

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

CRISTIANE ROMANEK

MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA QUANTITATIVA À ANTRACNOSE
FOLIAR EM MILHO TROPICAL

PONTA GROSSA
2014

CRISTIANE ROMANEK

MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA QUANTITATIVA À ANTRACNOSE
FOLIAR EM MILHO TROPICAL

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, área de concentração
Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

PONTA GROSSA
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Romanek, Cristiane

R758 Mapeamento de locos de resistência
 quantitativa à antracnose foliar em milho
 tropical/ Cristiane Romanek. Ponta Grossa,
 2014.
 122f.

 Dissertação (Mestrado em Agronomia -
 Área de Concentração: Agricultura),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues
 Matiello.

 1.Colletotrichum graminicola.
 2.Herdabilidade. 3.QRLs. 4.SSRs. 5.AFLPs.
 I.Matiello, Rodrigo Rodrigues. II.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Agronomia. III. T.

CDD: 633.15



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: **“Mapeamento de locos de resistência quantitativa à antracnose foliar em milho tropical”**.

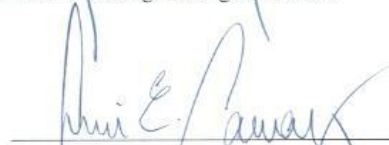
Nome: Cristiane Romanek

Orientador: Rodrigo Rodrigues Matiello

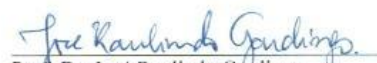
Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello



Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo



Prof. Dr. José Raulindo Gardingo

Data da Realização: 12 de dezembro de 2014.

Ao meu pai, minha mãe e meus irmãos.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai amado, pelo amor incondicional, por não me deixar desistir e sempre me dar forças, coragem, esperança e ânimo. Tudo o que sou devo a Ti Senhor.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao curso de pós-graduação em Agronomia e a todas as pessoas sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, o meu respeito, admiração e agradecimento por compartilhar seus conhecimentos, pela orientação e dedicação durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus pais queridos, Polan e Zulmira, pelo amor, apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos. Vocês são exemplos de superação.

Aos meus irmãos Rafaele e Lucas, pela preocupação, amizade, amor e conselhos que levo comigo sempre.

Aos queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Caroline de Jesus Coelho, Lilian Schafascheck, Samantha Cenci, Daniele Tasior, Danilo Guimarães, Hellen C. Prochno, Débora Máximo, Eduardo Oliveira, William dos Anjos, Guilherme de Jong, Rodrigo Hilbert, Vanessa Oliveira, Francyyelly Ferreira, Thaís da Silva, Brenda Luiza, Aghata Charnobay, Angélica L. Michalowski, Renato Bombardelli, Guilherme S. Schulze e Thiago Ferreira Portes pela ajuda fundamental na realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, principalmente à Zima Richter e Luciane Hennemberg, pela indispensável ajuda durante a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Alegrai-vos na esperança, sede pacientes
na tribulação, perseverai na oração.”

Rm 12:12

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a resistência/suscetibilidade de progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*), estimar os parâmetros genéticos associados à resistência, e mapear as regiões genômicas associadas à resistência quantitativa (QRL) por meio de marcadores moleculares microssatélites (SSRs) e AFLPs. As linhagens endogâmicas L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível) foram cruzadas entre si a fim de gerar uma população F_2 . Os indivíduos desta população foram autofecundados dando origem as progênies $F_{2:3}$ que foram avaliadas em três experimentos, conduzidos no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, linhagens parentais e geração F_1 . As plantas foram inoculadas por duas vezes entre os estádios V6 e V7, sendo a 2ª inoculação realizada sete dias após a 1ª. Foram realizadas três avaliações da severidade da antracnose foliar: a 1ª no estágio VT (pendoamento), a 2ª em R2 e a 3ª em R3 através de uma escala de notas com amplitude de 1 a 6. A partir das avaliações pontuais, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os resultados evidenciaram efeitos altamente significativos tanto para as avaliações pontuais quanto para a AACPD, indicando grande variabilidade genética para a resistência à antracnose foliar entre as progênies $F_{2:3}$. As elevadas magnitudes dos parâmetros genéticos indicam que o controle genético da resistência de milho à antracnose foliar esteja associado à expressão de genes de grande efeito fenotípico. O mapeamento de QRLs foi realizado com base na análise fenotípica das 121 progênies $F_{2:3}$, avaliadas em três experimentos para as três avaliações pontuais e para a AACPD. A análise de ligação entre os marcadores (microssatélites e AFLPs) e os QRLs foi efetuada por meio da análise de regressão linear múltipla e pelo mapeamento por intervalo composto. A regressão linear múltipla identificou marcas SSRs e AFLPs altamente associadas a alelos de resistência, sendo os locos AFLPs E55139 e E56386 com os maiores coeficientes de regressão parciais para os três experimentos, com amplitude de 6,67 a 31,31 % e de 6,12 a 21,78 %, respectivamente. Foram mapeados 19 QRLs à antracnose foliar em 8 grupos de ligação. Seis QRLs foram mais estáveis para os diferentes ambientes de avaliação e responsáveis por grande magnitude da variação fenotípica em resistência. O elevado número de QRLs mapeados nesta população confirma o padrão de herança quantitativa da resistência de milho tropical à antracnose foliar causada por *C. graminicola*.

Palavras-chave: *Colletotrichum graminicola*. Herdabilidade. QRLs. SSRs. AFLPs.

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize the resistance/susceptibility of the $F_{2:3}$ maize progenies to anthracnose leaf blight (*Colletotrichum graminicola*), to estimate the genetic parameters associated with resistance, and map the genomic regions associated with quantitative resistance loci (QRL) by means molecular markers microsatellites (SSRs) and AFLPs. The inbred lines L04-2 (resistant) and L95-1 (susceptible) were crossed to generate an F_2 population. Individuals of this population were selfed resulting $F_{2:3}$ progenies, these were evaluated in three trials conducted in a randomized block design, with three replications. The treatments were consisted of 121 $F_{2:3}$ progenies, parental lines and F_1 generation. Plants were inoculated in two times between the stages V6 and V7, the second inoculation made seven days after the first. Three evaluation of the severity of anthracnose leaf blight were conducted: the 1st in VT (flowering) stage, 2nd in R2 and 3rd in R3 through a note scale with amplitude from 1 to 6. From the point assessments, was calculated the area under the disease progress curve (AUDPC). The results showed highly significant effects for both point assessments for AUDPC, indicating high genetic variability for resistance to anthracnose leaf blight among the $F_{2:3}$ progenies. The high magnitude of genetic parameters indicate that the genetic control of resistance to anthracnose leaf blight of corn is associated with the expression of genes of great phenotypic effect. QRL mapping was conducted based on phenotypic analysis of 121 $F_{2:3}$ progenies, evaluated in three experiments for three point assessments and AUDPC. Linkage analysis between the markers (microsatellites and AFPLs) and QRLs was performed by analysis of multiple linear regression and by composite interval mapping. Multiple linear regression identified mark SSRs and AFPLs highly associated with resistance alleles, the E55139 and E56386 AFLPs loci with the highest partial regression coefficients for the three experiments, with amplitudes from 6,67 to 31,31 % and 6,12 to 21,78 %, respectively. Were mapped 19 QRLs to anthracnose leaf blight in eight linkage groups. Six QRLs were the most stable environments for different evaluation and responsible for the large magnitude of the phenotypic variation in resistance. The high number of QRLs mapped in this population confirms the pattern of quantitative inheritance of resistance in tropical maize to anthracnose leaf blight caused by *C. graminicola*.

Keywords: *Colletotrichum graminicola*. Heritability. QRLs. SSRs. AFLPs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Visualização da intensidade do sintoma da antracnose foliar (<i>Colletotrichum graminicola</i>). Representação das notas de escala (1 a 6) observadas à campo para a caracterização da resistência/suscetibilidade à antracnose foliar. Ponta Grossa – PR, 2014.....	38
Figura 2	– Amostras de DNA genômico de parte dos indivíduos da população de mapeamento. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2014.....	40
Figura 3	– Distribuição das médias das progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L95-1 em escala de notas da 3ª avaliação da antracnose foliar para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível e F_1 = geração F_1 . Ponta Grossa, 2014.....	61
Figura 4	– Distribuição das médias das progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L95-1 para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível e F_1 = geração F_1 . Ponta Grossa, 2014.....	62
Figura 5	– Gel de agarose (2%). Visualização da genotipagem em parte dos indivíduos da população segregante F_2 com o <i>primer</i> SSR Umc1511. M= marcador molecular 100pb, P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível. Ponta Grossa, 2014.....	98
Figura 6	– Padrão de amplificação da combinação de <i>primers</i> E5M14 (E-AAC/M-CAG). O gel de AFLP demonstra a segregação de alguns fragmentos polimórficos (presença ou ausência) genotipados em parte dos indivíduos da população segregante. M= marcador molecular 50pb, P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível. Ponta Grossa, 2014.....	99
Figura 7	– Visualização de parte de um gel de poliacrilamida (6%) para algumas combinações de <i>primers</i> <i>EcoRI</i> + <i>MseI</i> . A seta indica o fragmento AFLP E58353 (353pb) da combinação E5M8 (E-AAC/M-CTA) possivelmente associado à QRL pela metodologia BSA. P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível. BR/BS = bulks de DNA (resistente e suscetível) dos três experimentos. Ponta Grossa, 2014.....	100
Figura 8	– Mapa genético gerado pelos marcadores SSRs e AFLPs. À direita estão os locos marcadores (SSR e/ou AFLP) e a esquerda as distâncias em cM segundo a função de mapeamento de Haldane. Ponta Grossa, 2014.....	101
Figura 9	– Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs à antracnose foliar nas três avaliações pontuais e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no 1º experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abscissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.....	102

- Figura 10 – Distribuição do *LOD score* ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs à antracnose foliar nas três avaliações pontuais e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no 2º experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de *LOD score*. Ponta Grossa, 2014..... 103
- Figura 11 – Distribuição do *LOD score* ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs à antracnose foliar nas três avaliações pontuais e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no 3º experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de *LOD score*. Ponta Grossa, 2014..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Escala para o tipo de reação da planta hospedeira, com a respectiva nota e descrição das lesões correspondentes causadas por <i>Colletotrichum graminicola</i>	37
Tabela 2	– Relação dos 88 locos microssatélites, localização no mapa consenso (grupo/bin), motivo repetido e programa de PCR otimizado. Ponta Grossa, 2014.....	41
Tabela 3	– Relação das 40 combinações de <i>primers EcoRI + MseI</i> testadas nas gerações parentais (L04-2 e L95-1) e nos bulks de DNA do BSA. Ponta Grossa, 2014.....	43
Tabela 4	– Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro experimento para as três avaliações da severidade da doença e para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Ponta Grossa, 2014.....	59
Tabela 5	– Estimativa dos parâmetros genéticos associados à resistência à antracnose foliar, a partir da 1ª, 2ª e 3ª avaliação da severidade da doença e para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em progênies F _{2:3} de milho. Ponta Grossa, 2014.....	60
Tabela 6	– Distribuição dos locos microssatélites polimórficos e monomórficos entre as linhagens parentais L04-2 e L95-1, bem como o número de locos sem distorção de segregação nos grupos de ligação do mapa consenso de milho. Ponta Grossa, 2014.....	85
Tabela 7	– Locos SSR polimórficos genotipados na população de mapeamento L04-2 x L95-1. Ponta Grossa, 2014.....	86
Tabela 8	– Número total de fragmentos amplificados (monomórfico e polimórfico) e porcentagem de polimorfismo para 19 combinações de <i>primers EcoRI + MseI</i> genotipadas na população de mapeamento. Ponta Grossa, 2014.....	87
Tabela 9	– Combinações de <i>primers EcoRI + MseI</i> selecionadas a partir da presença de polimorfismo entre os bulks de DNA pela análise BSA. Ponta Grossa, 2014.....	88
Tabela 10	– Resultados da análise de ligação dos marcadores SSRs e AFLPs na construção do mapa genético da população F ₂ . Número de marcas agrupadas, ordenadas, comprimento dos grupos de ligação (cM) e distância média entre marcas (DM). Ponta Grossa, 2014.....	89
Tabela 11	– Resumo das análises de regressão linear múltipla para os alelos associados à QRLs à antracnose foliar no 1º experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.....	90

Tabela 12 – Resumo das análises de regressão linear múltipla para os alelos associados à QRLs à antracnose foliar no 2º experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.....	91
Tabela 13 – Resumo das análises de regressão linear múltipla para os alelos associados à QRLs à antracnose foliar no 3º experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.....	92
Tabela 14 – Número de marcadores associados pela análise de regressão linear múltipla à QRLs à antracnose foliar para a 1ª, 2ª, 3ª avaliação e para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Ponta Grossa, 2014.....	93
Tabela 15 – Posição, LOD score e proporção da variação fenotípica explicada pelos QRLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. Ponta Grossa, 2014.....	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	A CULTURA DO MILHO	17
3.2	DOENÇAS FOLIARES	18
3.3	ANTRACNOSE FOLIAR	18
3.4	RESISTÊNCIA GENÉTICA DE MILHO À ANTRACNOSE FOLIAR	21
3.5	MARCADORES MOLECULARES	24
3.5.1	Marcador Microsatélite ou SSR (<i>Simple Sequence Repeats</i>)	26
3.5.2	Marcador AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	27
3.6	MAPEAMENTO GENÉTICO	28
3.7	ANÁLISE DE <i>BULKS</i> SEGREGANTES (BSA)	31
3.8	MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS EM MILHO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES F _{2:3} DE MILHO À ANTRACNOSE FOLIAR	34
4.1.1	Material Vegetal	34
4.1.2	Experimentos de Campo	34
4.1.3	Multiplicação do Isolado e Preparo do Inóculo	35
4.1.4	Inoculação e Avaliação dos Experimentos	36
4.1.5	Análises Estatísticas e Estimativas de Parâmetros Genéticos da Resistência	38
4.2	MARCADORES MOLECULARES	40
4.2.1	Extração do DNA genômico	40
4.2.2	Genotipagem com o Marcador SSR.....	41
4.2.3	Genotipagem com o Marcador AFLP	43

4.2.4	Regressão Linear Múltipla	45
4.2.5	Teste de Distorção da Segregação Mendeliana dos Marcadores.....	46
4.2.6	Construção do Mapa de Ligação	46
4.2.7	Localização dos QRLs através do Mapeamento por Intervalo Composto.....	46
5	RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE FOLIAR EM PROGÊNIES DE MILHO.....	47
6	MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA QUANTITATIVA À ANTRACNOSE FOLIAR EM MILHO TROPICAL.....	63
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
	ANEXO 1	122

1 INTRODUÇÃO

Dentre as atividades agrícolas no Brasil, a produção de grãos (cereais, leguminosas e oleaginosas) tem sido uma das mais importantes. A produção nacional na safra 2013/14 foi de 193,87 milhões de toneladas, 5,21 milhões de toneladas superior ao volume produzido em 2012/13. Neste contexto produtivo, somente a cultura do milho contribuiu com 79 milhões de toneladas (CONAB, 2014). O milho é cultivado em todo o território nacional, destacando-se das demais culturas como o produto de maior volume produzido (NOGUEIRA NETTO, 1996).

A expansão da cultura do milho nos últimos anos foi devida a fatores como a obtenção de híbridos mais produtivos, ampliação da área cultivada e das épocas de semeadura e à adoção de novas tecnologias (SILVA, 2006). Entretanto, estes fatores associados à ausência de rotação de culturas tem favorecido o aumento da incidência e da severidade de doenças secundárias para o milho.

Nos últimos anos tem se evidenciado a importância de algumas doenças foliares para a cultura do milho no Brasil como: a mancha branca, a cercosporiose, a ferrugem polissora, a ferrugem tropical, a ferrugem comum, a helmintosporiose e os enfezamentos pálido e vermelho. Recentemente, novos gargalos fitopatológicos têm incrementado nas lavouras de milho, como o aumento da incidência/severidade da antracnose foliar nas principais regiões produtoras do país (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

A antracnose foliar, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils pode ocorrer em vários estádios de desenvolvimento da cultura (FERREIRA; CASELA, 2001). Este fungo pode se manifestar em qualquer parte da planta, como raiz, sementes e, principalmente no colmo e nas folhas (DALE, 1963). Em genótipos muito suscetíveis, as lesões coalescem, provocando a morte prematura das folhas. No Brasil, o *C. graminicola* encontra-se amplamente distribuído nas regiões que cultivam milho (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; COTA et al., 2012).

A utilização de genótipos resistentes é a principal estratégia de manejo e a forma mais eficaz no controle da antracnose foliar em milho (COÊLHO et al., 2001; FERREIRA; CASELA, 2001; REZENDE et al., 2004). Assim, num programa de melhoramento, o conhecimento da herança envolvida na resistência à antracnose foliar é um quesito básico para combinar eficientemente os genitores e obter populações ou híbridos superiores. Dessa forma, o entendimento da base genética da resistência de milho à antracnose foliar associado ao mapeamento de QRLs (locos de resistência quantitativa) pode facilitar a identificação, a

seleção assistida e a transferência desses QRLs entre as populações. Sendo assim, este trabalho identificou regiões genômicas responsáveis pela resistência de linhagens tropicais de milho à antracnose foliar, visando o entendimento das bases genéticas da resistência a *C. graminicola*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a resistência/suscetibilidade de progênies $F_{2:3}$ de milho tropical, bem como mapear regiões genômicas associadas a genes de resistência à *C. graminicola* através de marcadores moleculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a resistência/suscetibilidade de um conjunto de progênies $F_{2:3}$ de milho inoculadas com *C. graminicola*.
- Estimar os parâmetros genéticos associados com a resistência à antracnose foliar.
- Mapear as regiões genômicas responsáveis por QRLs à antracnose foliar.
- Quantificar os efeitos dos QRLs para a resistência e inferir sobre a estabilidade dos QRLs mapeados nos diferentes ambientes e períodos de avaliação da doença.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) pode ser considerado uma das mais importantes fontes de alimento da atualidade. Cultivado em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo, é utilizado como fonte energética tanto para a alimentação humana quanto para a animal (BORÉM; GIÚDICE; 2004). A importância da cultura para a produção animal pode ser mensurada pelo fato de que 80 % do milho nacional é consumido na forma de ração. O emprego na alimentação humana é por sua vez, de expressão bem reduzida, se comparado ao volume destinado à composição de rações (TROCCOLI, 1994).

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de milho, ocupando a terceira posição. Os Estados Unidos é o maior produtor, com 273,8 milhões de toneladas, seguido da China com produção de 205,6 milhões (USDA, 2013). Segundo a CONAB (2014) a produção nacional da cultura na safra de 2013/14 foi de 79 milhões de toneladas (primeira + safrinha), porém a produtividade média do país é baixa com aproximadamente 5.000 kg ha⁻¹. Este rendimento tem sido atribuído às condições climáticas adversas, ao baixo nível de capitalização dos pequenos produtores e à consequente redução da quantidade de insumos utilizados (CRUZ et al., 2011).

Diversos fatores culturais podem influenciar o potencial de rendimento de grãos em milho, como a disponibilidade hídrica, a fertilidade do solo, a população de plantas e o manejo adequado de plantas daninhas, pragas e doenças. As doenças estão entre os fatores de maior importância, uma vez que podem causar perdas no rendimento de grãos na ordem de 60% (JARDINE; LACA, 2009), além de reduzirem a palatabilidade e o valor nutritivo dos grãos e da forragem (REIS; CASA; REIS, 2004).

A literatura indica que historicamente o progresso genético obtido pelos programas de melhoramento da cultura em vários países foi em função do aumento da resistência ou da tolerância aos estresses bióticos/abióticos relacionados com as mudanças nos sistemas de produção (POZAR et al., 2009).

3.2 DOENÇAS FOLIARES

Especialmente, a partir da década de 90, observou-se um aumento da incidência e da severidade de algumas doenças foliares no milho, causando sensível redução na qualidade dos grãos e no potencial de rendimento da cultura (PINTO, 2004). A evolução das doenças no milho está estreitamente relacionada à evolução dos sistemas de cultivo. As modificações ocorridas no sistema de produção, que resultaram em incremento de produtividade, foram também responsáveis pelo aumento da incidência/severidade das doenças. A expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), a adoção do sistema de plantio direto sem rotação de culturas, o aumento no uso de sistemas de irrigação e o uso de genótipos suscetíveis tem promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no incremento, a cada safra, de novos problemas culturais relacionados à ocorrência de doenças (COSTA; CASELA; COTA, 2009).

As doenças fúngicas que incidem na cultura do milho podem comprometer o rendimento da cultura (WHITE, 1999). Para Casa e Reis (2003), as doenças foliares são responsáveis por danos de 40 % no rendimento de grãos. Dentre as principais doenças foliares fúngicas destacam-se: a cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*), a mancha branca (*Phaeosphaeria maydis*), as ferrugens (*Puccinia polysora*, *Puccinia sorghi* e *Physopella zeae*) e a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) (COSTA; CASELA; COTA, 2009). Além dessas, nos últimos anos tem-se observado um aumento na incidência e severidade da antracnose foliar em lavouras de milho (FERREIRA; CASELA, 2001; WORDELL; CASA, 2010; REZENDE et al., 2004).

A antracnose foliar causa redução na produtividade, devido ao menor peso dos grãos (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). Isto se deve ao fato da antracnose foliar reduzir a área fotossintética, possibilitar a senescência precoce das folhas, diminuindo a produção de fotoassimilados para o enchimento dos grãos (COSTA; CASELA; COTA, 2009).

3.3 ANTRACNOSE FOLIAR

Até 1972 a antracnose do milho foi considerada de importância secundária nos Estados Unidos. Dois anos após ter sido detectada a campo, epidemias severas inviabilizaram a cultura de milho doce no Estado de Indiana (WARREN et al., 1973; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). Explicações para a súbita e generalizada ocorrência desta epidemia está no surgimento de uma raça de *C. graminicola* mais virulenta (WHEELER; POLITIS;

PONELEIT, 1974), no uso de genótipos mais suscetíveis, nas mudanças climáticas favorecendo as interações patogênicas e nas alterações das práticas culturais (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

No Brasil a antracnose passou despercebida por muito tempo, devido à baixa incidência em lavouras comerciais, pela utilização de cultivares com certa resistência e pela adoção de práticas culturais que não favoreciam o desenvolvimento da doença (FERREIRA; CASELA, 2001). Em 1965 foi relatado o primeiro caso da antracnose em campos de produção de sementes de milho híbrido, na região de Campinas (SILVEIRA; FIGUEIREDO; CRUZ, 1965). Desde então, a antracnose tem sido relatada no grupo das doenças mais importantes da cultura do milho no Brasil (COTA et al., 2012) e em outras regiões do mundo (LEONARD, 1974; PERKINS; HOOKER, 1979; PUPPAT; MEHTA, 1969; WARREN et al., 1973).

Relatos de danos causados pela antracnose foliar nos Estados Unidos foram de 19 e 28% para híbridos e linhagens, respectivamente (SMITH, 1976). Porém, especificamente para o Brasil, ainda não existem estimativas de danos no rendimento de grãos associados à antracnose foliar. Embora, para a antracnose do colmo Matiello et al. (2013) estimaram danos de até 20 % no rendimento de grãos.

