 2-simian virus 40 hybrids. I. Host range mutants of Ad2+ND1. *Journal of Virology*, 13: 1237-1244.
- Guimarães TG, Magalhães JV, Lanza MA, Schuster I (2009) Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. *Informe agropecuário*, 30: 24-33.
- Klein RR, Rodriguez-Herrera R, Schlueter JA, Klein PE, Yu ZH & Rooney WL (2001) Identification of genomic regions that affect grain-mould incidence and other traits of agronomic importance in sorghum. *Theor Appl Genet*, 102: 307–319.
- Lana UGP, Gomes PC, Tinoco CFS, Silva BCF, Guimarães CT & Magalhães, JV (2010) Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala. 1. ed. Sete Lagoas: Embrapa milho e sorgo, 17p.
- Lima MLF & Menezes M (2002) Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões protéicos e iso-enzimáticos. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 12-16.
- Mace ES & Jordan DR (2011) Integrating sorghum whole genome sequence information with a compendium of sorghum QTL studies reveals uneven distribution of QTL and of gene-rich regions with significant implications for crop improvement. *Theor Appl Genet*, 123:169–191.
- Mehta PJ, Wiltse CC, Rooney WL & Tebeest DO (2005) Classification and inheritance of genetic resistance to anthracnose in sorghum. *Field Crops Research*, 93:1-9.
- Mohan MS, Madhusudhana R, Mathur K, Chakravarthi DVN, Rathore S, Nagaraja Reddy R, Satish S, Srinivas G, Sarada Mani N & Seetharama N (2010) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to foliar diseases in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Euphytica*, 176: 199-211.
- Nelder JA & Wedderburn RWM (1972) Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society*, 135: 370-384.
- Neyman J & Pearson ES (1928). On the use and interpretation of certain test criteria for purpose of statistical inference. *Biometrika*, 20: 175-240.
- Okogbenin E & Fregene M (2003) Genetic mapping of QTL affecting productivity and plant architecture in a full-sib cross from non-inbred parents in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 107: 1452-1462.
- Patil NY, Klein RR, Williams CL, Collins SD, Knoll JE, Burrell AM, Anderson WF, Rooney WL. & Klein PE (2017) Quantitative Trait Loci Associated with Anthracnose Resistance in Sorghum. *Crop Science*, 57: 877-890.
- Payne R, Murray D, Harding S, Baird D & Soutar D (2012) Introduction to GenStat for windows (15th Edition). Londres:VSN International, 135p.
- Pereira Filho IA, Rodrigues JAS (2015) (Ed.). Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa, 327 p.

- Perumal R, Menz MA, Mehta PJ, Katilé S, Gutierrez-Rojas LA, Klein RR, Klein PE, Prom LK, Schlueter JA, Rooney WL & Magill CW (2009) Molecular mapping of Cg1, a gene for resistance to anthracnose (*Colletotrichum sublineolum*) in sorghum. *Euphytica*, 165: 597-606.
- Prochno HC, Coelho CJ, Romanek C, Silva DFG, Tasiar D, Oliveira EAT, Gardingo JR & Matiello RR (2016) Genetic resistance of maize inbred lines to anthracnose leaf blight, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16: 55-61.
- R Core Team (R version 3.4.0). The R project for statistical computing. Disponível em: <<http://www.r-project.org/index.html>>. Acesso em: 15 de julho de 2017.
- Ramalho MAP, Ferreira DF & Oliveira AC (2012) Experimentação em genética e melhoramento de plantas. Lavras: UFLA, 328 p.
- Roberts A, Mcmillan L, Wang W, Parker J, Rusyn I & Threadgill D (2007) Inferring missing genotypes in large SNP panels using fast nearest-neighbor searches over sliding windows. *Bioinformatics*, 23: 401-407.
- Rodrigues JAS, Menezes CB, Machado JRA, Tabosa, JN, Simplicio JB (2015) Manejo cultural. In: Pereira Filho IA, Rodrigues JAS. (Ed.). *Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa, 139p.
- Silva DD (2006) Resistência de híbridos de sorgo a *Colletotrichum sublineolum*: previsibilidade por meio da reação de linhagens progenitoras. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 124p.
- Silva DD, Casela CR, Castro HA, Santos FG & Ferreira AS (2008) Diversidade populacional de *Colletotrichum sublineolum* em seis localidades no Brasil. *Summa Phytopathol*, 34: 149-155.
- Silva DD, Cota LV & Costa RV (2012) Controle de doenças. In: May A, Durães FOM, Pereira Filho IA, Schaffert R & Parrella RAC (Eds.). *Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa*. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 118p.
- Silva DD, Cota LV, Costa RV (2015) Doenças. In: Rodrigues JAS. (Ed). *Sistemas de produção Embrapa, 9ª Edição : Cultivo de sorgo*. Livro digital, Não paginado.
- Singh M, Chaudhary K, Singal HR, Magill CW & Boora KS (2006) Identification and characterization of RAPD and SCAR markers linked to anthracnose resistance gene in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Euphytica*, 149: 179-187.
- Teasdale RD. Method of random amplification of polymorphic DNA (1994). Disponível em: <<http://www.google.com.br/patents/WO1994024307A1?cl=en>>. Acesso em: 20 Dezembro de 2017.
- Upadhyaya HD, Wang YH, Sharma R & Sharma S (2013) Identification of genetic markers linked to anthracnose resistance in sorghum using association analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 1649-1657.

Vos P, Hogers R., Bleeker M, Reijans M, Lee TV, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M & Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Wald A (1943) Tests of statistical hypotheses concerning several parameters when the number of observations is large. *Transactions of the American Mathematical Society*, 54: 426-481.

Wang YHD, Upadhyaya, & Kole C (2014) *Genetics, genomics and breeding of sorghum*. Boca Raton : CRC Press, 366p.

Ye C, Argayoso M, Redoña ED Sierra S, Laza MA, Dilla CJ, Mo Y, Thomson MJ, Chin J, Delaviña CB, Diaz GQ & Hernandez J (2011) Mapping QTL for heat tolerance at flowering stage in rice using SNP markers. *Plant Breeding*, 131:33-41.

Zanette GF, Nóbrega GMA & Meirelles LDP (2009) Morphogenetic characterization of *Colletotrichum sublineolum* strains, causal agent of anthracnose of sorghum. *Tropical Plant Pathology*, 34: 146-151.