O agente patogênico da antracnose do milho é o fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; HOOKER, 1976; WILLIANSO; FOKKEMA, 1985). *Glomerella graminicola* Politis é a fase sexual (perfeita) do patógeno, esta fase é raramente encontrada na natureza e produz ascósporos unicelulares e hialinos, depositados no interior de ascas de formato cilíndrico a clavado, ambos produzidos em peritécios (FERREIRA; CASELA, 2001). Vaillancourt e Hanau (1992) obtiveram a partir de isolados monospóricos de *C. graminicola*, a fase sexual caracterizada por peritécios rostrados, ascas cilíndricas, clavadas, com um poro no ápice. Na fase imperfeita ou assexual, o fungo forma estruturas estomáticas com numerosas setas chamadas de acérvulos, dentro dos quais são produzidos os conídios e conidióforos.

Os conídios são unicelulares, hialinos e falciformes, medindo $30\mu \times 5\mu$, produzidos sobre os conidióforos também hialinos sem septos (FERREIRA; CASELA, 2001). Os conídios podem permanecer viáveis de semanas a meses, dependendo da umidade relativa do ar, e desde que estejam recobertos pela matriz mucilaginosa. A matriz é composta de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, sendo essencial para a sobrevivência e a disseminação dos conídios. Na ausência desta proteção os conídios podem perder a viabilidade em poucas horas, mesmo com elevada umidade relativa do ar (BERGSTROM;

NICHOLSON, 1983; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; SILVA, 2006), em sementes podem sobreviver por até três anos (WARREN, 1977). A dispersão dos esporos normalmente ocorre por respingos da água da chuva ou da irrigação promovendo a dissolução da matriz mucilaginosa e a liberação dos esporos, ou podem ser dispersos pelo vento principalmente em períodos de estiagem (BERGTROM; NICHOLSON, 1999). Existem relatos de que a matriz mucilaginosa não está envolvida apenas na sobrevivência do fungo, mas também na indução de patogenicidade através da presença de enzimas que são importantes no estabelecimento inicial do patógeno (BERGSTROM; NICHOLSON, 1983).

A água tem papel fundamental na germinação dos conídios, tendo em vista que a doença é favorecida pela alta umidade e temperatura moderada (JAMIL; NICHOLSON, 1987). A temperatura ideal para o desenvolvimento de *C. graminicola* é de 30°C (LEONARD; THOMPSON, 1976), podendo haver variação em relação ao genótipo adotado. Skoropad (1967) relatou que a germinação e a formação dos apressórios podem ocorrer numa faixa maior de temperatura (15 a 35°C), mas a penetração nos tecidos do hospedeiro somente ocorrerá numa amplitude de 25 a 30°C. Após o contato com a superfície do hospedeiro, os conídios requerem, de 6 a 8 horas para germinarem (BERGSTROM; NICHOLSON, 1983; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

Todas as partes da planta de milho podem ser infectadas por *C. graminicola*, incluindo folhas, colmo, espigas, raízes e pendão resultando em diferentes sintomas, porém a doença é mais comumente encontrada na forma de antracnose foliar e de colmo (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; DALE, 1963; LIM; WHITE, 1978; ZUBER et al., 1981). No colmo, os sintomas surgem geralmente na epiderme logo após o estágio de florescimento, apresentando lesões estreitas, longitudinais e encharcadas, inicialmente de coloração pardo-avermelhada, tornando-se castanho-escura a negra (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; COSTA et al., 2010).

Os sintomas da antracnose foliar caracterizam-se por lesões escuras de tamanho variável (0,5 a 1,5 mm), de forma arredondada a ovalada, podendo apresentar bordas irregulares. Nessas lesões formam-se numerosos acérvulos os quais permitem a identificação da doença a campo. Nos genótipos muito suscetíveis, as lesões coalescem, causando a morte prematura das folhas baixas da planta (FERREIRA; CASELA, 2001). A doença se desenvolve melhor em tecidos mais velhos, embora possa infectar folhas jovens (JAMIL; NICHOLSON, 1987).

A principal fonte de inóculo primário são os conídios produzidos e deixados nos resíduos culturais, pois *C. graminicola* é um fungo saprófita facultativo, capaz de sobreviver nos resíduos culturais de milho deixados sobre a superfície do solo (JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011). A esporulação nas lesões foliares é responsável por novas lesões foliares e também pelas infecções do colmo (LIPPS, 1988).

Além dos fatores climáticos, a adubação nitrogenada pode contribuir para a severidade da doença. Santos et al. (2013) observaram aumento significativo da severidade da antracnose foliar com o incremento nas doses de nitrogênio em cobertura. Segundo Gomes et al. (2007), doses elevadas de nitrogênio possibilitam a melhoria no desenvolvimento vegetativo das plantas com maior disponibilidade de área foliar. Além disso, o maior suprimento de nitrogênio leva ao aumento da concentração de aminoácidos e amidas no apoplasto e na superfície foliar (MALAVOLTA, 2006; HUBER; THOMPSON, 2007). Nos últimos anos, alguns estudos tem demonstrado que esses compostos parecem estar relacionados com a germinação e a infecção, principalmente de fungos e, conseqüentemente, com a severidade das doenças (LIMA et al., 2010; MARSCHNER, 1995).

3.4 RESISTÊNCIA GENÉTICA DE MILHO À ANTRACNOSE FOLIAR

A utilização da resistência genética em cultivares comerciais é considerada a principal estratégia para o controle da antracnose (CARSON; HOOKER, 1981a; CARSON; HOOKER, 1981b; SILVA et al. 1986; LIM; WHITE, 1978), porém pouco se conhece sobre os mecanismos de expressão dos genes de resistência à antracnose foliar.

A literatura indica que a resposta do milho para a resistência à antracnose foliar, envolve a biossíntese de compostos fenólicos e a deposição de lignina sobre os pontos de infecção (BERGSTRON; NICHOLSON, 1999; LYONS; WOOD; NICHOLSON, 1990). Vargas et al. (2012) ao investigarem as respostas de defesa de folhas de milho inoculadas com *C. graminicola*, relataram o acúmulo de compostos antimicrobianos, tais como as fitoalexinas, fenilpropanóides e espécies reativas de oxigênio (superóxidos e peróxido de hidrogênio) na fase inicial da infecção.

Os fatores climáticos também estão envolvidos na resistência/suscetibilidade das plantas. Estudos indicam que a alta intensidade luminosa pode aumentar a resistência da planta à antracnose foliar através do acúmulo de antocianina ao redor das lesões, resultando em lesões de menor tamanho (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977).

A resistência genética é o método de controle mais eficaz tanto para a fase de colmo quanto para a fase foliar (COÊLHO et al., 2001). Diante disto, entender a herança da resistência genética é fundamental para determinar o número de genes e a ação gênica envolvida na resistência. A estimação dos parâmetros genéticos associados à resistência permite direcionar os trabalhos de incorporação da resistência em germoplasmas suscetíveis, possibilitando maiores ganhos com a seleção artificial. Adicionalmente, estes estudos permitem melhor direcionar e maximizar a exploração da variabilidade genética pelos programas de melhoramento (SILVA et al., 2001).

Vários trabalhos tem sido realizados com o objetivo de conhecer o controle genético da resistência de milho à antracnose (foliar e colmo). A grande maioria dos estudos indicam uma herança oligogênica (poucos genes) com ação gênica aditiva e de dominância, embora na maioria das vezes os efeitos aditivos tenham sido de maior importância (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; CARSON; HOOKER, 1981a; LIM; WHITE, 1978; PROCHNO, 2013; SILVA, 1983).

Estima-se que de um a quatro genes estejam envolvidos na resistência de milho à antracnose foliar. Dois genes codominantes de resistência à antracnose foliar foram descritos por Badu-Apraku; Gracen e Bergstrom (1987b), na fase de plântula e planta adulta em linhagens tropicais de milho com base na análise de médias das gerações.

Badu-Apraku; Gracen e Bergstrom (1987a) identificaram um gene de grande efeito controlando a resistência à antracnose foliar. Da mesma maneira, Rezende et al. (2004) utilizando o modelo de herança mista relataram um gene de efeito maior. Os autores concluíram que a ação gênica, tanto do gene maior como dos poligenes é aditiva e dominante, com predominância dos efeitos aditivos. Da mesma forma, Coêlho et al. (2001), relataram herança monogênica, com dominância completa para o alelo que confere resistência neste patossistema.

Carson e Hooker (1981a) avaliaram as gerações de cinco famílias oriundas do cruzamento entre cinco linhagens resistentes com uma suscetível à antracnose foliar. De acordo com a análise de médias das gerações, em quatro das cinco famílias houve predomínio dos efeitos genéticos aditivos em relação aos de dominância. Numa única família, a maior porcentagem da variação fenotípica foi devido aos desvios do modelo aditivo-dominante, possivelmente explicada pela presença de interação gênica ou pela ausência de uma escala diagramática adequada para a avaliação da severidade da antracnose foliar. Adicionalmente, os autores relataram a ocorrência de segregação transgressiva na geração F_2 de todas as

famílias, indicando que em cruzamentos envolvendo linhagens de resistência intermediária podem ser obtidas progênies com resistência superior às próprias linhagens parentais.

Lim e White (1978) através da avaliação de 45 híbridos obtidos de cruzamentos dialélicos entre dez linhagens endogâmicas, encontraram efeitos heteróticos negativos quando genitores contrastantes estavam envolvidos no cruzamento, sugerindo dominância parcial para a resistência de milho à antracnose foliar. As estimativas da capacidade geral e específica de combinação evidenciaram a importância tanto dos efeitos genéticos aditivos quanto dos dominantes, sendo os efeitos aditivos de maior magnitude nestes cruzamentos.

As lesões da antracnose foliar sevem como fonte secundária de inóculo para novas lesões foliares, bem como para as lesões da antracnose do colmo (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; LIPPS, 1988). Vários estudos indicam que o controle genético da resistência de milho à podridão do colmo é principalmente condicionada por poucos genes com efeitos aditivos (CARSON; HOOKER, 1991b; MÁXIMO, 2013; LIM; WHITE, 1978; TOMAN; WHITE, 1993). Embora tenham sido identificados genes de resistência com ação de dominância (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b).

Para Carson e Hooker (1991b) os efeitos aditivos foram responsáveis por mais de 90 % da variância fenotípica entre as médias de gerações de 5 populações segregantes para a resistência/suscetibilidade à antracnose do colmo. Embora em algumas populações segregantes os efeitos gênicos de dominância tenham sido mais pronunciados.

Matiello et al. (2012) relataram padrão de herança distinto entre duas populações de milho tropical. Na população DAS21 x DAS86 houve predomínio da ação gênica de dominância enquanto que na DAS64 x DAS86 maior contribuição da ação gênica aditiva. Máximo (2013) estudando a genética da resistência de milho à antracnose do colmo em nove famílias segregantes, demonstrou predomínio da ação gênica aditiva explicando em média 81,9 % da variação genética entre as médias das gerações. Os resultados evidenciaram para todas as famílias herança oligogênica, com média de 3,12 locos controlando a resistência.

A literatura indica que os mecanismos que conferem resistência ao *C. graminicola* nas folhas, na nervura central e no colmo são diferentes, manifestando-se de forma independente (HOOKER, 1976; PEREIRA, 1983). Silva (1983) estudando seis linhagens de milho e as respectivas gerações de segregação (F_1 , F_2 , RC_1 e RC_2), estimou de um a quatro genes envolvidos na resistência de milho a infecção no limbo foliar, e de um a dois para a infecção na nervura central, nas duas situações foram relatados efeitos genéticos dominantes e aditivos.

Para entender o controle genético da resistência de milho à antracnose foliar, Prochno (2013) analisou a segregação para a resistência/suscetibilidade em seis famílias oriundas do

cruzamento de linhagens contrastantes para a resistência. Os resultados evidenciaram predomínio dos efeitos genéticos aditivos na herança da resistência do milho à antracnose foliar, explicando até 99,4% da variação fenotípica. As estimativas de heterose foram elevadas e negativas em todas as famílias, revelando a capacidade das linhagens resistentes (L_R 04-2 e L_R 23-1) em transmitir os genes de resistência para as gerações filiais, resultando na menor severidade da doença.

As doenças foliares normalmente ocorrem após o período de antese, tornando difícil o controle químico com fungicidas. Assim estratégias de seleção artificial para incrementar a resistência genética nos programas de melhoramento se tornaram vitais. O conhecimento sobre a genética da resistência é essencial para a seleção de genitores e para o desenvolvimento de híbridos mais resistentes, bem como para estratégias que possibilitam a localização das regiões genômicas associadas à resistência (BARAKAT; EL-SHAFEI; AL-DOSS, 2009; INGHELANDT et al., 2012).

Os programas de melhoramento foram responsáveis pela redução de inúmeros danos causados pelas doenças. O progresso genético a partir dos vários ciclos de seleção permitiu o desenvolvimento de um germoplasma melhorado, tanto para as características agrônômicas quanto para a resistência as doenças do milho (ALI; YAN, 2012). Nos últimos anos, os programas de melhoramento têm intensificado esquemas de seleção e trabalhos de pesquisa voltados para a identificação de genes a partir de técnicas moleculares baseadas em DNA. A estratégia utilizada é a genotipagem dos indivíduos de uma população segregante com marcadores moleculares dispersos no genoma, associada com a fenotipagem para resistência/suscetibilidade das progênes segregantes (SPYRIDES-CUNHA; DEMÉTRIO; CAMARGO, 2000).

3.5 MARCADORES MOLECULARES

As tecnologias de análise do polimorfismo molecular do DNA permitem determinar pontos de referencia nos cromossomos, tecnicamente denominados de “marcadores moleculares”. A utilização de marcadores moleculares têm sido de grande importância na avaliação de variações genéticas, proporcionando uma forma eficiente de vincular variação fenotípica e genotípica em populações de diversas espécies vegetais (VARSHNEY et al., 2005; KALIA et al., 2011). Estas ferramentas moleculares têm contribuído na identificação e na caracterização dos efeitos fenotípicos de genes de interesse agrícola como aqueles de

resistência a insetos e doenças (SIMCOX; BENNETZEN, 1993; BRUNELLI; SILVA; CAMARGO, 2002).

Os marcadores moleculares podem ser úteis em análise genética para inúmeras finalidades. Nos programas de melhoramento, as aplicações a curto prazo incluem a identificação e a discriminação de genótipos e no médio/longo prazo, permitem quantificar a variabilidade genética existente, correlacionando com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento molecular. As informações geradas na fase analítica podem ser integradas às metodologias de seleção como ferramentas adicionais para promover o avanço genético das populações sob seleção (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O uso de marcadores moleculares para o mapeamento genético permitiu identificar regiões associadas à herança poligênica através do mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) possibilitando localizar regiões genômicas de interesse, facilitando a seleção assistida por marcadores (SAM). Marcadores de DNA proximamente ligados a regiões genômicas de interesse agrônomo podem ser utilizados como ferramenta molecular na SAM (RIBAUT; HOISINGTON, 1998). A SAM é utilizada com êxito, principalmente nos casos em que a característica de interesse é de difícil avaliação e altamente influenciada pelos efeitos ambientais, sendo portanto, possível reduzir o tempo e os custos dos programas de melhoramento (SOUZA, 2001). Esta técnica tem auxiliado o melhorista na introgressão de genes via programa de retrocruzamentos e na possibilidade de piramidização de genes de interesse numa única cultivar (ASEA et al., 2012).

O uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas possibilitou um novo campo na pesquisa chamado de ‘melhoramento molecular’. Adicionalmente, possuem outras aplicações como estudos de filogenia, *pedigree*, diagnose de doenças, predição de desempenho de híbrido (RAFALSKI; TINGEY, 1993).

O primeiro marcador desenvolvido foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (BOTSTEIN et al., 1980). Este marcador baseia-se no padrão de fragmentos produzidos pela digestão do DNA com enzimas de restrição, seguido de hibridização por sondas. Em meados da década de 80, Kerry Mulis descobriu um processo simples e eficiente de multiplicar moléculas de DNA *in vitro* e em escala exponencial a partir de uma única molécula de DNA (MULIS; FALONA, 1987). Esta técnica ficou conhecida como Reação em Cadeia da Polimerase, ou PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Esta reação se baseia em ciclos repetidos de replicação *in vitro* de moléculas de DNA. Cada nova molécula sintetizada em um ciclo é utilizada como molde no ciclo seguinte, resultando no aumento exponencial do número de moléculas de DNA amplificadas (CAIXETA et al., 2009).

Vários marcadores baseados na técnica de PCR já foram desenvolvidos, dentre eles podem-se destacar: o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (VOS et al., 1995) e o microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (JACOB et al., 1991; TAUTZ, 1989). A escolha do marcador molecular mais adequado para estudos genéticos e ou de melhoramento deve ser feita com base na facilidade do desenvolvimento da técnica, somada a eficiência da avaliação, interpretação e análise dos dados (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

3.5.1 Marcador Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*)

O marcador microssatélite (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989) se tornou popular primeiramente em estudos genéticos com mamíferos, e tem gerado um considerável interesse entre geneticistas de plantas. Nos últimos anos foram desenvolvidos para muitas espécies vegetais como o milho (SENIOR et al., 1996), soja (RONGWEN et al., 1995), trigo (RÖDER et al., 1995), *Brassicas* (LAGERCRANTZ; ELLEGREN; ANDERSSON, 1993), *arabidopsis* (BELL; ECKER, 1994) e videira (BROWERS et al., 1996).

O SSR ganhou importância na genética vegetal, por uma série de características desejáveis, como a hipervariabilidade, a natureza multialélica, a expressão codominante, a reprodutibilidade, a localização em cromossomo específico e a ampla cobertura dos genomas. Este marcador é passível de genotipagem de alto rendimento, portanto, apropriado para determinação de paternidade, construção de mapas de ligação de alta densidade, mapeamento de genes de interesse, seleção assistida por marcadores e para o estabelecimento de relações genéticas e evolutivas (KALIA, et al., 2011; PARIDA et al., 2009).

O SSR é altamente vantajoso na análise de *pedigree*, pelo fato destes apresentarem um único loco (JOSHI; RANJEKAR; GRUPTA, 1999). Outra aplicação importante dos microssatélites é na confirmação da condição híbrida (F_1), onde a natureza codominante do marcador SSR desempenha papel-chave, permitindo detectar a contribuição alélica de cada genitor para a formação do indivíduo híbrido (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996).

Os microssatélites são amplamente distribuídos no genoma vegetal, com frequência média de um a cada 50 mil pares de bases. Consistem em sequências curtas de nucleotídeos, geralmente de 2-10 pb, repetidas em tandem e flanqueadas por sequências específicas, sendo o elemento repetido mais comum o di-nucleotídeo AT (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Os

trechos de motivos repetidos em tandem no DNA podem ser di, tri ou tetra nucleotídeos como $(GA)_n$, $(ATT)_n$, ou $(ATGT)_n$, respectivamente (WEBER, 1990).

A grande vantagem do microssatélite é que podem ser visualizados em géis de agarose e poliacrilamida após amplificação via PCR usando iniciadores (*primers*) de sequências específicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Além disso, apresentam localização definida nos grupos de ligação do mapa consenso de milho, correspondendo aos cromossomos da espécie. Esse marcador fornece informação extremamente útil para os melhoristas no agrupamento de genótipos e para o planejamento dos cruzamentos (LU; BERNARDO, 2001).

A maior limitação do microssatélite é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie, não sendo possível utilizar a estratégia de desenho de *primers* universais. Além disso, a construção da biblioteca genômica envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo. No entanto, uma vez desenvolvidos, podem ser utilizados com facilidade e rapidez, típico da técnica de PCR (CAIXETA et al., 2009).

3.5.2 Marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

O marcador molecular AFLP é baseado na amplificação via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da dupla digestão do DNA genômico com enzimas de restrição (VOS et al., 1995). A técnica envolvida neste marcador é composta de quatro etapas. Na primeira, o DNA é submetido à dupla digestão com enzimas de restrição, de corte raro (reconhecem sítios de 6-8 bases, ex.: *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) e de corte frequente (reconhecem sítios de 4 bases, ex. *MseI* e *TaqI*). Na segunda etapa, os fragmentos gerados pelas enzimas de restrição são ligados a adaptadores específicos. Na terceira, iniciadores (*primers*) específicos complementares a essas sequências são utilizados para amplificação dos fragmentos de restrição. Este procedimento é realizado em duas fases, sendo a primeira denominada pré-seletiva, onde um subconjunto de fragmentos é amplificado com *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na extremidade 3', e na segunda (amplificação seletiva) é feita uma seleção mais intensiva dos fragmentos pré-amplificados, com *primers* contendo três nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Os fragmentos AFLPs são separados em gel de alta resolução (poliacrilamida) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996) e corados pela impregnação do íon nitrato de prata (CRESTE; TULMANN NETO; FIGUEIRA, 2001).

Com a utilização do AFLP é possível a análise simultânea de um grande número de fragmentos, possibilitando uma ampla amostragem do genoma (AJMONE-MARSAN et al.,

2001). Dentre os marcadores de DNA o AFLP é o único que permite visualizar um grande número de locos amplificados num único gel (VOS et al., 1995). As maiores vantagens associadas ao AFLP estão a capacidade multiplex (elevado número de fragmentos polimórficos por gel), ausência de conhecimento prévio das sequências de DNA e pode ser testado para um número ilimitado de *primers* (VUYLSTEKE et al., 1999). Assim, este marcador pode ser considerado uma poderosa ferramenta molecular para o mapeamento de genes que controlam características de importância agronômica em plantas como a resistência às doenças (VAN DER VOORT et al., 1999; XU et al., 1999).

A principal desvantagem do AFLP está na dificuldade em identificar os alelos homólogos, por apresentar expressão dominante, tornando esse método menos eficiente para os estudos que necessitem do estado alélico, como nas análises que envolvam locos na condição heterozigota. Em contrapartida, o elemento chave deste marcador diz respeito à grande capacidade em realizar *screening* simultâneo em várias regiões do DNA distribuídas aleatoriamente pelo genoma da espécie analisada (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

3.6 MAPEAMENTO GENÉTICO

A maioria das características de importância agronômica, almejadas nos programas de melhoramento de plantas, é determinada por vários locos, apresentam variação contínua e são muito influenciadas pelo ambiente. Na genética, estas características são ditas de herança quantitativa e as regiões que afetam um caráter quantitativo são designados de QTL (*Quantitative Trait Loci*) (FALCONER; MACKAY, 1996; MATHER; JINKS, 1971; RAMALHO et al., 1993). Inferências sobre a relação entre os dados fenotípicos de características quantitativas e os genotípicos dos QTLs no genoma, podem ser realizadas através da análise de mapeamento. Adicionalmente, possibilita mensurar o número de locos, a localização, a ação gênica do QTL e a interação QTLs x ambientes de avaliação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

A localização dos QTLs de interesse é feita através dos mapas de ligação, pois estes indicam a posição e as distâncias genéticas relativas entre os marcadores ao longo do grupo de ligação/cromossomo. O mapeamento de QTLs baseia-se no princípio de que os QTLs e os marcadores moleculares polimórficos segregam via recombinação cromossômica (*crossing-over*) durante a meiose, permitindo assim a análise numa determinada população segregante (PATERSON, 1996).

O primeiro passo para a construção de uma mapa de ligação envolve a escolha dos genitores. A obtenção da população de mapeamento deve partir de genitores que sejam homozigotos e altamente contrastantes para a característica de interesse. Vários tipos de populações podem ser empregadas no mapeamento molecular (McCOUCH; DOERGE, 1995; PATERSON, 1996). As populações mais conhecidas e utilizadas no mapeamento de QTLs são: populações segregantes F_2 , retrocruzamentos, linhas puras recombinantes derivadas de plantas F_2 e linhas duplo-haplóides obtidas de gametas da geração F_1 (COELHO, 2000). Outro ponto importante é o tamanho da população segregante que será utilizada. Normalmente, populações segregantes com mais de 100 indivíduos, possibilitam a construção de mapas de ligação saturados e êxito no mapeamento de regiões genômicas de interesse.

A escolha da população mais adequada para o mapeamento está relacionada com o tipo de marcador molecular (TANKSLEY et al., 1988). O máximo de informação genética é alcançado quando se utiliza uma população F_2 e marcadores de expressão codominante (STAUB; SERQUEN; GRUPTA, 1996). A grande vantagem da utilização da F_2 no mapeamento deve-se ao fato desta geração ser portadora de dois gametas informativos que têm seus locos em desequilíbrio de ligação, e não por um único gameta como no caso das populações oriundas do retrocruzamento. Dessa forma, um indivíduo F_2 apresenta aproximadamente duas vezes mais informação que um indivíduo oriundo de uma geração de retrocruzamento (COELHO, 2000). A principal limitação para utilização de indivíduos F_2 é que a avaliação fenotípica em mais de um ambiente torna-se impossível, pois os indivíduos desta geração são únicos. Este problema pode ser contornado utilizando progênies $F_{2:3}$ para a avaliação fenotípica, permitindo assim maior disponibilidade de sementes de cada progênie e avaliá-las em ambientes e anos diferentes, obtendo dados fenotípicos de melhor qualidade (COELHO, 2000).

A distância no mapa de ligação é medida em frequência de recombinação entre os marcadores genéticos (PATERSON, 1996). As distâncias de mapa são convertidas em centiMorgans (cM) com base nas frequências de recombinação através das funções de mapeamento, sendo as mais utilizadas as de Haldane e de Kosambi (HARTL; JONES, 2001; KEARSEY; POONE, 1996).

Existem várias metodologias genéticas-estatísticas para a detecção de QTLs como: a análise de marca simples (*Single Marker Analysis*) (EDWARDS; STRUBER; WENDEL, 1987), o mapeamento por intervalo (*Interval Mapping* – MI) (LANDER; BOTSTEIN, 1989) e o mapeamento por intervalo composto (*Composite Interval Mapping* – MIC) (JANSEN, 1993; ZENG, 1994). A análise de marca simples é feita verificando a diferença entre as

médias fenotípicas do caráter para cada uma das classes genotípicas de um dado marcador. Se as diferenças entre as médias fenotípicas forem significativas, infere-se pela existência de um QTL ligado à marca sob análise (LYNCH; WALSH, 1998). Vários procedimentos estatísticos podem ser utilizados nesta análise, como o teste de *t*, a ANOVA e a regressão linear (ZENG, 1994; DOERGE; ZENG; WEIR, 1997; BEARZOTI, 2000). Este método possui a vantagem de ser simples, porém a maior limitação está relacionada à distância do marcador e do QTL. Quanto maior for a distância entre o marcador e o QTL, menor a probabilidade de detectá-lo. Além disso, os efeitos genéticos do QTL normalmente são subestimados, pois seus estimadores são viesados pela fração de recombinação entre o marcador e o QTL.

O mapeamento por intervalo (MI) visa contornar os problemas encontrados na análise de marca simples. Neste método são consideradas na análise pares de marcas adjacentes. A detecção da presença e a estimação dos efeitos dos QTLs são realizadas dentro do intervalo entre as marcas, utilizando o método da máxima verossimilhança para estimar a frequência de recombinantes e a magnitude do efeito do QTL no intervalo entre as marcas. Uma das desvantagens do MI é de não aproveitar a informação de marcas fora do intervalo mapeado e que por ventura possuam associação com um QTL. Além disso, eventuais QTLs que estejam próximos ao intervalo em questão interferem no processo de estimação, levando em alguns casos, a detectar a existência de um QTL fantasma no intervalo (LANDER; BOTSTEIN, 1989; ZENG, 1994).

O mapeamento por intervalo composto (MIC) combina o mapeamento por intervalo com a análise de regressão linear múltipla. Nesta metodologia considera-se que os efeitos dos QTLs situados fora do intervalo podem interferir na variância do caráter em estudo, influenciando, portanto na detecção e no mapeamento dos QTLs. Uma forma de minimizar os efeitos destes QTLs fora do intervalo é incluí-los na análise de cofatores, possibilitando maior poder de detecção, acurácia da posição e precisão dos efeitos genéticos dos QTLs estimados (JANSEN, 1992; 1993; JANSEN; STAM, 1994; JANSEN et al., 1995; ZENG, 1993, 1994). A declaração da presença de um QTL no mapa de ligação é baseada no limite crítico da estatística *LOD score* ($LOD = 3,0$). Somente acima deste valor de LOD, um QTL é considerado presente. Um *LOD score* igual a 3,0 numa posição do intervalo mapeado, indica que a hipótese de ocorrência do QTL é 10^3 vezes mais provável que a hipótese da não ocorrência daquele QTL (BERNARDO, 2002; ZENG, 1994).

3.7 ANÁLISE DE *BULKS* SEGREGANTES (BSA)

A análise de *bulks* segregantes (*Bulked Segregant Analysis* – BSA) proposta por Michelmores, Paran e Kesseli (1991) apresenta grande vantagem nos trabalhos de mapeamento, pois pode ser utilizada na fase inicial das análises, possibilitando maior agilidade na detecção de locos potenciais, além de reduzir o número de locos marcadores a serem analisados na população de mapeamento. A análise se baseia na constituição de *bulks* de amostras de DNA de indivíduos com fenótipos extremos pertencentes à população segregante. Presume-se que locos marcadores ligados a genes que controlam o caráter fenotípico estejam distribuídos de forma desigual nos dois *bulks*, sendo assim detectados por meio de polimorfismo entre eles. Marcadores não ligados devem estar aleatoriamente distribuídos entre os *bulks*, sendo, portanto monomórficos. Os marcadores potenciais são posteriormente analisados na população segregante para confirmar a associação a partir da análise de co-segregação do loco marcador com os dados da fenotipagem.

A análise de BSA é limitada para a detecção de QTLs de pequeno efeito (LYNCH; WALSH, 1998), porém a grande vantagem está em analisar rapidamente um grande número de marcadores e consequentemente a otimização do mapeamento de regiões que flanqueiam locos de caracteres quantitativos de efeitos fenotípicos mais pronunciados. No BSA, apenas o polimorfismo para marcadores situados a uma distância menor que 30 cM da região alvo são detectados, a partir de dados de populações F₂ de milho (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991).

Esta metodologia tem sido utilizada com sucesso em várias espécies de importância agrícola, visando o mapeamento de QRLs (*Quantitative Resistance Loci* ou Locos de Resistência Quantitativa) de resistência a doenças, como míldio em alface (MICHELMORE, PARAN, KESSELI (1991), *Phaeosphaeria maydis* em milho (LOPES, 2003), antracnose foliar em milho (REZENDE, 2004), antracnose do colmo em milho (TASIOR, 2014), *Phakopsora pachyrhizi* em soja (BATISTA, 2008) e a Virose do Mosaico Dourado em feijão Caupi (RODRIGUES, 2011).

3.8 MAPEAMENTO DE LOCOS DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS EM MILHO

A identificação de regiões genômicas associadas com resistência à doenças é crucial para o desenvolvimento de genótipos de milho mais resistentes. Estudos indicam que já foram mapeados no genoma do milho 17 locos de resistência qualitativa e 437 de resistência

quantitativa para diferentes doenças na cultura (BALINT-KURTI; JOHAL, 2009; JIANG et al., 2008; POLAND et al., 2009; WISSER; BALINT-KURTI; NELSON, 2006; XIAO et al., 2006; ZHANG et al., 2002).

Os estudos de mapeamento de QTLs associados com resistência a doenças em milho têm fornecido informações importantes sobre a arquitetura genética da resistência como o número, a localização e os efeitos dos QTLs. Todas as regiões genômicas associadas com resistência quantitativa foram identificadas com o auxílio dos marcadores moleculares (TANKSLEY, 1993).

McMullen e Simcox (1995) demonstraram a organização genômica de genes de resistência a diversos patógenos que causam doenças em milho. Os autores relatam que locos que condicionam resistência em milho estão agrupados em determinadas regiões do genoma. Grupos de genes de resistência fortemente ligados foram identificados nos cromossomos 3 e 6. A região 3.04 do cromossomo 3 inclui os genes de resistência *mv1* (*Maize Mosaic Vírus*), *wsm2* (*Wheat Streak Mosaic Virus*) e *rp3* (*Puccinia sorghi*), QRLs para a *Cercospora zeamaydis* e *Cochliobolus heterostrophus* também foram identificados nesta região. No cromossomo 6 (região 6.01) três genes de resistência foram mapeados: *wsm1* (*Wheat Streak Mosaic Virus*), *mdm1* (*Maize Dwarf Mosaic Virus*) e *rhm* (*Cochliobolus heterostrophus*). Nos 10 cromossomos do milho foram identificados QRLs para pelo menos dois patógenos diferentes (MCMULLEN; SIMCOX, 1995; WISSER; BALINT-KURT; NELSON, 2006).

Seis QRLs foram mapeados para resistência à *Phaeosphaeria maydis* em cinco cromossomos, com 1 QRL nos cromossomos 1 (1.03), 3 (3.07 a 3.08), 4 (4.08) e 6 (6.06 a 6.07), e dois no cromossomo 8 (8.00 a 8.03 e 8.06 a 8.07), todos com efeitos aditivos negativos. A proporção da variância fenotípica explicada por estes QRLs variou de 2,91 (8.06 a 8.07) à 11,86 % (8.00 a 8.03) (MOREIRA; BENTO; SOUZA JÚNIOR, 2009). Lopes (2003) identificou pelo mapeamento por intervalo composto 10 QRLs distribuídos em seis grupos de ligação, sendo 2 QRLs no grupo 1, 2 no 2, 3 no 4, 1 no 5, 1 no 6 e 1 no grupo 9. A proporção da variação fenotípica explicada pelos QRLs variou de 9,54 (intervalo Phi85-Bnlg1306 – cromossomo 5) à 63,61 % (intervalo E4450747-E3249153 – cromossomo 2).

Pozar et al. (2009) mapearam 4 QTLs associados com resistência à *Cercospora zeamaydis*. Dois com efeitos aditivos foram mapeados no cromossomo 1 nas regiões 1.05 e 1.07, com variação fenotípica de 8 e 11 %, respectivamente. O terceiro QTL foi identificado no cromossomo 3 na região 3.06-3.07, sendo considerado estável para os ambientes de avaliação, pois foi mapeado em 3 dos 4 ambientes e responsável por uma amplitude de 6 a 27 % da

variação fenotípica. Por fim, a identificação do quarto QTL com efeito aditivo no cromossomo 7.03 em dois ambientes de avaliação.

Apesar da grande quantidade de trabalhos com mapeamento de genes de resistência à doenças em milho, poucos são os que dizem respeito ao mapeamento de QRLs à antracnose foliar. Genes que controlam a resistência à podridão do colmo por *C. graminicola*, foram localizados através da técnica de translocação recíproca, no braço longo dos cromossomos 1, 4 e 8 e nos dois braços do cromossomo 6 (CARSON; HOOKER, 1982). Jung et al. (1994) utilizando o marcador RFLP, identificou uma região genômica no cromossomo 4, fortemente associada com um QTL responsável por 73 % da variação fenotípica. Matiello (2004) encontrou sete regiões genômicas associadas a alelos de resistência nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os quais explicaram de 2,1 a 14,7 % da variação fenotípica para resistência à antracnose do colmo.

Recentemente, Tasior (2014) mapeou QRLs para a antracnose do colmo nos 10 cromossomos de milho, com coeficientes de regressão parciais explicando de 15,4 a 83,6 % da variação fenotípica em resistência. 13 QRLs evidenciaram efeito aditivo negativo, ou seja, alelos de resistência originários da fonte L04-2 e 18 oriundos da linhagem suscetível. O loco identificado no cromossomo 4 (4.11 a 4.12), possivelmente seja o mesmo QRL mapeado por Jung et al. (1994) em função da posição no grupo de ligação bem como pelos elevados coeficientes de regressão parciais (75,4 a 82,7 %) deste QRL. Este foi o primeiro relato da localização de locos de resistência à antracnose do colmo nos 10 grupos de ligação do mapa consenso do milho.

Morello (2000) através do marcador microssatélite encontrou polimorfismo molecular próximo ao gene *Rcg1*, o qual confere resistência à antracnose foliar. Fortes evidências indicam que, na população estudada (F_2), o *Rcg1* está localizado no braço longo do cromossomo 2 do milho. Esta região foi amplificada com o *primer* microssatélite nc003 (2.06) e, na análise de ligação, foi observado que este marcador está co-localizado a 31,9 cM do *Rcg1*.

Rezende (2004) identificou QRLs nos cromossomos 2, 3, 5 e 10 através da análise de regressão linear múltipla, os quais explicaram até 25,7 % da variação fenotípica em resistência à antracnose foliar. Pelo mapeamento por intervalo composto foi identificado pelo menos dois QRLs com efeitos aditivos negativos no cromossomo 10, explicando 32,3 % da variação fenotípica para a resistência nos experimentos realizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas safras agrícolas de 2012/2013 e 2013/2014 na Fazenda Escola “Capão da Onça” da Universidade Estadual de Ponta Grossa, no município de Ponta Grossa, localizada no Segundo Planalto Paranaense, a 25°05'49"S de latitude Sul e 50°03'11" de longitude Oeste, com altitude máxima de 950 m. O solo é classificado como um CAMBISSOLO HÁPLICO Tb Distrófico típico, com textura argilosa (EMBRAPA, 2006). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é tipificado como Cfb, ou seja, subtropical úmido, mesotérmico, sem estação seca definida e com geadas frequentes no inverno. A temperatura média nos meses mais quentes é de 21,4°C e nos meses mais frios de 13°C, com média pluviométrica anual de 1574 mm (IAPAR, 2012).

4.1 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES $F_{2:3}$ DE MILHO À ANTRACNOSE FOLIAR

4.1.1 Material Vegetal

A partir do cruzamento das linhagens endogâmicas L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível) previamente caracterizadas por Prochno (2013), foram obtidas as gerações F_1 e F_2 . Os indivíduos da geração F_2 foram autofecundados, dando origem as progênies $F_{2:3}$, as quais foram avaliadas fenotipicamente para a resistência à antracnose foliar em três experimentos de campo.

4.1.2 Experimentos de Campo

O sistema de semeadura utilizado foi o plantio direto na palha de aveia ou trigo. As áreas experimentais foram inicialmente dessecadas com glifosato (Trop[®] SL) e paraquat (Gramoxone[®] 200 SL), nas doses de 3,0 e 0,2 L de p. c. ha^{-1} , respectivamente, acrescidos de 0,3 L ha^{-1} de óleo mineral (Dash[®] HC CE). Através da máquina semeadora/adubadora de parcelas da Semeato, modelo PS-8, as áreas foram riscadas e adubadas com espaçamento entrelinhas de 0,9 m e adubação de base ajustada para 350 kg ha^{-1} da fórmula comercial 06-10-12, seguido da semeadura manual dos respectivos tratamentos.

A adubação de cobertura foi realizada à lanço entre os estádios de desenvolvimento V5 e V6, com a aplicação de 200 kg ha^{-1} da fórmula comercial 14-00-18. O controle de

plantas daninhas foi realizado em pós-emergência da cultura pela aplicação dos herbicidas atrazina (Gesaprim[®] GrDA) e tembotriona (Soberan[®] SC), nas doses de 3,0 e 0,2 L de p.c. ha⁻¹. Para o controle de insetos praga foi utilizado os inseticidas tiodicarb (Larvin[®]), flubendiamida (Belt[®]), triflumuron (Certero[®] SC) e lambda-cialotrina (EngeoTM Pleno[®]) nas doses de 0,15 kg ha⁻¹; 0,1 L ha⁻¹; 0,15 L ha⁻¹ e 0,2 L de p. c. ha⁻¹, respectivamente.

As progênies F_{2:3} de milho foram avaliadas em três experimentos, semeados em 10/01/2013, 19/11/2013 e 17/12/2013. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies F_{2:3}, além dos genitores (L04-2 e L95-1) e da geração F₁, os quais foram utilizados como controle experimental. Os experimentos foram instalados no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Cada parcela foi representada por uma linha de 3 m de comprimento e espaçamento de 0,90 na entrelinha, com aproximadamente 15 plantas por parcela.

4.1.3 Multiplicação do Isolado e Preparo do Inóculo

A manutenção, a multiplicação do isolado e o preparo do inóculo do patógeno foram realizados no Laboratório de Genética Molecular. O isolado de *C. graminicola*, denominado ORI foi gentilmente cedido pela empresa Dow AgroSciences Ltda. (Jardinópolis, SP), na forma de discos de meio de cultura com colônias do fungo, preservados pelo método Castelani (1939).

A multiplicação inicial do patógeno foi realizada através da transferência de discos com colônias do fungo para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (10 g de farinha de aveia, 2,5 g de ágar e 250 mL de água destilada), sendo mantidas à temperatura ambiente sobre as bancadas do laboratório. As multiplicações subsequentes do fungo foram realizadas através de suspensão concentrada de esporos em placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar. As placas foram mantidas sobre bancada em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), até a esporulação completa das colônias.

Para preservar a patogenicidade do isolado reisolamentos periódicos do patógeno foram realizados. Para isso, plantas de milho cultivadas em vasos plásticos, foram inoculadas através da pulverização de uma suspensão de esporos de *C. graminicola* na superfície das folhas até o ponto de escorrimento. Imediatamente após a inoculação, os vasos contendo as plantas foram cobertos com sacos plásticos de modo a simular uma câmara úmida, onde foram mantidos por 48 horas, objetivando fornecer as condições ideais de umidade para o desenvolvimento do patógeno. Após a retirada do saco plástico as plantas foram mantidas no

laboratório, sob temperatura ambiente, até o aparecimento dos sintomas típicos da antracnose foliar.

O reisolamento do fungo foi efetuado através do método indireto de isolamento de fungos fitopatogênicos. A metodologia consistiu na deposição de quatro fragmentos de folha com sintomas da doença, previamente desinfestados, de forma equidistante, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). As placas foram vedadas com filme plástico transparente (PVC) e mantidas sob temperatura ambiente no laboratório. Após a colonização da superfície do meio de cultura, fragmentos circulares contendo micélio do fungo foram transferidos para placas com meio de cultura aveia-ágar, mantidas em bancada, até a obtenção das colônias esporuladas.

Para o preparo do inóculo, foram adicionados aproximadamente 20 mL de água destilada estéril às placas de Petri contendo as colônias esporuladas, seguida da raspagem superficial das placas, a fim de liberar os conídios. A suspensão concentrada de esporos foi filtrada com uma dupla camada de gaze para separar os esporos de restos de meio de cultura. Com o auxílio da câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para concentração de 6×10^5 e $1,0 \times 10^6$ conídios mL^{-1} para a 1ª e 2ª inoculação, respectivamente. Para cada litro da suspensão de conídios foi adicionada uma gota do espalhante adesivo Tween 80®.

4.1.4 Inoculação e Avaliação dos Experimentos

A inoculação foliar das plantas de milho nos experimentos foi efetuada entre os estádios V6 e V7, em duas épocas, sendo a segunda inoculação realizada sete dias após a primeira. As duas inoculações foram realizadas ao final da tarde e precedidas de períodos chuvosos, condições ambientais necessárias ao processo de infecção e colonização do patógeno sobre o hospedeiro.

A inoculação foi realizada através de um pulverizador costal calibrado a pressão constante de 35 lb pol^{-2} , por CO_2 comprimido, com bico cônico cheio, com pulverização de aproximadamente 7 mL da suspensão de conídios no cartucho de cada planta. A concentração final da suspensão de conídios utilizada na 1ª e 2ª inoculação está descrita no item 4.1.3. Após a 2ª inoculação foi cortada a ponta da folha mais interna do cartucho, visando identificar as folhas que de fato foram inoculadas com o patógeno para as avaliações.

As avaliações da severidade da antracnose foliar foram realizadas a partir do aparecimento dos primeiros sintomas da doença, aproximadamente aos quinze dias após a primeira inoculação. Em cada experimento foram realizadas três avaliações, a 1ª no estádio

VT (pendoamento) da cultura, 2ª no estágio R2 e a 3ª avaliação em R3 (FANCELLI, 1986). A caracterização da resistência/suscetibilidade das plantas à antracnose foliar foi através da escala de notas proposta por Silva (1983), com amplitude de notas de 1 (altamente resistente) a 6 (altamente suscetível) (Tabela 1 e Figura 1). A avaliação individual das plantas foi baseada na nota consenso de dois avaliadores, tomando-se por base cinco folhas, sendo elas a folha cortada, duas acima e duas abaixo, em todas as plantas da parcela.

Tabela 1 – Escala para o tipo de reação da planta hospedeira, com a respectiva nota e descrição das lesões correspondentes causadas por *Colletotrichum graminicola*.

Tipo de reação	Nota	Descrição
Altamente resistente	1	Presença de pontos cloróticos, “flecks”, lesões necróticas em forma de ponto de até 1 mm.
Resistente	2	Pontos necróticos e pequenas lesões clorótico/ necróticas de até 3 mm de comprimento, formato circular a oval e ausência de esporulação.
Moderadamente resistente	3	Lesões necróticas de 3 a 10 mm de comprimento por 2 a 3 mm de largura, com halo ligeiramente clorótico; lesões de formato circular à alongado; parte central da lesão de cor castanho claro e bordo da lesão de cor castanho escuro e bem definido; com pouca esporulação.
Moderadamente suscetível	4	Lesões necróticas de 10 a 40 mm de comprimento; forma circular à alongada ou irregular; parte central da lesão de cor marrom clara, com bordos marrom claro à escuro, apresentando coalescência entre lesões; com pouca esporulação.
Suscetível	5	Lesões necróticas de 40 a 60 mm, pouca clorose ao redor da lesão; formato circular à oval assim como irregular; parte central da lesão castanho escura com bordos menos definidos; apresentando esporulação do patógeno e coalescência entre lesões.
Altamente suscetível	6	Queima; confluência de lesões necróticas abrangendo de 60 a 150 mm; ausência de halo clorótico; abundante encharcamento e esporulação.

Fonte: Silva (1983).

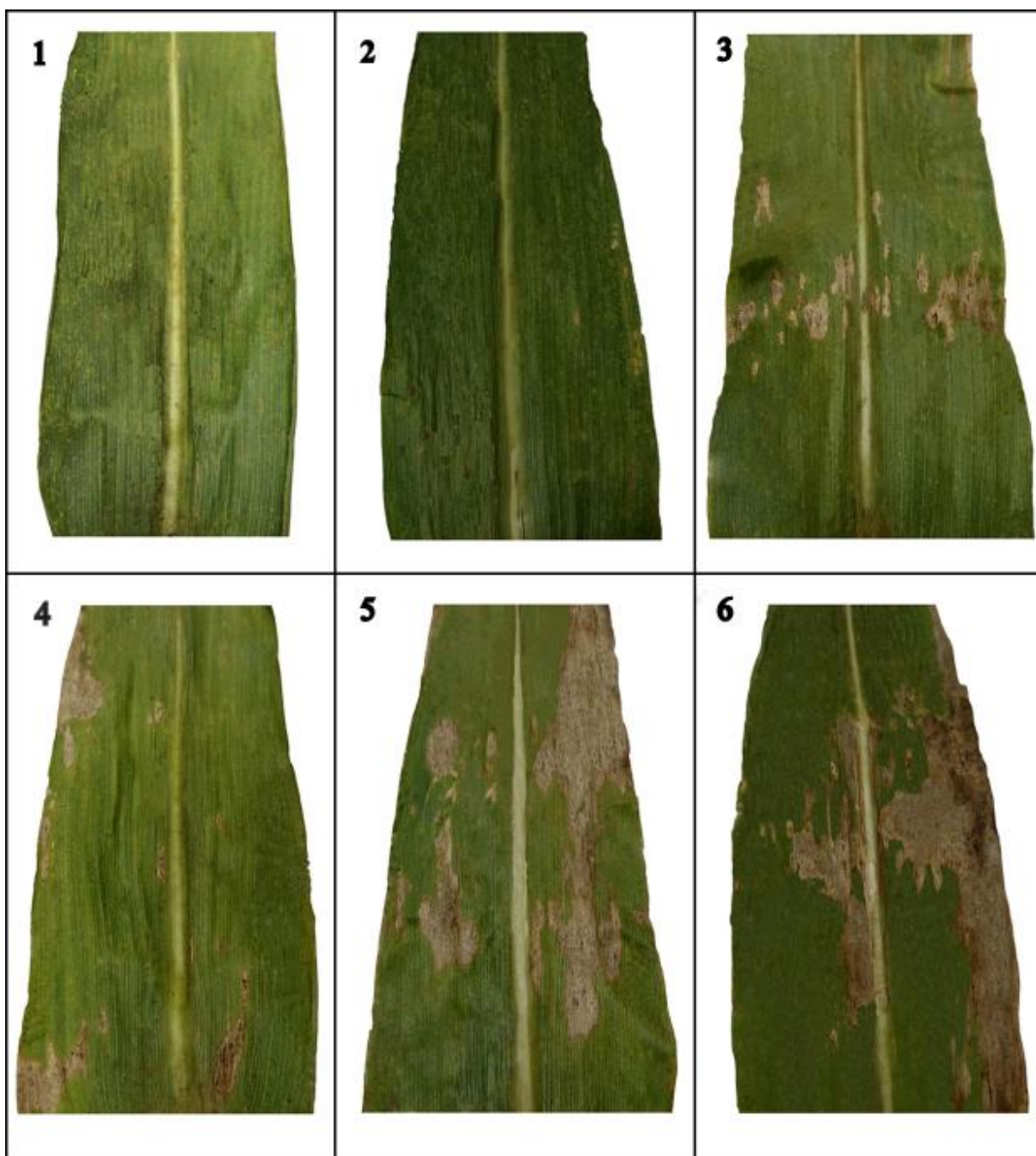


Figura 1 - Visualização da intensidade do sintoma da antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*). Representação das notas de escala (1 a 6) observadas à campo para a caracterização da resistência/suscetibilidade à antracnose foliar. Ponta Grossa – PR, 2014.

4.1.5 Análises Estatísticas e Estimativas de Parâmetros Genéticos da Resistência

Os dados médios das notas de escala das três avaliações de cada progênie $F_{2:3}$, dos respectivos experimentos, foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) dos tratamentos, através da fórmula proposta por Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

onde:

n = número de avaliações;

y_i = nota de escala na época de avaliação i ($i= 1,...,n$);

y_{i+1} = nota de escala na época de avaliação $i + 1$;

t_i = data da avaliação i ;

t_{i+1} = data da avaliação $i + 1$.

Os dados das três avaliações pontuais e os valores da AACPD das progênes foram submetidos às análises de variância por experimento, através do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999). Para realizar as análises conjuntas, inicialmente verificou-se a adequação ao critério de homogeneidade das variâncias residuais através da razão entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo; sendo inferior a sete, as variâncias residuais dos experimentos foram consideradas homogêneas (GOMES, 1990). A partir das médias fenotípicas das 121 progênes $F_{2:3}$ de milho relativas aos três experimentos de campo, procedeu-se a análise de distribuição de frequência para a 3ª avaliação (R3). Para a AACPD a determinação do número de classes fenotípicas (K) foi estimada pela fórmula $k = \sqrt{n}$, onde n refere-se ao número total de progênes ($n=121$). A amplitude fenotípica da AACPD de cada classe (AFC) foi determinada por $AFC = \frac{A}{K}$, onde A representa a amplitude da AACPD observada entre as progênes de milho.

Para as três avaliações da severidade e para a AACPD foram realizadas as estimativas dos parâmetros genéticos através da esperança matemática dos quadrados médios da análise de variância de cada experimento, de acordo com Vencovsky e Barriga (1992). A estimativa da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) foi obtida através da fórmula $\hat{\sigma}_g^2 = 1/r (QM_P - QMe)$, sendo r o número de repetições, QM_P o quadrado médio de progênes e QMe o quadrado médio do erro, obtidos através da análise de variância. A variância ambiental foi estimada por $\hat{\sigma}_e^2 = QMe$ e a estimativa da herdabilidade no sentido amplo ($\hat{h}_a^2$) foi realizada através da fórmula $\hat{h}_a^2 =$

$\frac{\hat{\sigma}_g^2}{[\hat{\sigma}_g^2 + (\hat{\sigma}_e^2/r)]}$. Além disto, foram estimados o coeficiente de variação genética $CV_g = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{Y_0} * 100$ e

o coeficiente de variação do erro experimental $CV_e = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_e^2}}{Y_0} * 100$, sendo Y_0 a média geral, e o

quociente $\hat{b}$, através da relação $\hat{b} = \frac{CV_g}{CV_e}$.

4.2 MARCADORES MOLECULARES

4.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de folhas de plantas individuais da geração F_2 , das linhagens endogâmicas (L04-2 e L95-1) e da geração F_1 (L04-2 x L95-1). A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Hoisington et al. (1994). Os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 40 μL de água ultrapura estéril e tratados com 2 μL de RNase (1,0 mg/mL) por 2 horas à 37 °C em banho-maria.

A concentração do DNA genômico foi quantificada através do espectrofotômetro Nanovue GE Healthcare[®]. Em seguida as amostras de DNA foram diluídas para concentrações de 10 ng μL^{-1} (SSRs) e 50 ng μL^{-1} (AFLPs). A integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1 %, corado com 6 μL de GelRed 0,1 X mais tampão de carregamento (0,25 de azul de bromofenol e 0,4 de sacarose), na proporção 1:1. As amostras foram submetidas à corrida eletroforética por aproximadamente 4 h a 50 V e fotodocumentados sob luz UV no aparelho AlphaImager HP, versão 3400 (Figura 2).

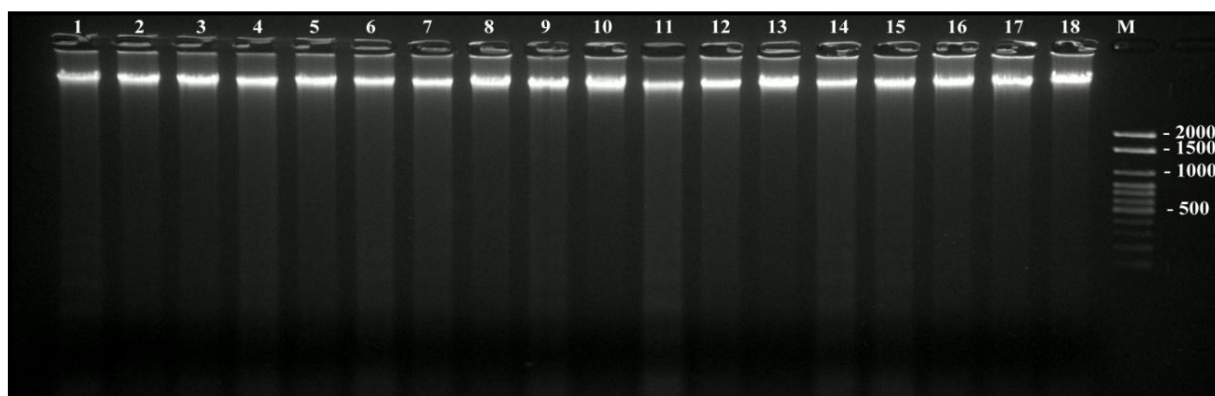


FIGURA 2 – Amostras de DNA genômico de parte dos indivíduos da população de mapeamento. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2014.

4.2.2 Genotipagem com o Marcador SSR

Inicialmente, 88 locos microssatélites (SSR), distribuídos nos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, foram amplificados nas linhagens endogâmicas (L04-2 e L95-1) a fim de selecionar locos polimórficos entre as linhagens parentais (Tabela 2). Os locos SSR foram escolhidos do *Maize Genetics and Genomics Data Base – MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org>).

TABELA 2 – Relação dos 88 locos microssatélites, localização no mapa consenso (grupo/bin), motivo repetido e programa de PCR otimizado. Ponta Grossa, 2014.

Loco SSR	Grupo/ Bin	Motivo Repetido	Programa Otimizado	Loco SSR	Grupo/ Bin	Motivo Repetido	Programa Otimizado
Bnl149	1.00	-	SSR1	Umc1348	5.05	(CA) 7	SSR1
Bnl1119	1.01	(AG) 16	SSR	Umc1792	5.08	(CGG) 5	SSR1
Bnl1007	1.02	(AG) 15	SSR	Umc1829	5.09	(AG) 10	SSR1
Phi001	1.03	AG	SSR1	p-Bnl161	6.00	-	SSR2
Umc1035	1.06	(CT) 19	SSR	p-Bnl238	6.00	-	SSR2
Bnl615	1.07	-	SSR	Phi126	6.00	AG	SSR1
Bnl131	1.11	-	SSR1	Bnl249a	6.01	-	SSR
Bnl125	2.02	-	SSR1	Phi077	6.01	AG	SSR1
Umc1884	2.05	(TC) 8	SSR	Umc1887	6.04	(CGA) 4	SSR1
p-nc003	2.06	AG	SSR1	Phi452693	6.04	(AGCC)	SSR1
Bnl1045	2.07	(AG) 17	SSR1	p-nc013	6.05	AG	SSR2
Phi101049	2.10	AGAT	SSR1	Mmc0241	6.05	-	SSR1
Umc2118	3.00	(CTTT) 4	SSR1	Umc1463	6.06	(ACA) 6	SSR
Umc1394	3.01	(AT) 10	SSR1	Bnl1292	7.01	(AG) 14	SSR1
Bnl1325	3.02	(AG) 18	SSR1	Phi034	7.02	CCT	SSR
Umc0312	3.04	(CT) 23	SSR1	Bnl434	7.03	-	SSR
Umc1025	3.04	(CT) 11	SSR1	Phi082	7.05	AG	SSR
Umc1742	3.04	(CGC) 4	SSR1	Umc1799	7.06	(TG) 12	SSR
Umc1223	3.04	(AG) 7	SSR2	Umc1592	8.01	CA	SSR
p-nc030	3.04	CT	SSR	Phi115	8.03	(AT/ATAC)	SSR1
Bnl602	3.04	-	SSR	Bnl2046	8.04	(AG) 15	SSR1
Umc1030	3.04	(CT) ₂₁	SSR1	Umc1202	8.05	(GGC) 7	SSR1
Bnl197	3.06	-	SSR	Bnl1176	8.05	(AG) 37	SSR1
Umc1659	3.07	(GA) 6	SSR2	Umc1460	8.05	(GCA) 4	SSR1
Umc1536	3.09	(CCACA) ₄	SSR1	Bnl1031	8.06	(AG) 25	SSR1
Bnl1496	3.09	(AG) ₁₈	SSR1	Bnl240	8.06	-	SSR1
Umc1136	3.10	(GCA) 5	SSR1	Umc2014	8.07	-	SSR1
Umc1759	4.01	(CGG) 4	SSR	Phi015	8.08	AAAC	SSR2
Umc2176	4.03	(TGC) 4	SSR	Phi233376	8.09	CCG	SSR1
Umc1550	4.03	(CT) 6	SSR2	Umc2084	9.01	(CTAG) 4	SSR1
Bnl490	4.04	-	SSR2	Phi065	9.03	CACTT	SSR1
Umc1511	4.05	(CGA) 4	SSR1	Phi027	9.03	GCGCT	SSR1
Bnl2291	4.06	(AG) 17	SSR1	Umc1519	9.04	(TC) 8	SSR1
Bnl1621	4.06	(AG) 18	SSR	Umc1060	9.12	(CGG) 5	SSR1
Bnl1937	4.06	(AG) 21	SSR2	Umc1318	10.01	(GTC) 5	SSR1
Bnl1784	4.07	(AG) 13	SSR1	Umc1319	10.01	(ACC) 5	SSR1
Bnl1565	4.09	(AG) 27	SSR1	Phi059	10.02	ACC	SSR1
Bnl1337	4.11	(AG) 21	SSR1	Bnl640	10.03	-	SSR1
Umc2036	5.01	(GTC) 4	SSR1	Bnl210	10.03	-	SSR1
Bnl557	5.03	-	SSR	Umc1648	10.04	(TC) ₈	SSR1
Umc1056	5.03	(AGCA) 4	SSR1	Bnl1250	10.05	(AG) 30	SSR2
Umc1935	5.03	(CA) 8	SSR	Umc2021	10.07	(TGG) 4	SSR1
Phi008	5.03	GGC	SSR	Umc1996	10.07	-	SSR
Bnl2323	5.04	(AG) 25	SSR	Umc1084	10.07	(CT) ₂₃	SSR1

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, contendo: 1X tampão InvitrogenTM; 2,0 mM MgCl₂; 0,1 mM de solução de dNTP (100 mM, Amresco[®]); 0,2 µM de cada *primer* (*forward e reverse*); 0,75 U de *Taq DNA polimerase* (5 U/µL, InvitrogenTM) e 20 ng de DNA molde para um volume final de reação de 20 µL.

Os locos SSR foram amplificados no programa de PCR denominado de SSR1 (OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000). A reação foi composta por um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos seguidos de 21 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C

por 1 minuto, anelamento variando de 65 a 55 °C por 1 minuto, com redução de 1 °C a cada dois ciclos (*touchdown*) e extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos. Na sequência, os fragmentos foram submetidos a mais 19 ciclos: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto, e extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de extensão a 72 °C por 6 minutos.

Para os locos SSR que não amplificaram ou a qualidade da amplificação não foi adequada, foi testado um segundo programa de PCR designado de SSR2 (OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000). A reação foi composta por um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos seguidos de 11 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento variando de 70 a 65 °C por 1 minuto, com redução de 1 °C a cada dois ciclos (*touchdown*) e extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos. Na sequência, os fragmentos foram submetidos a mais 29 ciclos: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 65 °C por 1 minuto, e extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de extensão a 72 °C por 6 minutos.

Os locos cuja amplificação e/ou a qualidade dos fragmentos não foram adequados tanto para o programa SSR1 quanto para o SSR2, foram testados um terceiro programa designado de SSRteste (YAO et al., 2007). O programa foi composto por um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de PCR: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e 30 segundos, extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de extensão a 72 °C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram coradas com 4 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE 1X por aproximadamente 3 h a 80 V. Em cada gel foi adicionado à extremidade esquerda uma amostra de 5 µL do marcador de peso molecular de 100 pb (NORGEN[®]), visando determinar o tamanho dos fragmentos gerados na amplificação. Os géis foram visualizados e fotodocumentados sob luz UV no aparelho AlphaImager HP, versão 3400.

As reações de amplificação dos locos SSR polimórficos entre as linhagens parentais foram realizadas em microplacas de PCR. Os 121 indivíduos da população de mapeamento foram genotipados para cada loco SSR polimórfico com a seguinte codificação: (1) fragmento amplificado correspondente ao alelo SSR oriundo da linhagem resistente L04-2, (-1) fragmento amplificado correspondente ao alelo SSR oriundo da linhagem suscetível L95-1 e (0) presença dos dois fragmentos correspondentes aos alelos oriundos das linhagens parentais L04-2 e L95-1.

4.2.3 Genotipagem com o Marcador AFLP

Para a genotipagem da população F_2 com o marcador AFLP, foram testadas 40 combinações de *primers EcoRI e MseI* (Tabela 3), visando selecionar aquelas combinações com melhor padrão de amplificação, maior frequência de polimorfismo entre as linhagens parentais e entre os *bulks* de DNA, constituídos pela mistura equitativa dos dez indivíduos mais resistentes e dez mais suscetíveis à antracnose foliar da população de mapeamento de acordo com a metodologia de análise de *bulks* segregantes (BSA) proposta por Michelmore, Paran e Kesseli (1991). Os *bulks* representativos de DNA (resistente e suscetível) foram baseados nos resultados da avaliação fenotípica para resistência/suscetibilidade das progênies $F_{2:3}$ nos três experimentos. Das 40 combinações de primers, 19 foram escolhidas para genotipar a população de mapeamento (Tabela 3).

TABELA 3 – Relação das 40 combinações de *primers EcoRI + MseI* testadas nas gerações parentais (L04-2 e L95-1) e nos bulks de DNA do BSA. Ponta Grossa, 2014.

<i>Primers EcoRI</i>			<i>Primers MseI</i>		
E – AGT	M-CAC	M-CCA *	M-CGC	M-CTC *	M-CAT *
E – ATC	M-CAC	M-CCA *	M-CGC *	M-CTC	M-CAT
E – AGC	M-CAC	M-CCA *	M-CGC	M-CTC *	M-CAT *
E – ACA	M-CAC	M-CCA	M-CGC *	M-CTC *	M-CAT *
	M-CCG	M-CCT	M-CTA	M-CCC	
E – AAC	M-CAC *	M-CCA *	M-CGC	M-CTC *	M-CAT *
	M-CCG *	M-CCT	M-CTA *	M-CCC *	M-CAA
	M-CTT	M-CGG	M-CGA	M-CAG *	M-CTG
	M-CGT				

* Combinações de *primers* utilizados na genotipagem da população de mapeamento

A amplificação de marcadores AFLP foi realizada de acordo com Vos et al. (1995). A metodologia para o AFLP foi composta de quatro etapas: 1º) A dupla digestão enzimática do DNA genômico com as enzimas de restrição *EcoRI + MseI* para um volume final de 50 µL [1X Albumina de Soro Bovino (BSA), 1X tampão “One Phor All” (OPA), 5,04 U da *EcoRI* (12 U/µL, Promega); 5 U da *MseI* (10.000 U/mL, New England Biolabs®) e 200 ng de DNA genômico]. A digestão foi realizada em termociclador por 3 horas a 37 °C com suaves inversões a cada hora, seguido por um passo final de 70 °C por 15 minutos para inativação das enzimas. 2º) A ligação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* aos fragmentos de DNA oriundos da digestão. A reação de ligação foi realizada para um volume final de 10 µL composta de: 5 pmol do adaptador *EcoRI*, 50 pmol do adaptador *MseI*, 1X tampão T₄ DNA ligase e 1,5 U da enzima T₄ DNA ligase (400.000 U/mL, New England Biolabs®). A reação de ligação dos

adaptadores *EcoRI* e *MseI* foi realizada a 23 °C por 3 horas em termociclador, com suaves inversões a cada hora. 3º) A pré-amplificação dos fragmentos com *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na posição 3'. A reação foi realizada para um volume final de 20 µL, sendo composta por 1X tampão InvitrogenTM, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM de solução de dNTP (100 mM, Amresco[®]), 25 ng de *primer EcoRI+A* e *MseI+C*, 3 U de *Taq DNA polimerase* (5 U/µL, InvitrogenTM) e 2 µL do DNA ligado.

O programa de PCR para a etapa de pré-amplificação foi composto por desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 26 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto, extensão dos fragmentos a 72 °C por 1 minuto e um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Após a pré-amplificação foram acrescentadas em cada amostra 80 µL de água ultra-pura estéril, seguido da estocagem a -20 °C.

A quarta etapa denominada de amplificação seletiva foi realizada através da combinação de *primer EcoRI* e *MseI* com 3 bases seletivas na posição 3' (Tabela 3). As reações de amplificação seletiva foram preparadas para um volume final de 20 µL contendo: 1X tampão InvitrogenTM, 50 mM MgCl₂, 0,4 mM de solução dNTP (100 mM, Amresco[®]), 25 ng do *primer EcoRI+3*, 25 ng do *primer MseI+3*, 1 U de *Taq DNA polimerase* (5 U/µL, InvitrogenTM) e 1,5 µL do DNA pré-amplificado.

A reação de amplificação seletiva foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguidos de 12 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Na sequência, os fragmentos foram submetidos a 23 ciclos de PCR a 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de 2 minutos a 72 °C.

Os produtos da reação de amplificação seletiva foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (6 %). Para cada gel foram utilizados 120 mL da matriz de poliacrilamida (6 % acrilamida/bisacrilamida; 7,5 M de uréia e 1X tampão TBE), 120 µL de TEMED (N, N, N', N' – Tetramethyl – ethylenediamine) e 800 µL de persulfato de amônio 10 %. O gel de poliacrilamida foi submetido a uma pré-corrida eletroforética em cuba vertical modelo Sequi-Gen GT da BIORAD[®] por 1 hora a 80 W (±1500 V) com o objetivo de organizar a matriz eletroforética bem como elevar a temperatura do gel.

As amostras foram preparadas para a corrida eletroforética adicionando-se 8 µL de tampão formamida 2X [formamida 98 %; 10 mM EDTA pH 8,0; azul de bromofenol 0,002 % (p/v) e xileno cianol 0,002 % (p/v)] seguidas de desnaturação a 95°C por 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X a 80 W de potência por 3 horas. Para determinar o tamanho dos fragmentos foi adicionado à extremidade do gel 14 µL do marcador

de 50pb (NORGEN[®]). Os géis foram corados através da impregnação pelo íon prata segundo o protocolo de Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001).

Os fragmentos polimórficos amplificados para cada combinação de *primers EcoRI + MseI* na população de mapeamento foram genotipados na presença (1) ou ausência (0). A denominação de cada loco polimórfico seguiu a descrição de Castiglioni et al. (1999). Por exemplo, o loco E35279, corresponde ao fragmento AFLP amplificado pela combinação de *primers EcoRI-3/MseI-5*, com tamanho aproximado de 279 pb.

4.2.4 Regressão Linear Múltipla

Os locos microssatélites e AFLPs genotipados na população de mapeamento, foram submetidos à análise de regressão linear múltipla (EDWARDS; STRUBER; WENDEL, 1987). As médias de notas da 1ª (VT), 2ª (R2) e 3ª (R3) avaliação e da AACPD das progênes dos três experimentos foram consideradas como variáveis dependentes e os genótipos em locos marcadores como variáveis independentes. Este processo permitiu selecionar apenas as marcas moleculares significativamente ($P < 0,05$) associadas com resistência à antracnose foliar nos experimentos.

Para a análise de regressão linear múltipla, foram construídos modelos com os marcadores moleculares que permaneceram na análise pelo processo “stepwise” de seleção de variáveis regressoras (DRAPER; SMITH, 1981). Neste procedimento utilizou-se um nível de significância de 5 % para entrada e saída das marcas do modelo.

4.2.5 Teste de Distorção da Segregação Mendeliana dos Marcadores

Para determinar se os locos SSRs e AFLPs polimórficos apresentavam padrão de segregação Mendeliana, foi realizado o teste de aderência de qui-quadrado (χ^2). Para n testes independentes, a probabilidade de erro tipo I é dado por:

$$\alpha = 1 - (1 - \alpha_T)^n.$$

Assim, em cada teste deve-se tomar, para um dado α :

$$\alpha_T = 1 - (1 - \alpha)^{1/n} \cong \alpha/n \text{ (Correção de Bonferroni).}$$

Neste trabalho, utilizou-se um $\alpha = 5\%$ com $n = 414$ marcadores, portanto, realizou-se o teste de qui-quadrado com $\alpha_T = 0,012\%$.

Para o microssatélite, testou-se a hipótese de que os alelos do loco marcador apresentavam segregação esperada de 1:2:1 (expressão codominante). Para o AFLP, testou-se a hipótese de segregação na proporção 3:1 (expressão dominante).

4.2.6 Construção do Mapa de Ligação

Os locos microssatélites e AFLPs que apresentaram segregação mendeliana esperada (não distorcidos) foram utilizados para a construção do mapa de ligação com o auxílio do programa MAPMAKER versão 3.0 (LANDER et al., 1987). A construção dos grupos de ligação baseou-se no comando “group” utilizando um “LOD score” (LOD) de 3,0 (método da máxima verossimilhança), frequência máxima de recombinação $\theta = 0,40$. As frequências máximas de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa utilizando a função de mapeamento de Haldane (1919). Após a obtenção dos grupos de ligação, os marcadores dentro do grupo foram ordenados pelo comando “order” com um LOD maior que 3,0. Para garantir a correta ordenação dentro do grupo, foi utilizado o comando “ripple”. A presença dos locos SSR nos grupos de ligação possibilitou a identificação dos cromossomos de acordo com o mapa consenso de milho.

4.2.7 Localização dos QRLs através do Mapeamento por Intervalo Composto

As análises de mapeamento dos QRLs foram realizadas utilizando as médias das notas da severidade da doença das três avaliações e da AACPD das 121 progênies $F_{2:3}$ de milho. A identificação dos QRLs foi através do mapeamento por intervalo composto (MIC) pelo programa *QTLCartographer*[®] (BASTEN; WEIR; ZENG, 2000). Para o posicionamento dos QRLs a análise MIC utilizou o mapa de ligação dos marcadores moleculares gerado no programa MAPMAKER versão 3.0.

A estimativa da posição, efeito genético e porcentagem da variação fenotípica (coeficiente de correlação parcial, R^2) dos QRLs foi estabelecida nos picos de $LOD > 2,5$, nível de significância utilizado pelo programa *QTLCartographer*[®].

5 RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE FOLIAR EM PROGÊNIES DE MILHO

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram caracterizar a resistência/suscetibilidade de progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*) e estimar os parâmetros genéticos associados à resistência. As linhagens endogâmicas L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível) foram cruzadas entre si a fim de gerar uma população F_2 . Os indivíduos desta população foram autofecundados dando origem as progênies $F_{2:3}$ que foram avaliadas em três experimentos, conduzidos no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Os tratamentos consistiram de 121 progênies $F_{2:3}$, linhagens parentais e geração F_1 . As plantas foram inoculadas por duas vezes entre os estádios V6 e V7, sendo a 2ª inoculação realizada sete dias após a 1ª. Foram realizadas três avaliações da severidade da antracnose foliar: a 1ª no estádio VT (pendoamento), a 2ª em R2 e a 3ª em R3 através de uma escala de notas com amplitude de 1 a 6. A partir das avaliações pontuais, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). As médias das avaliações pontuais e da AACPD foram utilizadas para as análises estatísticas e estimação dos parâmetros genéticos. A inoculação foliar das plantas de milho com *C. graminicola* permitiu confirmar através das três avaliações pontuais e da AACPD a elevada patogenicidade do isolado, pois conferiu na linhagem suscetível L95-1 maior severidade da doença independente do experimento. O 1º experimento (safrinha) demonstrou maior severidade da antracnose foliar, independente da forma de avaliação, possivelmente pelos maiores índices de pluviosidade e de umidade relativa durante o desenvolvimento da doença. A geração F_1 sempre evidenciou posição intermediária em severidade entre as linhagens parentais, independente do período e da forma de avaliação da doença. A análise de distribuição de frequências demonstrou maior número de progênies de milho nas classes mais resistentes tanto na avaliações pontuais quanto na AACPD dos três experimentos. As elevadas magnitudes da variância genética, herdabilidade no sentido amplo e quociente $\hat{b}$, confirmam o potencial genético da fonte L04-2 em transmitir os genes de resistência à antracnose foliar. A baixa magnitude dos efeitos ambientais na expressão fenotípica da resistência à *C. graminicola*, evidenciam a possibilidade de ganhos genéticos com a seleção neste patossistema.

Palavras-chave: Herdabilidade. Variância genética. *C. graminicola*.

ABSTRACT

The objectives of work were to characterize the resistance/susceptibility of the $F_{2:3}$ maize progenies to anthracnose leaf blight (*Colletotrichum graminicola*), estimate the genetic parameters associated with resistance. The inbred lines L04-2 (resistant) and L95-1 (susceptible) were crossed to generate an F_2 population. Individuals of this population were selfed resulting $F_{2:3}$ progenies, these were evaluated in three trials conducted in a randomized block design, with three replications. The treatments consisted of 121 $F_{2:3}$, parental inbred lines and F_1 generation. Plants were inoculated in two times between the stages V6 and V7, the second inoculation made seven days after the first. Three evaluation of the severity of anthracnose leaf blight were conducted: the 1st in VT (flowering) stage, 2nd in R2 and 3rd in R3 through a note scale with amplitude from 1 to 6. From the point assessments, was calculated the area under the disease progress curve (AUDPC). The averages of point assessments and AUDPC were used for statistical analysis and estimation of genetic parameters. Foliar inoculation of maize plants with *C. graminicola* could confirm through three point assessments and AUDPC the high pathogenicity of the isolate, as given in the susceptible inbred line L95-1 greater severity of disease independent of the experiment. The 1st experiment (second crop) showed greater severity of anthracnose leaf blight, independent of the form of assessment, possibly by higher rates of rainfall and relative humidity during the development of the disease. The F_1 generation always showed intermediate position in severity between the parental inbred lines, independent of the period and the form of disease assessment. The frequency distribution analysis showed a greater number of progeny of maize resistant classes in more specific assessments of both the AACPD in the three experiments. The high magnitude of genetic variance, heritability in the broad sense and $\hat{b}$ quotient, confirming the genetic potential source L04-2 in transmitting resistance genes to anthracnose leaf blight. The low magnitude of environmental effects on phenotypic expression of resistance to *C. graminicola*, demonstrate the possibility of genetic gain for selection in this pathosystem.

Keywords: Heritability. Genetic variance. *C. graminicola*.

INTRODUÇÃO

A antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils é uma doença de grande importância para a cultura do milho (COELHO et al., 2001; HOOKER, 1976; WHITE, YANNEY, NATTI, 1979). No Brasil a doença está presente nas principais regiões produtoras de milho (COTA et al., 2012; COSTA et al., 2014; CRUZ et al., 1996; FERNANDES; BALMER, 1990) e de outras regiões agrícolas do mundo (LEONARD, 1974; PERKINS; HOOKER, 1979; PUPIPAT; MEHTA, 1969; WARREN et al., 1973). Embora o patógeno possa infectar qualquer parte da planta, as lesões foliares e as podridões de colmo são as formas mais comuns da doença (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; DALE, 1963; LIM; WHITE, 1978; ZUBER et al., 1981).

A antracnose foliar caracteriza-se por lesões escuras e necróticas, de forma arredondada a ovalada, podendo fundir-se e ocasionar danos extensos, resultando na senescência prematura das folhas (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). Esta doença é mais evidente no estágio de plântulas e de plantas adultas, após o florescimento (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b). Nos Estados Unidos os danos causados pela antracnose foliar foram estimados em 19 e 28 % para híbridos e linhagens, respectivamente (SMITH, 1976). O incremento mundial na incidência da antracnose foliar tem sido relacionado com a expansão da área cultivada, a ampliação das épocas de semeadura, e a adoção do plantio direto sem rotação de culturas (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; COTA et al., 2012; COSTA et al., 2014; JIRAK-PERTERSON; ESKER, 2011).

O uso da resistência genética como forma de controle da antracnose é considerado o meio mais eficiente e econômico (COELHO et al., 2001). Estudos indicam que a resistência genética do milho à antracnose foliar é controlada por poucos genes com ação gênica aditiva e de dominância, com predomínio dos efeitos genéticos aditivos (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; CARSON; HOOKER, 1981a; LIM; WHITE, 1978; PROCHNO, 2013; SILVA, 1983). Badu-Apraku, Gracen e Bergstrom (1987b) identificaram dois genes codominantes na fase de plântula e de planta adulta para resistência à antracnose foliar. Relato da presença de um gene com grande efeito para resistência também foi descrito por Badu-Apraku, Gracen e Bergstrom (1987a). No Brasil Coelho et al. (2001) propuseram herança monogênica com dominância completa para o alelo de resistência. Rezende et al. (2004) analisando a resistência de milho tropical à antracnose foliar a partir de modelos genéticos

mistos, relataram a presença de um gene de efeito maior com ação gênica de dominância, e de poligenes com ação aditiva e de dominância

Os objetivos do trabalho foram caracterizar a resistência/suscetibilidade de um conjunto de progênies $F_{2:3}$ de milho tropical inoculadas com *C. graminicola* e estimar os parâmetros genéticos associados com a resistência à antracnose foliar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As linhagens endogâmicas L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível) previamente caracterizadas por Prochno (2013) foram cruzadas entre si a fim de obter uma população segregante da geração F_2 . Os indivíduos desta população foram autofecundados, dando origem as progênies $F_{2:3}$, as quais foram avaliadas para resistência à antracnose foliar.

Experimentos de Campo

As progênies de milho foram implantadas em três experimentos, semeados em 10/01/2013, 19/11/2013 e 17/12/2013. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, genitores (L04-2 e L95-1) e geração F_1 , sendo os últimos utilizados como controle experimental. Os experimentos foram instalados no delineamento de blocos casualizados com três repetições. A parcela foi constituída por uma linha de 3 m de comprimento e 0,90 na entrelinha, com aproximadamente 15 plantas por parcela. As inoculações do patógeno foram realizadas por duas vezes entre os estádios V6 e V7, através da pulverização de 7 mL da suspensão de conídios ($6,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ conídios mL^{-1}) no cartucho das plantas, através de pulverizador costal calibrado a pressão constante de 35 lb pol^{-2} , por CO_2 comprimido.

O isolado de *C. graminicola* foi cedido pela empresa Dow AgroSciences Ltda. (Jardinópolis, SP). O patógeno foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar, as quais foram mantidas na bancada do laboratório com temperatura de $21 \pm 4^\circ \text{C}$, até a esporulação completa das colônias. O inóculo foi preparado através da adição de ± 20 mL de água destilada estéril às placas com as colônias esporuladas, seguida da raspagem superficial para liberação dos conídios. A suspensão concentrada de esporos foi filtrada com uma dupla camada de gaze e ajustada para concentração final de $6,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ conídios mL^{-1} na 1ª e 2ª inoculação das progênies.

As avaliações da severidade da antracnose foliar foram realizadas a partir do aparecimento dos primeiros sintomas da doença, aproximadamente aos quinze dias após a 1ª inoculação. Foram realizadas três avaliações da severidade, sendo a 1ª no estágio VT (pendoamento), a 2ª em R2 e a 3ª em R3 (FANCELLI, 1986). A caracterização da resistência/suscetibilidade das progênies de milho à antracnose foliar foi através da escala de

notas proposta por Silva (1983), com amplitude de 1 (altamente resistente) à 6 (altamente suscetível).

Análises Estatísticas e Estimativas dos Parâmetros Genéticos

As médias das notas de escala das três avaliações das progênes de milho, nos experimentos, foram utilizados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), através da fórmula proposta por Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

onde n é o número de avaliações, y é a severidade da doença no tempo t .

As três avaliações pontuais e os dados da AACPD foram submetidos à análise de variância individual e conjunta dos experimentos através do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999). Procedeu-se a análise de distribuição de frequência das progênes de milho para a 3ª avaliação. As classes fenotípicas foram baseadas na escala de notas da avaliação (1 a 6). Para a AACPD o número de classes fenotípicas (K) foi estimada pela fórmula $k = \sqrt{n}$, onde n refere-se ao total de progênes ($n=121$). A amplitude fenotípica de cada classe (AFC) foi determinada por $AFC = \frac{A}{K}$, onde A representa a amplitude da AACPD encontrada entre as progênes de milho.

Os parâmetros genéticos foram estimados para as três avaliações e para a AACPD através da esperança matemática dos quadrados médios da análise de variância de cada experimento (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992). A estimativa da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) foi obtida por $\hat{\sigma}_g^2 = 1/r (QM_P - QMe)$, sendo r o número de repetições, QM_P o quadrado médio de progênes e QMe o quadrado médio do erro da análise de variância. A variância ambiental foi estimada por $\hat{\sigma}_e^2 = QMe$ e a herdabilidade no sentido amplo ($\hat{h}_a^2$) por $\hat{h}_a^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{[\hat{\sigma}_g^2 + (\hat{\sigma}_e^2/r)]}$.

Adicionalmente, foram estimados o coeficiente de variação genética $CV_g = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{Y_0} * 100$, o

coeficiente de variação do erro experimental $CV_e = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_e^2}}{Y_0} * 100$ (Y_0 = média geral) e o

quociente $\hat{b} = \frac{CV_g}{CV_e}$.

RESULTADOS

Os resultados demonstraram que a maioria das progênes $F_{2:3}$ de milho do cruzamento L04-2 x L95-1 foram resistentes a infecção foliar por *C. graminicola*. As três avaliações pontuais da severidade da doença (escala de notas) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram eficientes para discriminar as progênes de milho e as gerações parentais em relação à resistência ou suscetibilidade à antracnose foliar.

As análises de variância individuais para as três avaliações pontuais e para a AACPD atenderam ao critério de homogeneidade de variâncias residuais, possibilitando a análise conjunta dos experimentos. Os resultados da análise conjunta demonstraram interação significativa ($Pr < 0,01$) para tratamentos x experimentos para as três avaliações pontuais e para a AACPD. Desta forma, optou-se por apresentar os resultados para cada experimento.

As análises de variância dos experimentos evidenciaram diferenças altamente significativas ($Pr < 0,01$) entre os tratamentos (progênes $F_{2:3}$, linhagens parentais e geração F_1) para os três períodos de avaliação e para a AACPD. Os genótipos de milho apresentaram maior severidade no 1º experimento, independente da forma de avaliação (avaliações pontuais ou AACPD). Os coeficientes de variação experimental oscilaram de 6,76 (1º experimento) a 20,87 % (2º experimento) (Tabela 4).

A linhagem endogâmica L04-2, fonte de resistência, demonstrou notas de severidade nos três experimentos variando de 1,00 a 1,43 na 1ª avaliação, de 1,05 a 1,57 na 2ª e de 1,13 a 1,95 na 3ª avaliação, bem como a menor AACPD entre os tratamentos testemunhas (L95-1 e geração F_1), com amplitude de 33 a 51,2. Por outro lado, a linhagem suscetível L95-1, evidenciou amplitude de notas de escala 1,57 a 2,27 para a 1ª avaliação, de 2,17 a 3,25 para a 2ª e de 3,17 a 4,02 para a 3ª avaliação da doença. De maneira geral, a geração F_1 esteve ranqueada entre as linhagens parentais do cruzamento, tanto nas avaliações pontuais da doença quanto na AACPD (Tabela 4).

Os resultados da distribuição de frequências das progênes $F_{2:3}$ de milho para a 3ª avaliação da antracnose foliar, nos três experimentos podem ser visualizados na Figura 3. A análise confirmou o contraste fenotípico para a resistência à antracnose foliar entre as linhagens parentais L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível) a partir da inoculação do patógeno, independente do experimento. A linhagem resistente L04-2 permaneceu na classe fenotípica de menor escala (1) nos três experimentos. Por outro lado, a linhagem suscetível L95-1, ranqueou na classe fenotípica 4 (1º experimento) e 3 (2º e 3º experimentos). A geração F_1 se posicionou na classe 3 no 1º experimento e na 2 no 2º e 3º experimentos (Figura 3 A, B e C).

No primeiro experimento, 92 (76 %) das progênies de milho agruparam-se com nota de escala relativa a segunda classe e 26 (21,5 %) na terceira classe (Figura 3 A). Por outro lado, no segundo e terceiro experimentos, houve um incremento considerável no número de progênies $F_{2:3}$ na classe de maior resistência (1) com 35 e 34 progênies, respectivamente (Figura 3 B e C). Da mesma forma, a distribuição de frequência da AACPD permitiu confirmar o contraste em resistência entre as linhagens L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível). A L04-2 permaneceu na classe de menor AACPD, evidenciando a menor taxa de progresso da doença, com amplitude de 33,0 a 51,2 (Tabela 3 e Figura 4). Semelhante aos resultados obtidos na 3ª avaliação pontual, a L95-1 manteve-se nas classes fenotípicas de maior AACPD, com área variando de 66,1 a 91,5. Da mesma forma, a geração F_1 ranqueou nas classes de AACPD intermediárias às linhagens parentais (Figura 4 A e C).

A distribuição de frequência para a AACPD permitiu observar um padrão assimétrico entre as classes fenotípicas, evidenciando uma tendência das progênies $F_{2:3}$ para a maior resistência à antracnose foliar nos três experimentos, com maior número entre a 2ª e a 4ª classe da AACPD (Figura 4 A, B e C). Nos três experimentos foram encontradas progênies de milho altamente resistentes à antracnose como a própria fonte de resistência L04-2 (Figura 4).

A decomposição dos componentes da variância fenotípica indicaram predomínio da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) em relação à variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), para as três avaliações pontuais e para a AACPD nos três experimentos (Tabela 5). Os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo ($\hat{h}_a^2$) foram de grande magnitude independente do período de avaliação e da forma de quantificação da doença (AACPD). No 1º experimento, os coeficientes de herdabilidade variaram de 92 (3ª avaliação) a 95 % (AACPD); no 2º de 76 (1ª avaliação) a 84 % (AACPD) e no 3º, coeficientes superiores a 82 % (Tabela 5). Os valores do quociente $\hat{b}$ sempre foram superiores a 1,0 em todas as estimativas, independente do experimento, do período de avaliação e da AACPD. No 1º experimento, as estimativas de $\hat{b}$ variaram de 1,95 (3ª avaliação) à 2,45 (AACPD), no 2º de 1,02 (1ª avaliação) à 1,32 (AACPD) e no 3º experimento de 1,22 (2ª avaliação) à 1,43 (AACPD) (Tabela 5).

DISCUSSÃO

A escolha das linhagens parentais (L04-2 e L95-1) que originaram as progênies $F_{2:3}$ foi baseada na caracterização da resistência/suscetibilidade de um conjunto de linhagens endogâmicas e de diferentes populações segregantes de milho tropical à antracnose foliar realizada por Prochno (2013).

A quantificação da severidade da antracnose foliar em milho foi baseada na escala de notas proposta por Silva (1983) e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A melhor maneira de representar a epidemia de uma doença é através da curva de progresso da doença, sendo expressa pela plotagem da doença no tempo, caracterizando assim as interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente (BERGAMIN FILHO, 2011). Dessa forma, a estimativa da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) tornou-se um procedimento comum e eficiente na caracterização da resistência em diferentes patossistemas do milho (BRITO et al., 2008; LANZA, 2009; VIEIRA et al., 2009).

A escala de notas baseia-se na reação do hospedeiro a infecção pela antracnose foliar através do tipo e do tamanho das lesões. Esta forma de quantificação da severidade tem se mostrado eficiente na resistência de milho à antracnose foliar (PROCHNO, 2013; REZENDE et al. 2004; SILVA, 1983). Neste trabalho, optou-se por analisar os dados de três avaliações pontuais da severidade da doença. Na 1ª avaliação, representando a resistência/suscetibilidade dos tratamentos na fase de plântula; na 2ª, a fim de evidenciar possíveis diferenças entre os genótipos durante o desenvolvimento da epidemia; na 3ª avaliação, para confirmar diferenças de resistência/suscetibilidade no estágio de planta adulta; e, por fim, a AACPD, por ser considerada uma estimativa que melhor representa as reações dos genótipos durante o período de desenvolvimento da doença.

A inoculação foliar das plantas de milho com *C. graminicola* permitiu confirmar através das três avaliações pontuais e da AACPD que o isolado do patógeno apresentava-se patogênico, pois conferiu na linhagem suscetível (L95-1) as maiores notas de severidade e de AACPD independente do experimento. A elevada severidade tanto nas avaliações pontuais quanto na AACPD do 1º experimento (safrinha) ocorreram possivelmente pelos maiores índices de precipitação e de umidade relativa ocorrida na safra agrícola de 2012/13 (Anexo 1). A literatura indica que a água exerce papel fundamental na germinação dos conídios, sendo indispensável para a colonização/desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Adicionalmente, observou-se um incremento na severidade da doença nos genótipos suscetíveis no decorrer das avaliações dos três experimentos, possibilitando confirmar o

contraste fenotípico para a resistência entre as linhagens parentais L04-2 e L95-1 do cruzamento em estudo.

A L04-2 evidenciou alto padrão de resistência à *C. graminicola* nos três experimentos, uma vez que a maior nota de escala não ultrapassou 1,95 nos três períodos de avaliação. Este resultado está de acordo com Prochno (2013), onde as linhagens resistentes L04-2 e L23-1, evidenciaram notas de escala de no máximo 2,2 e 2,3, respectivamente. Coêlho et al. (2001) e Rezende et al. (2004) estudando o controle genético da antracnose foliar em milho, relataram a ausência de sintomas da doença nas linhagens resistentes (L64, DAS4 e DAS3). Neste trabalho, a linhagem suscetível L95-1, demonstrou na 3ª avaliação, notas de escala variando de 3,17 (2º experimento) à 4,02 (1º experimento). No mesmo ambiente, mas em safras agrícolas diferentes Prochno (2013) demonstrou para a L95-1 notas de severidade variando de 2,67 à 4,91. Particularmente, o ambiente de avaliação da antracnose foliar deve ser considerado, pois nos trabalhos de Morello (2000), Rezende et al. (2004) e Silva (1983), as linhagens suscetíveis demonstraram em média severidade da doença mais elevada, com nota de escala superior a 4,4. Esta divergência em severidade para as linhagens suscetíveis possivelmente sejam em função das diferenças climáticas existentes entre os ambientes de avaliação (Jardinópolis/Cravinhos/Jacarezinho - SP e Ponta Grossa - PR). De maneira geral, o ambiente São Paulo caracteriza-se pela maior temperatura e umidade relativa, sendo naturalmente mais favorável ao desenvolvimento do patógeno, resultando em maior severidade da antracnose foliar nos genótipos suscetíveis.

Nos três experimentos a geração F_1 evidenciou posição intermediária em severidade entre as linhagens parentais do cruzamento, independente do período e da forma de avaliação da doença. Estes resultados foram muito similares aos obtidos por Prochno (2013) na sexta avaliação da severidade da antracnose foliar. A autora relatou desempenho intermediário da F_1 em relação às linhagens parentais das famílias estudadas. Padrão fenotípico intermediário da F_1 em relação às linhagens parentais é um indicativo da ação gênica aditiva no controle genético do caráter (RAMALHO et al., 2012). Rezende et al. (2004) ao estudarem a herança da resistência de milho à antracnose foliar relataram que as médias de quatro famílias (F_2), tenderam para o genitor resistente, evidenciando predomínio da ação gênica de dominância para a resistência. Por outro lado, Prochno (2013) encontrou padrão fenotípico intermediário de seis famílias (F_2) em relação às linhagens parentais bem como tendência de distribuição simétrica dos indivíduos entre as classes da escala, confirmando o predomínio da ação gênica aditiva no controle genético da resistência das famílias segregantes à antracnose foliar.

Parâmetros genéticos estimados através dos componentes da variância fenotípica permitem ao melhorista conhecer a base genética do germoplasma bem como prever os ganhos genéticos com a seleção artificial para características de interesse (VENCOVSKY, 1987). As estimativas dos parâmetros genéticos confirmaram a existência de variabilidade genética neste conjunto de 121 progênies $F_{2:3}$ para resistência/suscetibilidade à antracnose foliar. A maior contribuição do componente genético para a variação fenotípica das três avaliações e da AACPD, possivelmente esteja associado ao fato das progênies terem sido obtidas do cruzamento entre linhagens endogâmicas contrastantes para resistência à antracnose foliar. Os elevados coeficientes de herdabilidade confirmam a baixa participação do ambiente na expressão fenotípica da resistência, facilitando o processo de seleção artificial pela ampla variabilidade genética disponível. Adicionalmente, permitem pressupor a existência de poucos genes no controle da resistência de milho à antracnose foliar. Os coeficientes de herdabilidade estimados para esta população foram bastante similares a outros trabalhos relacionados à herança da resistência à antracnose foliar com índices variando de 80,9 à 98,2 % (CARSON; HOOKER, 1981a; PROCHNO, 2013; REZENDE et al., 2004; SILVA, 1983).

O quociente $\hat{b}$ é um parâmetro genético importante para os programas de melhoramento, pois quantifica a proporção da variabilidade genética dentro das populações, através da relação entre o coeficiente de variação genético CV_g e o coeficiente de variação ambiental CV_e . Neste trabalho, os quocientes $\hat{b}$ evidenciaram a maior contribuição da variância genética em relação à variância ambiental, uma vez que, para todas as estimativas o quociente $\hat{b}$ foi maior que 1,0. Para Vencovsky e Barriga (1992), $\hat{b} > 1,0$ indica situação bastante favorável para a seleção artificial em progênies de milho. Este parâmetro genético tem sido utilizado com sucesso em muitos programas de melhoramento, como o de soja (SILVEIRA; MAURO; CENTURION, 2006), de feijão-caupi (CORREA et al., 2012), de plantas medicinais (ARAUJO, 2010; MARIOT et al., 2009) e de espécies florestais (TAMBARUSSI et al., 2010).

As elevadas estimativas dos parâmetros genéticos reforçam o potencial genético da L04-2 para a transferência dos genes de resistência à antracnose foliar neste patossistema. Todos os parâmetros estimados tanto nas avaliações pontuais quanto na AACPD dos três experimentos confirmam que o controle genético da resistência das progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose foliar possivelmente esteja associado a um pequeno número de genes com grande efeito para a expressão fenotípica da resistência. Predomínio de ação gênica aditiva e controle

oligogênico da resistência à antracnose foliar foram relatados em estudos anteriores (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; CARSON; HOOKER, 1981a; LIM; WHITE, 1978; PROCHNO, 2013; SILVA, 1983). Dessa forma, pode-se inferir que os ganhos genéticos esperados com a seleção artificial de progênies de milho resistentes à *C. graminicola* poderão ser facilmente alcançados nesta população segregante.

TABELA 4 – Resumo da análise de variância do primeiro, segundo e terceiro experimento para as três avaliações da severidade da doença e para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Ponta Grossa, 2014.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio – QM											
		1° Experimento				2° Experimento				3° Experimento			
		Avaliação			AACPD	Avaliação			AACPD	Avaliação			AACPD
		1 ^a	2 ^a	3 ^a		1 ^a	2 ^a	3 ^a		1 ^a	2 ^a	3 ^a	
Blocos	2	0,14**	0,52**	2,90**	395,75**	0,44**	2,24**	7,74**	178,92	1,77**	0,25	2,67**	86,74
Tratamentos	123	0,27**	0,51**	0,62**	387,38**	0,29**	0,55**	0,66**	401,49**	0,38**	0,55**	0,73**	439,56**
Resíduo	246	0,02	0,03	0,05	20,42	0,07	0,12	0,11	64,21	0,06	0,10	0,11	61,77
CV %		8,48	7,94	8,02	6,76	20,78	20,87	14,27	15,88	17,42	17,77	15,29	14,76
Média Geral		1,78	2,28	2,83	66,87	1,29	1,67	2,28	50,45	1,48	1,80	2,21	53,23
Média Progênies		1,78	2,28	2,83	66,77	1,29	1,67	2,28	50,33	1,47	1,81	2,22	53,14
L04-2 (R)		1,43	1,57	1,95	51,20	1,00	1,05	1,45	33,00	1,03	1,08	1,13	33,70
L95-1 (S)		2,27	3,25	4,02	91,57	1,57	2,17	3,17	66,13	2,26	2,71	3,40	80,72
F ₁ (L04-2 x L95-1)		1,94	2,59	3,0	73,63	1,77	2,28	2,87	67,01	1,60	2,02	2,35	58,09

** significativo a 1% de probabilidade, (R) resistente, (S) suscetível.

TABELA 5 – Estimativa dos parâmetros genéticos associados à resistência à antracnose foliar, a partir da 1ª, 2ª e 3ª avaliação da severidade da doença e para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em progênies F_{2:3} de milho. Ponta Grossa, 2014.

Parâmetros	1º Experimento			
	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	AACPD
$\hat{\sigma}_g^2$	0,08	0,16	0,19	122,32
$\hat{\sigma}_e^2$	0,02	0,03	0,05	20,42
$\hat{h}_a^2$	0,93	0,94	0,92	0,95
CVg (%)	16,2	17,5	15,4	16,5
CVe (%)	7,9	7,6	7,9	6,8
Quociente $\hat{b}$	2,04	2,31	1,95	2,45
Parâmetros	2º Experimento			
	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	AACPD
$\hat{\sigma}_g^2$	0,07	0,14	0,18	112,43
$\hat{\sigma}_e^2$	0,07	0,12	0,11	64,21
$\hat{h}_a^2$	0,76	0,77	0,83	0,84
CVg (%)	21,0	22,7	18,8	21,0
CVe (%)	20,5	20,7	14,5	15,9
Quociente $\hat{b}$	1,02	1,09	1,29	1,32
Parâmetros	3º Experimento			
	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	AACPD
$\hat{\sigma}_g^2$	0,11	0,15	0,21	125,93
$\hat{\sigma}_e^2$	0,06	0,10	0,11	61,77
$\hat{h}_a^2$	0,84	0,82	0,85	0,86
CVg (%)	22,1	21,5	20,6	21,1
CVe (%)	16,6	17,6	15,0	14,8
Quociente $\hat{b}$	1,33	1,22	1,37	1,43

$\hat{\sigma}_g^2$ = variância genética, $\hat{\sigma}_e^2$ = variância ambiental, $\hat{h}_a^2$ = herdabilidade no sentido amplo, CVg = coeficiente de variação genético, CVe = coeficiente de variação ambiental e quociente $\hat{b}$ = CVg/CVe.

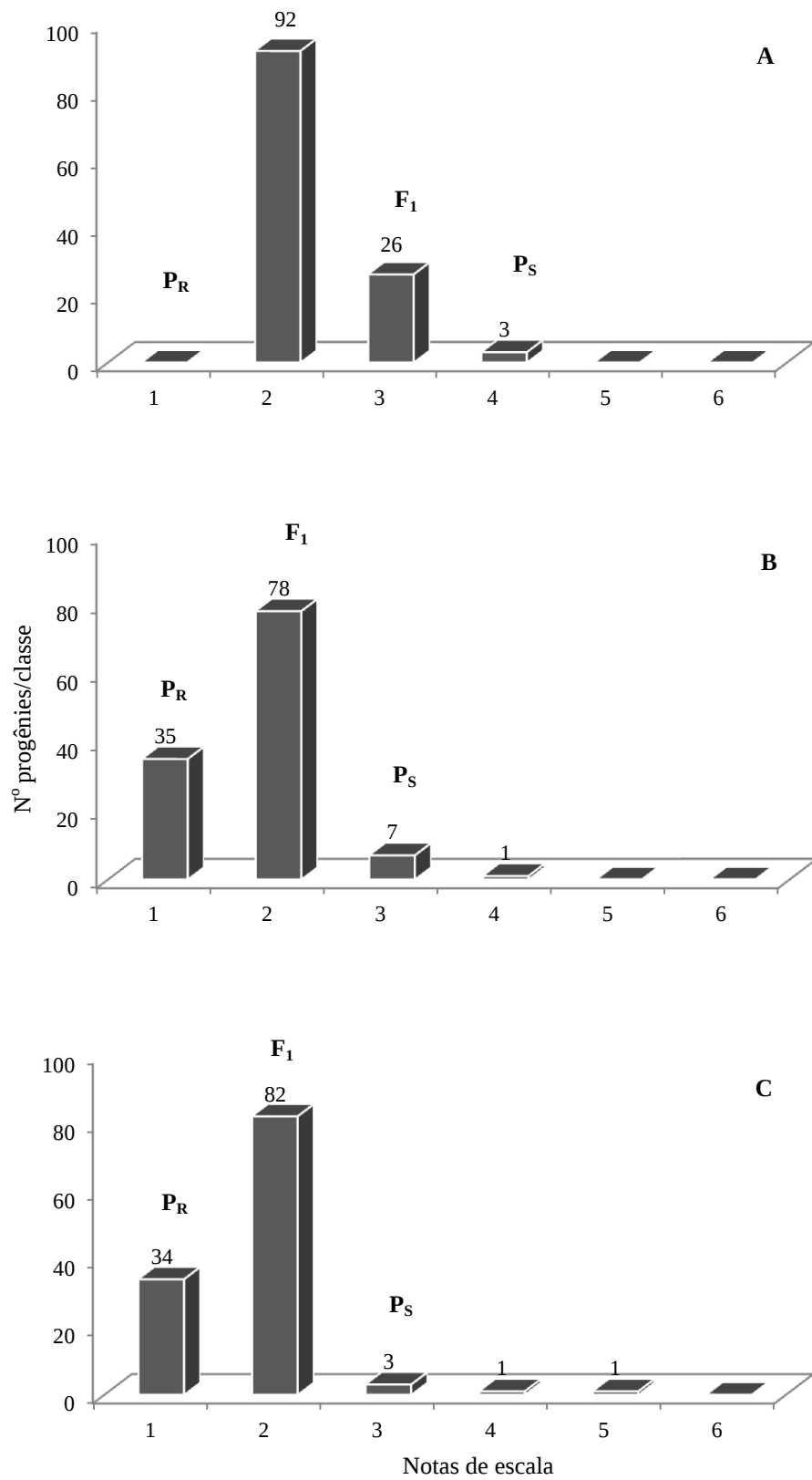


FIGURA 3 – Distribuição das médias das progênes $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L95-1 em escala de notas da 3ª avaliação da antracnose foliar para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível e F_1 = geração F_1 . Ponta Grossa, 2014.

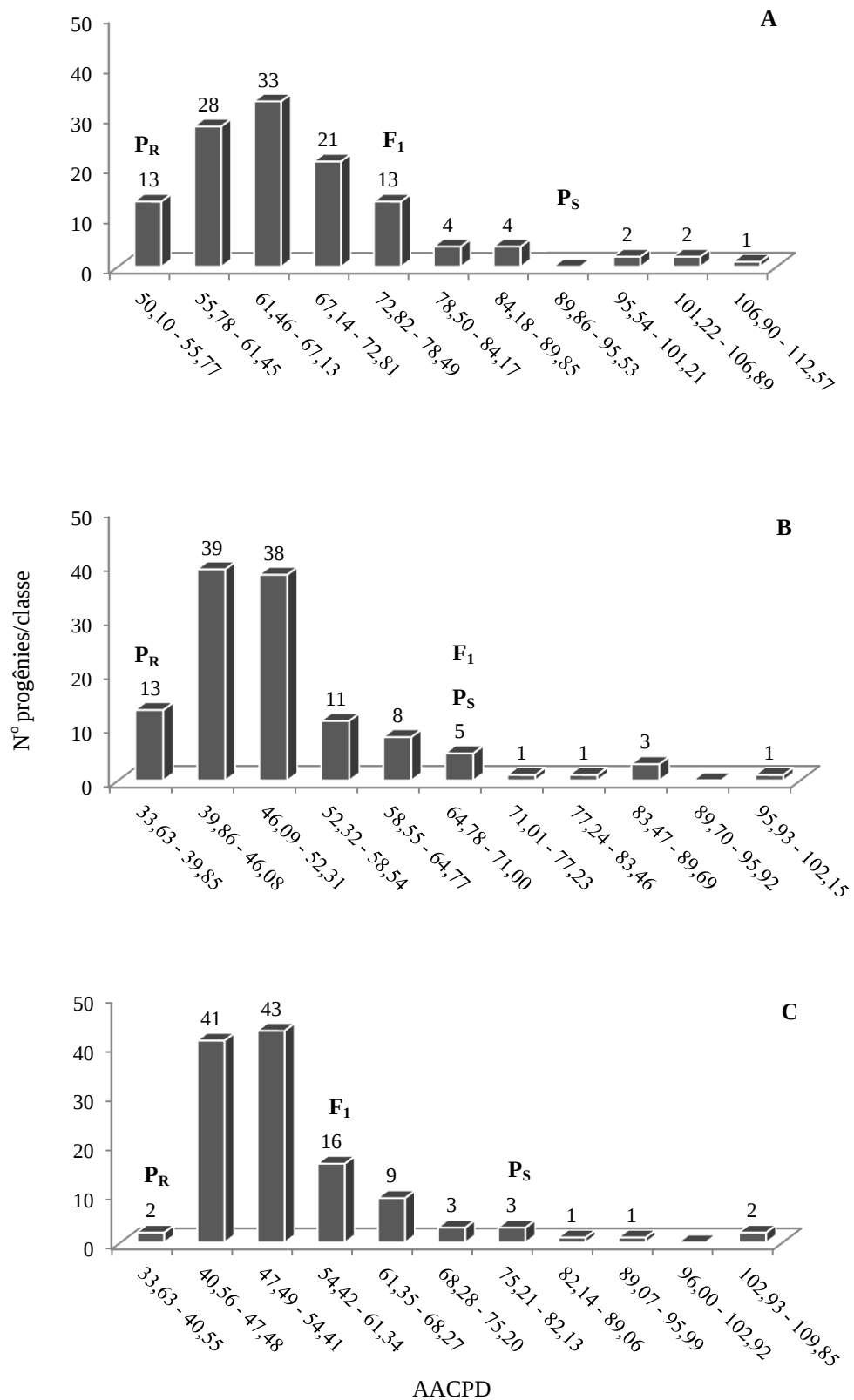


FIGURA 4 – Distribuição das médias das progênes $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L95-1 para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). P_R = parental resistente, P_S = parental suscetível e F_1 = geração F_1 . Ponta Grossa, 2014.

6 MAPEAMENTO DE QRLs À ANTRACNOSE FOLIAR EM MILHO TROPICAL

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram mapear regiões genômicas associadas à resistência quantitativa (QRL) à antracnose foliar em milho tropical e determinar os efeitos dos locos sobre a resistência/suscetibilidade à *Colletotrichum graminicola*. Os indivíduos da geração F_2 foram autofecundados a fim de gerar as progênies $F_{2:3}$, as quais foram avaliadas para resistência à antracnose foliar em três experimentos. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, as linhagens parentais (L04-2 e L95-1) e a geração F_1 , implantados no delineamento de blocos casualizados com 3 repetições. A parcela foi constituída por uma linha de 3 m de comprimento e 0,90 m na entrelinha, com aproximadamente 15 plantas por parcela. As plantas foram inoculadas por duas vezes entre os estádios V6 e V7, sendo a 2ª inoculação realizada sete dias após a 1ª. Foram realizadas três avaliações da severidade da antracnose foliar: a 1ª no estágio VT (pendoamento), a 2ª em R2 e a 3ª em R3 através de uma escala de notas com amplitude de 1 a 6. A partir das avaliações pontuais, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A associação entre os marcadores SSRs e AFLPs aos alelos de resistência foi realizada por meio da análise de regressão linear múltipla. Os locos SSRs e AFLPs foram utilizados para a construção do mapa de ligação com o auxílio do programa MAPMAKER versão 3.0 e a detecção dos QRLs realizada pelo mapeamento por intervalo composto. Os resultados experimentais evidenciaram grande variabilidade genética entre as progênies $F_{2:3}$ de milho para a resistência/suscetibilidade à antracnose foliar. A análise de ligação possibilitou agrupar e ordenar 151 marcas (SSRs e AFLPs) nos 10 grupos de ligação. O comprimento total do mapa de ligação foi de 1710,1 cM e distância média entre as marcas de 11,4 cM. A regressão linear múltipla identificou marcas moleculares altamente associadas a alelos de resistência, sendo os locos AFLPs E55139 e E56386 com os maiores coeficientes de regressão parciais para os três experimentos, com amplitude de 6,67 a 31,31 % e de 6,12 a 21,78 %, respectivamente. Considerando as três avaliações pontuais e a AACPD dos três experimentos, foram localizados pela análise de mapeamento por intervalo composto 19 QRLs à antracnose foliar em 8 grupos de ligação. Seis QRLs sendo, 1 no GL 8, 1 no GL 9 e 4 no GL 10 foram os mais estáveis para os diferentes ambientes de avaliação e responsáveis pela elevada magnitude da variação fenotípica em resistência. O grande número de QRLs mapeados nesta população segregante confirma o padrão de herança quantitativa da resistência de milho tropical à antracnose foliar causada por *C. graminicola*.

Palavras-chave: Locos de resistência. Mapeamento intervalo composto. Marcadores. Aditivo. Mapa de ligação.

ABSTRACT

The objectives of this study were to map genomic regions associated with quantitative resistance loci (QRL) to anthracnose leaf blight in tropical maize and determine the effects of the loci on resistance/susceptibility to *Colletotrichum graminicola*. Individuals of the F₂ generation were selfed to generate F_{2:3} progenies, which were evaluated for resistance to anthracnose leaf blight in three trials. The treatments consisted of 121 F_{2:3}, the parental inbred lines (L04-2 and L95-1) and the F₁ generation, implanted in a randomized block design with three replications. The plot consisted of a row of 3 m length and 0,90 m between rows, with about 15 plants per plot. Plants were inoculated in two times between the stages V6 and V7, the second inoculation made seven days after the first. Three evaluation of the severity of anthracnose leaf blight were conducted: the 1st in VT (flowering) stage, 2nd in R2 and 3rd in R3 through a note scale with amplitude from 1 to 6. From the point assessments, was calculated the area under the disease progress curve (AUDPC). The association between markers SSRs and AFLPs to resistance alleles was performed by multiple linear regression. The SSRs and AFLPs loci were used for the construction of the linkage map with the support of the program MAPMAKER version 3.0 and the QRLs detection carried by the composite interval mapping. The experimental results showed high genetic variability among the F_{2:3} progenies corn for resistance/susceptibility to anthracnose leaf blight. Linkage analysis group and order enabled marks 151 (SSRs and AFLPs) in 10 linkage groups. The total length of the linkage map was 1710,1 cM and an average distance between the marks of 11,4 cM. Multiple linear regression identified marks moleculars highly associated with resistance alleles, and the E55139 and E56386 AFLPs loci with the highest partial regression coefficients for the three experiments, with amplitudes from 6,67 to 31,31 % and 6,12 to 21,78 %, respectively. Considering the three point assessments and AUDPC of three experiments, were located by analysis of composite interval mapping 19 QRLs to anthracnose leaf blight in eight linkage groups. Six QRLs being 1 in GL 8, 1 in GL 9 and 4 in GL 10) were the most stable environments for different valuation and responsible for the high magnitude of the phenotypic variation in resistance. The large number of QRLs mapped in this segregating population confirms the pattern of quantitative inheritance of resistance in tropical maize to anthracnose leaf blight caused by *C. graminicola*.

Keywords: Loci resistance. Composite interval mapping. Markers. Additive. Linkage map.

INTRODUÇÃO

A antracnose foliar, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. encontra-se presente em todas as regiões de cultivo do milho, principalmente, em ambientes quentes e úmidos. O patógeno pode infectar a planta em vários estádios de crescimento, porém a podridão do colmo e a antracnose foliar são as formas mais importantes da doença (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; LIM; WHITE, 1978; ZUBER et al., 1981). Além da ampla distribuição geográfica, a antracnose foliar ou de colmo limita a obtenção de alto potencial de rendimento em genótipos suscetíveis (FERREIRA; CASELA, 2001; MATIELLO et al., 2013; REZENDE et al., 2004). Smith (1976) relatou danos no rendimento de grãos causados pela antracnose foliar com amplitude de 19 a 28% em híbridos e linhagens de milho, respectivamente. Por outro lado, estima-se danos mais contundentes com a antracnose do colmo, com estimativas superiores a 40 % (CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1992; KELLER; BERGSTROM; CARRUTHERS, 1986; PERKINS; HOOKER, 1979; WHITE; YANNEY; NATTI, 1979).

A resistência genética pode ser considerado um método de controle mais eficiente, econômico e ecologicamente correto para a antracnose foliar em milho (COÊLHO et al., 2001), porém o desenvolvimento de cultivares com resistência genética a doenças é considerado oneroso e trabalhoso, uma vez que envolve inúmeros ciclos de seleção e condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento do patógeno bem como para a expressão da resistência nas populações segregantes. Diante disto, a identificação e o mapeamento de QRLs (*Quantitative Resistance Loci*) à doenças através dos marcadores moleculares permite acelerar a obtenção de genótipos resistentes, maximizando o potencial de rendimento das culturas agrícolas por meio da seleção assistida por marcadores (POZAR et al., 2009).

A literatura indica que a resistência à antracnose foliar é controlada por poucos genes com ação gênica aditiva e de dominância (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b; CARSON; HOOKER, 1981a; LIM; WHITE, 1978; PROCHNO, 2013; SILVA, 1983). Rezende et al. (2004) relataram que a resistência é controlada por um gene de efeito maior, bem como por poligenes com ação gênica aditiva e de dominância.

Muitos trabalhos têm sido publicados sobre mapeamento de locos de resistência quantitativa (QRLs) para diversas doenças em regiões específicas do genoma do milho (BALINT-KURTI; CARSON, 2006; BROWN; JUVIK; PATAKY, 2001; BUBECK et al., 1993; CLEMENTS; DUDIEY; WHITE, 2000; DINGERDISSEN et al., 1996; MOREIRA;

BENTO; SOUZA JUNIOR, 2009; ZAMBRANO et al., 2014; ZWONITZER et al., 2010). Embora, o mapeamento de QRLs específicos para a antracnose foliar seja raro. Para o colmo, Carson e Hooker (1982) localizaram genes de resistência de grande efeito no braço longo dos cromossomos 1, 4 e 8 e nos dois braços do cromossomo 6. Jung et al. (1994) mapearam uma região genômica localizada no cromossomo 4, fortemente associada a um QRL, explicando mais de 50% da variação fenotípica para a resistência. Matiello (2004) localizou sete regiões genômicas associadas a alelos de resistência nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, responsáveis por 2,1 a 14,7% da variação fenotípica para resistência à antracnose do colmo.

Morello (2000) encontrou polimorfismo molecular próximo ao gene *Rcg1*, o qual confere resistência à antracnose foliar. Evidências indicam que o *Rcg1* esteja localizado no braço longo do cromossomo 2. Rezende (2004) identificou QRLs nos cromossomos 2, 3, 5 e 10 através da análise de regressão linear múltipla, explicando até 25,7 % da variação fenotípica para a resistência à antracnose foliar. Através do mapeamento por intervalo composto, dois QRLs com efeitos aditivos negativos foram mapeados no cromossomo 10, responsáveis por de 14,2 a 21,0 % da variação fenotípica em resistência.

Estudos visando conhecer a natureza e a magnitude dos efeitos dos genes de resistência são importantes para orientar os procedimentos que visam introduzir novos alelos de resistência em germoplasmas suscetíveis e maximizar a utilização da variabilidade genética nas populações sob seleção (POZAR et al., 2009). Dessa forma, a determinação do número, da ação gênica envolvida e do posicionamento dos QRLs no mapa consenso do milho podem contribuir significativamente para esclarecer a base genética da resistência de milho à antracnose foliar em germoplasma tropical. Neste sentido, o trabalho objetivou mapear as regiões genômicas responsáveis por QRLs à antracnose foliar, quantificar os efeitos dos QRLs para a resistência e inferir sobre a estabilidade dos QRLs mapeados nos diferentes ambientes e períodos de avaliação da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As linhagens endogâmicas de origem tropical L04-2 (resistente) e L95-1 (suscetível) foram cruzadas para obter a população segregante da geração F_2 . Os indivíduos foram autofecundados para gerar as progênes $F_{2:3}$, que foram avaliadas para a resistência à antracnose foliar em experimentos de campo.

Avaliação da Resistência de Milho à Antracnose Foliar

As progênes $F_{2:3}$ de milho foram avaliadas em três experimentos, semeados em 10/01/2013, 19/11/2013 e 17/12/2013 na Fazenda Escola “Capão da Onça”, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa – PR). Os tratamentos foram constituídos de 121 progênes $F_{2:3}$, genitores (L04-2 e L95-1) e geração F_1 , implantados no delineamento de blocos casualizados com três repetições. A parcela foi constituída por uma linha de 3 m de comprimento e 0,90 m na entrelinha, com aproximadamente 15 plantas por parcela. A multiplicação e preparo do inóculo foi realizado conforme descrito no item 4.1.3. As plantas dos experimentos foram inoculadas por duas vezes entre os estádios V6 e V7, através da pulverização de 7 mL da suspensão de esporos (6×10^5 e $1,0 \times 10^6$ conídios mL^{-1}) no cartucho das plantas, através de pulverizador costal calibrado a pressão constante de 35 lb pol^{-2} , por CO_2 comprimido.

A avaliação da resistência das progênes de milho à antracnose foliar foi realizada a partir do aparecimento dos primeiros sintomas da doença, aproximadamente aos quinze dias após a 1ª inoculação. Foram realizadas três avaliações da severidade, sendo a 1ª no estágio VT (pendoamento), a 2ª em R2 e a 3ª em R3 (FANCELLI, 1986). A caracterização da resistência/suscetibilidade das progênes de milho à antracnose foliar foi através da escala de notas proposta por Silva (1983), com amplitude de 1 (altamente resistente) à 6 (altamente suscetível). A partir das médias das notas de escala das três avaliações foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). As médias fenotípicas das progênes para a 1ª, 2ª, 3ª avaliação e para AACPD nos respectivos experimentos foram utilizadas para as análises de regressão linear múltipla e para o mapeamento por intervalo composto.

Marcador SSR

88 locos microssatélites (SSR), distribuídos nos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, foram amplificados nas linhagens endogâmicas parentais (L04-2 e L95-1) a fim de selecionar locos polimórficos. Os locos SSR foram selecionados a partir do *Maize Genetics and Genomics Data Base – MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org>).

No *screening* inicial foram utilizados DNA apenas das linhagens parentais (L04-2 e L95-1) com o intuito de otimizar a reação de amplificação dos locos e selecionar SSRs polimórficos. A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, contendo: 1X tampão InvitrogenTM; 2,0 mM MgCl₂; 0,1 mM de solução de dNTP (100 mM, Amresco[®]); 0,2 µM de cada *primer* (*forward e reverse*); 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL, InvitrogenTM) e 20 ng de DNA molde para um volume final de reação de 20 µL. Para a otimização dos diferentes locos SSR foram utilizados 3 programas de PCR, sendo 2 do tipo *touchdown* (OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000) e um de ciclagem normal (YAO et al., 2007).

As amostras amplificadas foram coradas com 4 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE 1X por aproximadamente 3 h a 80 V. Foi adicionado à extremidade esquerda do gel uma amostra de 5 µL do marcador de peso molecular de 100 pb (NORGEN[®]), visando determinar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Os 121 indivíduos da população de mapeamento (F₂) foram genotipados para cada loco polimórfico com a codificação: (1) fragmento amplificado correspondente ao alelo SSR oriundo da linhagem resistente (L04-2), (-1) fragmento amplificado correspondente ao alelo SSR oriundo da linhagem suscetível (L95-1) e (0) presença dos dois fragmentos correspondentes aos alelos das linhagens parentais L04-2 e L95-1 (Figura 5).

Marcador AFLP

A metodologia de amplificação do marcador AFLP foi de acordo com Vos et al. (1995). Inicialmente, foram testados 40 combinações de *primers* *EcoRI* e *MseI* visando selecionar aquelas com melhor padrão de amplificação, maior polimorfismo entre as linhagens parentais e entre os *bulks* de DNA, constituídos pela mistura equitativa dos dez indivíduos mais resistentes e dez mais suscetíveis à antracnose foliar da população de mapeamento de acordo com a metodologia de análise de *bulks* segregantes (BSA) proposta

por Micheltmore, Paran e Kesseli (1991). Das 40 combinações de *primers*, 19 foram escolhidas para genotipar a população de mapeamento. Apenas os fragmentos polimórficos de cada combinação *EcoRI* + *MseI* foram genotipados em (1) presença e (0) ausência. A denominação do loco polimórfico genotipado seguiu a descrição de Castiglioni et al. (1999).

Associação dos Marcadores à QRLs pela Regressão Linear Múltipla

Os locos microssatélites e AFLPs genotipados na população de mapeamento, foram submetidos à análise de regressão linear múltipla (EDWARDS; STRUBER; WENDEL, 1987). As médias das notas de escala da 1ª (VT), 2ª (R2) e 3ª (R3) avaliação e da AACPD de cada progênie $F_{2:3}$ para os três experimentos, foram consideradas como variáveis dependentes e os genótipos em locos marcadores como variáveis independentes. Este processo permitiu selecionar apenas as marcas (SSR/AFLP) significativamente ($Pr < 0,05$) associadas à QRLs à antracnose foliar nos experimentos individuais. Nesta análise foram construídos modelos com os marcadores moleculares que permaneceram na regressão linear múltipla pelo processo “stepwise” de seleção de variáveis regressoras (DRAPER; SMITH, 1981). Neste procedimento utilizou-se um nível de significância de 5 % para entrada e saída das marcas dos modelos.

Análise de Ligação e Mapeamento por Intervalo Composto (MIC)

Os locos SSRs e AFLPs que apresentaram segregação mendeliana esperada (não distorcidos) foram utilizados para a construção do mapa de ligação com o auxílio do programa MAPMAKER versão 3.0 (LANDER et al., 1987). A construção dos grupos de ligação baseou-se no comando “group” utilizando um LOD de 3,0 (método da máxima verossimilhança) e frequência máxima de recombinação $\theta = 0,40$. As frequências de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa utilizando a função de mapeamento de Haldane (1919). Após a definição dos grupos de ligação, os marcadores dentro de cada grupo foram ordenados pelo comando “order” com um LOD maior que 3,0. Para garantir a correta ordenação dos marcadores, foi utilizado o comando “ripple”.

As análises de mapeamento dos QRLs foram realizadas utilizando as médias das notas da severidade da doença das três avaliações e da AACPD das 121 progênies $F_{2:3}$ de milho nos três experimentos. A localização dos QRLs foi através da análise de mapeamento por intervalo composto (MIC) pelo programa *QTLCartographer*[®] (BASTEN; WEIR; ZENG,

2000). Para o posicionamento dos QRLs a análise MIC utilizou o mapa de ligação dos marcadores gerado no programa MAPMAKER versão 3.0. A estimativa da posição, do efeito genético e da porcentagem da variação fenotípica (coeficiente de correlação parcial, R^2) dos QRLs foi estabelecida nos picos de LOD $> 2,5$, nível de significância utilizado pelo programa *QTL Cartographer*[®].

RESULTADOS

Genotipagem com o Marcador Microsatélite

Dos 88 locos SSR analisados, 59 (67 %) não foram informativos, isto é, não revelaram polimorfismo e 29 (33 %) foram polimórficos entre as linhagens (Tabela 6). O maior número de locos polimórficos foi observado nos grupos de ligação 3, 4 e 8, com 4 locos SSR por grupo (Tabela 6). O polimorfismo esteve associado principalmente nas regiões genômicas compreendidas entre os grupos/*bins* 3/04 a 3/06, 4/04 a 4/11 e 8/03 a 8/08 (Tabela 7).

A genotipagem dos indivíduos da população de mapeamento (L04-2 x L95-1) com 29 locos SSR, evidenciou 12 SSRs com distorção de segregação mendeliana (12/29), equivalendo a 41,4 %. Segregação mendeliana esperada para marcador com expressão codominante (1:2:1) foi observado em 17 locos SSRs (58,6 %) (Tabela 6). Destes, 2 no grupo de ligação 1 (Bnlg1007 e Bnlg131), 1 no 2 (Phi101049), 2 no 3 (Bnlg602 e Umc1030), 2 no 4 (Bnlg490 e Umc1511), 1 no 5 (Bnlg557), 1 no 6 (Mmc0241), 2 no 7 (Bnlg1292 e Umc1799), 1 no 8 (Phi115), 3 no 9 (Umc2084, Phi065 e Phi027) e 2 no 10 (Umc1319 e Umc1084) (Tabela 7).

Genotipagem com o Marcador AFLP

Das 40 combinações de *primers* EcoRI + MseI, 19 foram escolhidas para genotipar os 121 indivíduos da população de mapeamento. O padrão de amplificação dos fragmentos monomórficos e polimórficos em parte da população segregante para a combinação de *primers* E-AAC/M-CAG pode ser visualizado na Figura 6.

As 19 combinações de *primers* amplificaram 1131 fragmentos, com tamanho variando de 68 a 1131 pb. Dos fragmentos amplificados, 747 (66 %) foram monomórficos e 384 (34 %) polimórficos entre as linhagens parentais (L04-2 e L95-1), com média de 20,2 locos polimórficos por combinação de *primers*. O polimorfismo variou entre as combinações, sendo a E5M8 (E-AAC/M-CTA) com maior polimorfismo (50 %), ao passo que a E5M9 (E-AAC/M-CCC) com o menor polimorfismo (19 %) (Tabela 8).

Os resultados da análise de bulks segregantes (BSA) para o marcador AFLP possibilitaram associar fragmentos com polimorfismo entre os bulks de DNA (BR – bulk resistente e BS – bulk suscetível) equivalendo àqueles amplificados na linhagem parental resistente L04-2 (associação com resistência) ou fragmentos do parental suscetível L95-1

(associação com suscetibilidade), para as médias fenotípicas das progênes $F_{2:3}$ nos três experimentos (Tabela 9 e Figura 7).

Dezenove combinações de *primers* demonstraram associações favoráveis para alelos de resistência à antracnose foliar (Tabela 9). O número de fragmentos associados com a análise BSA variou de 1 (E1M2, E1M4, E2M3, E3M2, E3M4, E3M5, E4M3, E4M5, E5M2, E5M4, E5M9 e E5M14) à no máximo 3 (E2M2 e E5M1). Foram identificados 28 fragmentos AFLPs associados com polimorfismo entre os bulks extremos (resistência ou suscetibilidade). Destes, 21 fragmentos (75 %) associados com resistência (BR) e oriundos do parental resistente (L04-2) e 7 (25 %) associados com suscetibilidade (BS) e oriundos do parental suscetível à antracnose foliar (L95-1) (Tabela 9).

Mapa de Ligação

Dos 413 fragmentos polimórficos (SSRs e AFLPs), somente 224 foram utilizados na construção do mapa de ligação (Tabela 10). 212 marcas foram agrupadas entre os 10 grupos de ligação (cromossomos) do milho, utilizando como critério de agrupamento LOD de 3,0 e frequência máxima de recombinação de $\theta = 0,40$. Como os locos SSRs possuem localização genômica conhecida, foi possível estabelecer correspondência dos grupos de ligação obtidos da análise com os 10 cromossomos do milho (Figura 8).

Das marcas agrupadas, 151 (67 %) foram ordenadas nos 10 grupos de ligação, utilizando $LOD > 3,0$. O número de marcas ordenadas oscilou de 10 no cromossomo 8 à 20 nos cromossomos 4 e 5, com média de 15,1 marcas por cromossomo. O comprimento total do mapa de ligação foi de 1710,1 cM, com distância média entre marcas de 11,4 cM. O comprimento dos grupos de ligação variou de 107,5 no grupo 8 à 244,3 cM no grupo 5 (Tabela 10).

Associação dos Marcadores à QRLs pela Regressão Linear Múltipla

Na genotipagem dos indivíduos da população F_2 , os locos SSR foram codificados em (1) para representar indivíduos homozigotos para o alelo marcador oriundo do parental resistente (L04-2), (0) para indivíduos heterozigotos e (-1) para indivíduos homozigotos para o alelo marcador oriundo do parental suscetível (L95-1). Desta forma, a origem parental do alelo de resistência no QRL foi determinada pelo sinal do coeficiente de regressão; se negativo (decréscimo da doença), infere-se que o alelo de resistência descende do parental

resistente (L04-2) e quando positivo (acrécimo da doença), originário do parental suscetível (L95-1). Por outro lado, os fragmentos AFLPs foram codificados com (1) para a presença e (0) para a ausência do fragmento no indivíduo genotipado. Assim, se o sinal do coeficiente de regressão for negativo, indica que a presença do fragmento AFLP está associada com a redução da doença (marcador em associação com o alelo de resistência no QRL), se positivo, aumento da doença (marcador em repulsão com o alelo de resistência no QRL). A origem parental do alelo AFLP foi realizada através da leitura direta dos géis (Figura 6).

A proporção da variação fenotípica explicada pelos modelos de regressão foi obtida pelo coeficiente de determinação R^2 e a proporção da variação fenotípica encontrada pelos marcadores individualmente pelo R^2 parcial. Os modelos foram responsáveis por 27,7 (2ª avaliação no 3º experimento) a 63 % (AACPD no 2º experimento) da variação em resistência à antracnose foliar (Tabelas 11, 12 e 13). Considerando todos os modelos de regressão linear múltipla (3 experimentos, 3 avaliações e AACPD), foram identificados 49 locos marcadores associados à QRLs, sendo 20 no 1º experimento, 20 no 2º e 22 no 3º. Os resultados das análises de regressão linear múltipla evidenciaram marcadores moleculares associados em 9 dos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, com exceção do grupo 3. Dos marcadores associados à QRLs, 3 estão no cromossomo 1, 3 no cromossomo 2, 5 no cromossomo 4, 2 no cromossomo 5, 3 no cromossomo 6, 1 no cromossomo 7, 4 no cromossomo 8, 2 no cromossomo 9 e 1 no cromossomo 10 (Tabelas 11, 12 e 13).

No primeiro experimento, a maior porcentagem da variação fenotípica explicada pela associação marcador-QRL (62,8 %) foi obtida para a 3ª avaliação (Tabela 11). O loco AFLP E56386, oriundo da linhagem resistente L04-2 (fase de atração), demonstrou a maior proporção da variação fenotípica em resistência na 1ª avaliação (17,28 %), na 3ª (21,78 %) e na AACPD (20,15 %). A grande maioria dos locos marcadores associados à QRLs à antracnose foliar tiveram origem na linhagem endogâmica resistente (L04-2) (Tabela 11).

No segundo experimento a maior contribuição da associação marcador-QRL para a redução da doença foi através da área abaixo da curva de progresso da doença com 63 %. Dos marcadores associados à QRLs, o loco AFLP E55139, em fase de atração (origem na linhagem resistente L04-2), demonstrou os maiores coeficientes de regressão parciais, independente da forma de avaliação, com amplitude de 22,94 a 31,31 % (Tabela 12). Novamente o maior número de locos associados à QRLs, originou-se na fonte de resistência utilizada no cruzamento (L04-2).

A exemplo do 1º experimento, o modelo baseado na 3ª avaliação da doença foi o que explicou a maior proporção da variação fenotípica em resistência no 3º experimento

(50,71%). O loco AFLP E55139, evidenciou a maior porcentagem da variação fenotípica em resistência para a 1ª avaliação (15,67 %), 3ª (13,63 %) e para a AACPD (14,85 %) (Tabela 13). Os locos E55139 e E56386 (fase de atração) localizados nos cromossomos 5 e 8, respectivamente, demonstraram os maiores coeficientes de regressão parciais para os três experimentos, com amplitude de 6,67 a 31,31 % para o E55139 e de 6,12 a 21,78 % para o loco E56386 (Tabelas 11, 12 e 13).

A combinação de *primers* AFLP E2M2 (E-ATC/M-CAC) evidenciou o maior número de fragmentos associados com QRLs à antracnose foliar, sendo 2 (1ª avaliação), 1 (2ª avaliação), 3 (3ª avaliação) e 1 (AACPD). As combinações E3M4 (E-AGC/M-CTC) e E5M1 (E-AAC/M-CAC) revelaram apenas 1 fragmento AFLP associado a alelos de resistência à antracnose foliar (Tabela 14). De maneira geral, os resultados da regressão linear múltipla para a 3ª avaliação demonstraram o maior número de associações favoráveis de locos AFLPs com QRLs para à antracnose foliar (19) (Tabela 14).

Mapeamento dos QRLs

As análises possibilitaram mapear QRLs nos três experimentos de fenotipagem para resistência/suscetibilidade das progênes F_{2:3} do cruzamento L04-2 x L95-1. O número de intervalos entre marcadores com efeitos significativos para a presença de QRLs foi variável entre os experimentos e as formas de avaliação da severidade da antracnose foliar. Foram detectados QRLs em 19 intervalos distribuídos em 8 grupos de ligação. Na 1ª avaliação do 1º experimento, foram identificados 9 QRLs, 8 na 3ª avaliação e 6 para a AACPD. No 2º experimento, foram mapeados 10 QRLs na 2ª avaliação da doença e 5 para a AACPD, não sendo identificado associações significativas de intervalos para a 1ª e 3ª avaliação. Para o 3º experimento, foram detectados QRLs nas quatro formas de avaliação da severidade da doença, sendo 1 QRL para a 1ª avaliação, 9 para a 2ª, 5 para a 3ª e 7 para a AACPD. As estimativas das posições e dos efeitos aditivos e de dominância dos QRLs são apresentadas na Tabela 15. Os gráficos com os valores do LOD *score* ao longo dos grupos de ligação (cromossomos) podem ser visualizados nas Figuras 9, 10 e 11.

QRLs da 1ª Avaliação

No 1º experimento foram identificados QRLs significativos em 9 diferentes intervalos (Tabela 15 e Figura 9). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou

de 18 % para o QRL do grupo de ligação 9 na posição 132,2 cM à 94,1 % para os QRLs no grupo 2 (4,0 cM) e no grupo 10 (13,9; 43,8 e 171,3 cM). O maior valor de LOD score foi para o QRL do GL 10 (grupo de ligação) no intervalo E5876-Umc1084, com LOD de 45,1. Dos 9 QRLs nesta avaliação, 3 evidenciaram efeito aditivo negativo, sendo provenientes da linhagem parental resistente (L04-2). Estes QRLs foram mapeados nos intervalos: E4480-E55100 (GL 8), E51562-E5197 (GL 9) e E2381-E514386 (GL 10). Os demais QRLs tiveram origem na linhagem suscetível (L95-1). O QRL do intervalo E43680-E43112 (GL 2) também foi identificado pela análise de regressão linear múltipla, através do fragmento AFLP E43680 (Tabela 12).

Para o 2º experimento nenhum QRL foi mapeado nesta avaliação. No 3º experimento, a análise de MIC localizou 1 QRL no GL 8, na posição 92,7 cM do intervalo E4486-Phi015. A proporção da variação fenotípica explicada por este QRL foi de 87,5 %, com LOD score de 36,5 e efeito aditivo negativo (Tabela 15). O fragmento E4486 também mostrou-se associado à QRL pela análise de regressão linear múltipla (Tabela 13). De maneira geral, os QRLs mapeados na 1ª avaliação da severidade da antracnose foliar, evidenciaram interação com os ambientes de avaliação (experimentos). Nenhum dos QRLs mapeados foram comuns para os três experimentos nesta avaliação (Tabela 15).

QRLs da 2ª Avaliação

No 1º experimento não foi detectado intervalos significativos para os locos de resistência à antracnose foliar. Por outro lado, no 2º experimento, os resultados da análise MIC demonstraram a presença de 10 QRLs em diferentes intervalos entre os grupos de ligação (Tabela 15 e Figura 10). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 32,8 % para os QRLs localizados nos intervalos E51562-E5197 (147,2 cM) e E52314-E43174 (187,1 cM) do grupo de ligação 9 a 90,6 % para os QRLs localizados nos intervalos E51308-E15174 (184,7 cM - GL 1), E12162-E1576 (3,2 cM - GL 2), Umc1511-E56434 (105,2 cM - GL 4), E5494-E55248 (65,2 cM - GL 8) e E5876-Umc1084 (171,4 cM - GL 10). Quatro dos QRLs, apresentaram efeito aditivo negativo, mapeados nos intervalos E51308-E15174 (GL 1), E51532-E55139 (GL 5), E4480-E55100 (GL 8) e E51562-E5197 (GL 9) (Tabela 15 e Figura 10). O QRL do GL 5 (E51532-E55139), também esteve associado pela análise de regressão linear múltipla através do fragmento AFLP E55139 (Tabelas 11, 12 e 13). Este fragmento demonstrou nas análises de regressão linear múltipla o maior coeficiente de regressão parcial negativo (31,2 %) (Tabela 12).

No 3º experimento foram mapeados 9 QRLs, sendo 4 com efeito aditivo negativo, correspondendo aos intervalos: E51308-E15174 (GL 1), E4480-E55100 (GL 8), E51562-E5197 (GL 9) e E55118-E2381 (GL 10) (Tabela 15 e Figura 11). Nenhum dos fragmentos AFLPs que flanqueiam os QRLs mapeados nesta avaliação estiveram associados pela análise de regressão linear múltipla. A grande maioria dos QRLs mapeados na 2ª avaliação evidenciaram interação com os ambientes (experimentos). Os intervalos E51308-E15174 (GL 1), E4480-E55100 (GL 8), E5494-e55248 (GL 8), E51562-E5197 (GL 9) e E5876-Umc1084 (GL 10) associados à QRLs para a antracnose foliar foram significativos tanto para o 2º quanto para o 3º experimento (Tabela 15 e Figuras 10 e 11).

QRLs da 3ª Avaliação

No 1º experimento foram mapeados QRLs em 8 intervalos. Três QRLs no GL 5, 1 no GL 8 e 4 no GL 10 (Tabela 15 e Figura 9). Somente o QRL detectado no intervalo E55118-E2381 (GL 10), apresentou efeito aditivo negativo. Os intervalos E4487-E54185 (GL 4), E5494-e55248 (GL 8), E58117-E514698 (GL 10), E514698-E58207 (GL 10) e E5876-Umc1084 (GL 10) também estiveram associados à QRLs na avaliação do 1º experimento (Tabela 15).

Para o 3º experimento foram mapeados 5 QRLs (Figura 11). A proporção da variação fenotípica em resistência explicada por estes QRLs variou de 23,4 % para o do GL 8 (72,8 cM) a 41,4 % para o do GL 10 (47,2 cM). Somente o QRL localizado no GL 9 (E51562-E5197) demonstrou efeito aditivo negativo (Tabela 15).

QRLs para a AACPD

No 1º experimento foram mapeados QRLs significativos em 6 intervalos relativos aos GLs 8, 9 e 10 (Tabela 15). A proporção da variação fenotípica em resistência explicada por estes QRLs variou de 27,7 % para o QRL do GL 9 (E51562-E5197) a 52,2 % para o do GL 8 (E5494-E55248). Dos QRLs mapeados, apenas dois demonstraram efeito aditivo negativo, no GL 9 (E51562-E5197) e no GL 10 (E55118-E2381) (Tabela 15 e Figura 9).

A análise de MIC possibilitou detectar 5 regiões genômicas associadas à QRLs para a AACPD no 2º experimento (Tabela 15 e Figura 10). Os intervalos mapeados foram: 1 no GL 9 (E51562-E5197) e 4 no GL 10 (E58117-E514698, E514698-E58207, E55118-E2381 e

E5876-Umc1084). Apenas dois QRLs evidenciaram efeito aditivo negativo nos intervalos E51562-E5197 e E55118-E2381 (Tabela 15).

No 3º experimento dos 7 QRLs mapeados (Figura 11), 6 também estiveram associados para o 1º experimento. Dois QRLs localizados nos intervalos E51562-E5197 (GL 9) e E55118-E2381 (GL10) apresentaram efeito aditivo negativo (Tabela 15). Os QRLs identificados a partir dos dados da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) na sua grande maioria foram estáveis para os três ambientes de avaliação (E5494-E55248, E51562-E5197, E58117-E514698, E514698-E58207, E55118-E2381 e E5876-Umc1084). Embora, o QRL do GL 9 (E52314-E43174) tenha sido localizado apenas para o 3º experimento (Tabela 15).

Os resultados da análise de MIC possibilitaram mapear várias regiões genômicas responsáveis por alelos de resistência à antracnose foliar nesta população segregante a partir das três avaliações pontuais da severidade da doença e da AACPD. No total foram mapeados 19 QRLs distribuídos em 8 dos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, sendo que no GL 10 foi detectado o maior número de QRLs (5). De maneira geral, observou-se possível interação dos QRLs mapeados com o respectivo ambiente de avaliação (experimentos). Os QRLs localizados nos intervalos E5494-E55248 (GL8) e E5876-Umc1084 (GL 10) foram os mais estáveis frente aos ambientes/formas de avaliação da doença (7/12 e 8/12 ambientes, respectivamente) bem como responsáveis em média pelos maiores coeficientes de regressão parciais (64,7 e 68,8 %). Dos 19 QRLs mapeados, 7 evidenciaram efeito aditivo negativo, alelos de resistência oriundos da fonte de resistência L04-2 e 12 com efeito aditivo positivo, ou seja, alelos de resistência provenientes da linhagem suscetível L95-1 (Tabela 15).

DISCUSSÃO

O nível de polimorfismo dos marcadores SSR (33 %) usado neste estudo pode ser considerado baixo quando comparado aos 50 % relatado por Ogliari (1999), 45 % por Lopes (2003) e 43 % por Tasior (2014). Por outro lado, os 34 % estimado para o AFLP foi bastante superior ao relatado por Castiglioni et al. (1999), com média de 18,5 % a partir de 11 combinações de *primers* *EcoRI* + *MseI*. Os resultados deste trabalho foram bastante similares a Vuylsteke et al. (1999), os quais relataram polimorfismo molecular de 35,7 a 36,3 % em grupos heteróticos de origem temperada. Lopes (2003) estimou em 31,3 % o polimorfismo médio entre linhagens endogâmicas de origem tropical a partir de 56 combinações de *primers* AFLPs. Da mesma forma, Matiello (2004) relatou polimorfismo molecular de 33,7 % a partir da genotipagem de 17 combinações de *primers* (*EcoRI* + *MseI*) numa população segregante da geração F₂ de origem tropical.

A análise de bulks segregantes (BSA) permitiu encontrar associações favoráveis de fragmentos AFLPs à QRLs para a antracnose foliar em 19 das 40 combinações de *primers*. Neste trabalho a metodologia BSA foi utilizada numa etapa inicial com o objetivo de reduzir o número de combinações de *primers* AFLPs genotipados na população de mapeamento. Esta análise possibilitou selecionar de forma rápida as combinações com polimorfismo entre os bulks de DNA, reduzindo o tempo e o custo na genotipagem da população de mapeamento.

A análise de regressão linear múltipla proposta por Draper e Smith (1998) utiliza o método de construção de modelos “passo a passo” (*stepwise*), de forma que permaneçam no modelo de regressão apenas as marcas com evidências de estarem associadas à QRLs. O procedimento “*stepwise*” seleciona as variáveis regressoras (marcas) procurando o melhor modelo de regressão através da exclusão de marcas redundantes, ou seja, aquelas com alto coeficiente de correlação (SILVA; VENCOVSKY, 2002). Os resultados da análise de regressão demonstraram a presença de QRLs associados à antracnose foliar oriundos tanto da linhagem resistente L04-2 quanto da suscetível L95-1. Para a antracnose do colmo, Matiello (2004) também identificou QRLs oriundos da linhagem endogâmica suscetível (Das 86). No presente trabalho a maioria das associações marcadores-QRLs à antracnose foliar evidenciou interação dos QRLs com os ambientes de avaliação (experimentos). Embora o número de associações favoráveis marcadores-QRLs para a redução da doença tenha sido similar entre os experimentos, nota-se que nem todos os marcadores associados foram significativos para os três experimentos. Os resultados evidenciaram que o maior número de associações favoráveis marcadores-QRLs para os três experimentos foram encontrados para a 3ª avaliação (19

associações), possivelmente pela antracnose foliar estar num estágio bastante avançado de desenvolvimento, possibilitando o melhor contraste fenotípico entre os indivíduos resistentes e suscetíveis da população de mapeamento.

Rezende (2004) identificou três marcadores associados à QRLs em dois experimentos a partir da análise de regressão linear múltipla. Os modelos explicaram 25,7 (1º experimento) e 23,3 % (2º experimento) da variação fenotípica para resistência à antracnose foliar. Para a autora, dentre todas as associações favoráveis SSRs-QRLs, apenas o loco microssatélite Bnlg197 (cromossomo 3), foi significativo para os dois experimentos, com coeficientes de regressão parcial variando de 3,8 a 5,9 %. Da mesma forma, os locos AFLPs E32M59-89 (1º experimento) e E36M49-221 (2º experimento) localizados no cromossomo 10 também foram detectados pela regressão linear múltipla, com coeficientes de 15,6 e 13,2 %, respectivamente.

Kerns; Dudley e Rufener (1999) identificaram marcadores associados à QRLs à ferrugem comum e ao carvão do milho através da regressão linear múltipla. Para a ferrugem comum, os modelos de regressão foram responsáveis por 8,8 % (4 QRLs), 11,6 % (6 QRLs) e 19 % (9 QRLs) da variação fenotípica em resistência em três ambientes de avaliação. Na análise combinada dos ambientes, o modelo de regressão linear explicou 22 % (12 QRLs) da variação fenotípica em resistência na população segregante. Para carvão, a análise foi responsável por 13,4 % (5 QRLs) e 16,2 % (6 QRLs) da variação fenotípica nos ambientes de avaliação. Coeficientes de regressão parciais similares foram relatados para a resistência à *Cercospora zea-maydis* por Veiga et al. (2012), com cinco marcas associadas a redução da severidade da cercosporiose em milho, com 3,2 a 16,4 % da variação fenotípica em resistência. Embora estes resultados tenham sido obtidos em outros patossistemas de milho, eles podem ser usados como referência para o presente trabalho, uma vez que os coeficientes de regressão explicaram uma importante fatia da variação fenotípica para resistência à antracnose foliar.

No presente trabalho, os marcadores AFLPs E55139 e E56386 evidenciaram, independente do experimento e dos períodos de avaliação da doença, elevados coeficientes de regressão parcial, com índices médios de 19,5 e 13,3 %, respectivamente. Adicionalmente, a grande maioria das marcas moleculares significativamente associadas à QRLs é oriunda da fonte de resistência L04-2. Para que a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) tenha potencial de uso nos programas de melhoramento é necessário que as marcas associadas à QRLs sejam estáveis nos ambientes de avaliação e de efeito pronunciado na redução da severidade da doença (EATHINGTON, 2005; KOEBNER, 2004; RAGOT et al., 2000; RIBAUT; HOISINGTON; 1998; XU, 2003). Assim, as marcas E55139 e E56386 com

associação significativa em todos os ambientes de avaliação e na grande maioria dos períodos/formas de quantificação (escala de notas ou AACPD) da doença, poderiam ser fortes candidatas para a SAM para resistência à antracnose foliar em milho.

Os 11 locos SSRs possibilitaram através da análise de ligação co-localizar os fragmentos AFLPs no mapa consenso de milho. Os resultados permitiram atribuir referência cromossômica aos 10 grupos de ligação do milho, por meio da presença de pelo menos um loco SSR por grupo de ligação. A amplitude do comprimento dos grupos de ligação (107,5 a 244,3 cM) e o comprimento total do mapa de ligação (1710,1cM) estão de acordo com outros mapas genéticos obtidos de populações segregantes de milho de origem tropical (LOPES, 2003; MATIELLO, 2004; TASIOR, 2014). Sibov et al. (2003) ao genotiparem uma população F₂ de milho tropical com 117 locos SSRs, obtiveram um mapa com 1643 cM de comprimento e distância média entre marcas de 14 cM. Mangolin et al. (2004) a partir de 75 locos microssatélites genotipados numa população segregante de milho tropical, geraram um mapa com 1438 cM de comprimento e distância entre marcas de 18,1 cM. Matiello (2004) a partir dos marcadores SSRs e AFLPs, gerou um mapa de ligação com 1482 cM de comprimento e distância média entre marcas de 9,4 cM.

O mapa de ligação gerado por Castiglioni et al. (1999) demonstrou uma maior cobertura do genoma, com 2057 cM e marcadores distribuídos a cada 6,6 cM. Este resultado pode ser atribuído ao maior número de indivíduos genotipados (229 famílias), permitindo uma maior amostragem dos gametas, e consequentemente uma maior probabilidade na detecção dos eventos de recombinação. A distância média entre as marcas obtidas no presente trabalho foi de 11,4 cM, o que demonstra uma boa cobertura do genoma analisado na população segregante oriunda do cruzamento das linhagens contrastantes para resistência à antracnose foliar (L04-2 x L95-1).

A análise de mapeamento por intervalo composto (MIC) possibilitou mapear um elevado número de regiões genômicas (19 QRLs) associadas com resistência à antracnose foliar. Em alguns intervalos foram mapeados QRLs coincidentes para as diferentes formas de quantificação da doença bem como entre os ambientes de avaliação. A ausência de QRLs coincidentes nos diferentes ambientes de avaliação caracteriza a ocorrência da interação QRLs x ambientes, pois neste caso o QRL mapeado em determinado intervalo pode não se expressar em outro ambiente de avaliação (BEAVIS et al, 1994; LEE, 1995). É esperado uma maior precisão na estimativa dos efeitos dos QRLs através do MIC para vários ambientes de avaliação, uma vez que os valores fenotípicos das progênies nestes ambientes são considerados simultaneamente, sendo possível quantificar a interação QTLs x ambientes

(JIANG; ZENG, 1995). No presente trabalho foram detectados 6 QRLs coincidentes para os três ambientes de avaliação e para a maioria das formas de quantificação da severidade da doença, nos cromossomos 8, 9 e 10 do milho.

O número de QRLs mapeados neste trabalho foi consideravelmente superior ao relatado por Rezende (2004). A autora localizou duas regiões genômicas no cromossomo 10, explicando de 14,2 a 21,0 % da variação fenotípica para a resistência. Possivelmente o elevado número de QRLs mapeados no presente trabalho tenha sido em função do elevado contraste fenotípico em resistência entre as linhagens parentais, dos diferentes ambientes de avaliação, das múltiplas formas de avaliação da doença e ao mapa de ligação bem saturado com distância média entre as marcas de 11,4 cM.

Estudos sobre a localização/mapeamento de QRLs à antracnose foliar são extremamente escassos na literatura. Por outro lado, trabalhos de mapeamento de QRLs para a fase de podridão do colmo são mais frequentes, porém não conclusivos. A literatura indica grande divergência em relação ao número de genes que controlam a resistência à antracnose do colmo em milho. Carson e Hooker (1982) através da técnica da translocação recíproca mapearam genes ou blocos gênicos nos cromossomos 1, 4, 6 e 8. No entanto, Jung et al. (1994) utilizando o marcador molecular RFLP identificaram somente uma região genômica localizada no cromossomo 4, com forte associação a um QTL (*Quantitative Trait Loci*), responsável por mais de 50 % da variação fenotípica em resistência à antracnose do colmo. Matiello (2004) localizou sete regiões genômicas associadas à alelos de resistência nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os quais explicaram de 2,1 a 14,7 % da variação fenotípica para resistência à antracnose do colmo. Recentemente, Tasior (2014) mapeou QRLs à antracnose do colmo nos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, com coeficientes de regressão parciais de 15,4 a 83,6 %.

O conhecimento prévio dos diferentes QRLs já mapeados nos 10 cromossomos do milho possibilitou estabelecer possíveis relações entre os QRLs à antracnose foliar mapeados neste trabalho. Sendo assim, o QRL do intervalo E51308-E15174 do cromossomo 1, pode ser inferido tomando a posição do intervalo em relação ao marcador Bnlg1007, localizado no *bin* 1.02. A distância do intervalo ao marcador Bnlg1007 está entre 109 a 120,5 cM, o que representa aproximadamente 6 *bins*. Assim o QRL estaria localizado próximo ao *bin* 1.08, região onde já foram mapeados QRLs a podridão do colmo ocasionada por *Giberella zeae* (PÉ et al., 1993) e a *Cochliobolus heterostrophus* (BALINT-KURTI; CARSON, 2006).

A posição do QRL mapeado no cromossomo 2, intervalo E43680-E43112, pode ser direcionada em relação ao loco Bnlg125 (*bin* 2.02). A distância entre o intervalo e o Bnlg125

esta entre 68,7 a 82,8 cM, correspondendo a aproximadamente 4 *bins*, portanto é possível que este QRL esteja próximo ao *bin* 2.06. Nesta região já foram mapeados QRLs para importantes doenças foliares como *Exserohilum turcicum* (WELZ et al., 1999a) e *Cercospora zea-maydis* (LEHMENSIEK et al., 2001; SAGHAI-MAROOF et al., 1996). Adicionalmente, nesta região Morello (2000) encontrou polimorfismo molecular próximo ao gene *Rcg1*, que confere resistência à antracnose foliar. Fortes evidências indicam que o *Rcg1* esteja localizado no braço longo do cromossomo 2. Esta região foi amplificada com o *primer* microssatélite nc003 (2.06) e, na análise de ligação Morello (2000) relatou que o nc003 estava co-localizado a 31,9 cM do *Rcg1*.

No cromossomo 4, para inferir a posição aproximada do QRL do intervalo E5973-E2284, foi tomada a posição deste intervalo em relação ao loco Umc1511 (*bin* 4.05). Os marcadores deste intervalo estão a 72,8 e 53,3 cM, representando aproximadamente 3 a 4 *bins*. De acordo com estas relações, este QRL pode estar localizado próximo ao *bin* 4.01/4.02. No cromossomo 4 foram mapeados QRLs as podridões de colmo ocasionadas por *Giberella zea* no *bin* 4.01 (PÉ et al., 1993) e por *Colletotrichum graminicola* próximo ao *bin* 4.08 (JUNG et al., 1994; TASIOR, 2014), bem como para lesões foliares causadas por *Phaeosphaeria maydis* (LOPES, 2003; MOREIRA; BENTO; SOUZA JÚNIOR, 2009) e por *Cercospora zea-maydis* (LEHMENSIEK et al., 2001). Adicionalmente, o QRL localizado no intervalo Umc1511-E56434 possivelmente está próximo aos *bins* 4.05 ou 4.06, regiões genômicas conhecidas para QRLs a cercosporiose (BUBECK et al., 1993) e helmintosporiose em milho (WELZ et al., 1999b).

O QRL do intervalo E5494-E55248 está a uma distância de 33,4 a 50,2 cM para o loco microssatélite Phi015 (8.03), próximo aos *bin* 8.05/8.06. A região do cromossomo 8 que compreende estes *bins* é conhecida por estar associada com QRLs e genes de resistência à diversos patógenos em milho. QRLs nesta região foram mapeados em diferentes populações para resistência a *Exserohilum turcicum* (FREYMARK et al., 1993; SCHECHERT; WELZ; GEIGER, 1999; WELZ et al., 1999a, b; ZWONITZER et al., 2010), *Cochliobolus heterostrophus* (BALINT-KURTI et al., 2008; BUBECK, 1992), *Cercospora zea-maydis* (BUBECK et al., 1993; CLEMENTS; DUDLEY; WHITE, 2000; MAROOF et al., 1996), *Puccinia sorghi* (BROWN; JUVIK; PATAKY, 2001; KERNS; DUDLEY; RUFENER, 1999), *Ustilago maydis* (LÜEBBERSTEDT; KLEIN; MELCHINGER, 1998), ao vírus da listra do milho (PERNET et al., 1999) e ao acúmulo de aflatoxina em espigas causada por *Aspergillus flavus* (PAUL et al., 2003).

No cromossomo 9, o QRL mapeado no intervalo entre os marcadores E51562-E5197, está a uma distância de 32,0 a 63,3 cM do marcador Phi065 (9.03). Assim este QRL estaria localizado ao redor dos *bins* 9.05/9.06. Neste *bin* foram mapeados QRLs para *Exserohilum turcicum* (BROWN; JUVIK; PATAKY, 2001; FREYMARK et al., 1993; OGLIARI 1999) e nas regiões 9.03/9.04 QRLs para *Cochliobolus heterostrophus* (BALINT-KURTI et al., 2006; ZWONITZER et al., 2010).

O QRL do intervalo E514698-E58207 no cromossomo 10 tem como referência o SSR Umc1084 (10.07). A distância do intervalo para o SSR é de 133 e 163,4 cM, o que representa aproximadamente 6 *bins*. Portanto, o QRL possivelmente encontra-se próximo ao *bin* 10.01, região onde foram mapeados QRLs para a ferrugem comum (KERNS; DUDLEY; RUFENER, 1999). No *bin* 10.02 Rezende (2004) localizou um QRL para a antracnose foliar no milho. O QRL identificado no intervalo E5876-Umc1084 (10.07) indica que ele está próximo, ou no mesmo *bin* 10.07 daquele mapeado por Rezende (2004). Como nesta região não existem relatos de outros QRLs, possivelmente o loco de resistência do *bin* 10.07 seja específico para a antracnose foliar em milho. Adicionalmente, neste cromossomo, foram detectados outros locos de resistência como no *bin* 10.05/10.06 a ferrugem comum (LÜEBBERSTEDT; KLEIN; MELCHINGER, 1998), a cercosporiose (BUBECK et al., 1993) e a podridão do colmo causada por *Giberella zea* no 10.05 (PÉ et al., 1993).

Para utilizar com eficiência um esquema de seleção assistida por marcadores moleculares num programa de melhoramento, é necessário dispor de marcadores fortemente associados com os QRLs de interesse, efeito pronunciado na expressão fenotípica e principalmente estáveis para os ambientes/épocas de avaliação. No presente trabalho foram mapeados 6 QRLs estáveis para os ambientes e formas de quantificação da severidade da doença, sendo eles identificados nos intervalos E5494-E55248 (cromossomo 8), E51562-E5197 (cromossomo 9), E58117-E514698, E514698-E58207, E55118-E2381 e E5876-Umc1084 (cromossomo 10). Estes QRLs podem ser bons candidatos para esquemas de seleção assistida, pois foram mais estáveis nos diferentes ambientes de avaliação e responsáveis por grande parte da variação fenotípica em resistência à antracnose foliar na população de mapeamento.

As populações de milho originárias em germoplasma tropical têm ampla base genética quando comparadas com aquelas de origem temperada (LANZA et al., 1997). Além disso, as áreas de cultivo tropicais são mais propensas a estresses ambientais que as de clima temperado (RIBAUT; JIANG; GONZALEZ-DE-LEON, 1997). Dessa forma, o mapeamento de QRLs em genótipos de origem tropical possibilitou identificar novas regiões genômicas e

alelos de resistência que possivelmente ainda não sejam conhecidos da comunidade científica. Assim os resultados alcançados neste trabalho com o mapeamento de alelos de resistência à antracnose foliar foram de extrema importância para o entendimento da base genética da resistência de milho tropical à antracnose foliar. O grande número de QRLs mapeados nesta população segregante confirma o padrão de herança quantitativa da resistência de milho à antracnose foliar causada por *Colletotrichum graminicola*.

TABELA 6 – Distribuição dos locos microssatélites polimórficos e monomórficos entre as linhagens parentais L04-2 e L95-1, bem como o número de locos sem distorção de segregação nos grupos de ligação do mapa consenso de milho. Ponta Grossa, 2014.

Loco SSR	Grupos de Ligação/Cromossomo										Total	%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Polimórfico	2	2	4	4	3	3	2	4	3	2	29	33
Monomórfico	5	3	11	7	6	7	3	7	2	8	59	67
Segregação Esperada	2	1	2	2	1	1	2	1	3	2	17	58,6
Total	7	5	15	11	9	10	5	11	5	10	88	100

TABELA 7 – Locos SSR polimórficos genotipados na população de mapeamento L04-2 x L95-1. Ponta Grossa, 2014.

SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin
Bnlg1007 *	1.02	Bnlg490 *	4.04	Phi452693	6.04	Umc2084 *	9.01
Bnlg131 *	1.11	Umc1511 *	4.05	Mmc0241 *	6.05	Phi065 *	9.03
Bnlg125	2.02	Bnlg1621	4.06	Bnlg1292 *	7.01	Phi027 *	9.03
Phi101049 *	2.10	Bnlg1337	4.11	Umc1799 *	7.06	Umc1319 *	10.01
Umc1025	3.04	Bnlg557 *	5.03	Phi115 *	8.03	Umc1084 *	10.07
Bnlg602 *	3.04	Umc1348	5.05	Bnlg1176	8.05		
Umc1030 *	3.04	Umc1829	5.09	Bnlg240	8.06		
Bnlg197	3.06	Phi077	6.01	Phi015	8.08		

* Locos SSR com segregação mendeliana esperada (1:2:1).

TABELA 8 - Número total de fragmentos amplificados (monomórfico e polimórfico) e porcentagem de polimorfismo para 19 combinações de *primers* *EcoRI* + *MseI* genotipadas na população de mapeamento. Ponta Grossa, 2014.

Nº	Código <i>Primer</i>	Combinação <i>EcoRI</i> + <i>MseI</i>	Fragmentos	Monomórfico	Polimórfico	Polimorfismo (%)
1	E1M2	E-AGT/M-CCA	54	36	18	33,3
2	E1M4	E-AGT/M-CTC	65	41	24	36,9
3	E1M5	E-AGT/M-CAT	61	42	19	31,1
4	E2M2	E-ATC/M-CCA	67	43	24	35,8
5	E2M3	E-ATC/M-CGC	45	34	11	24,4
6	E3M2	E-AGC/M-CCA	49	32	17	34,7
7	E3M4	E-AGC/M-CTC	62	44	18	29,0
8	E3M5	E-AGC/M-CAT	61	44	17	27,9
9	E4M3	E-ACA/M-CGC	79	61	18	22,8
10	E4M4	E-ACA/M-CTC	65	47	18	27,7
11	E4M5	E-ACA/M-CAT	58	38	20	34,5
12	E5M1	E-AAC/M-CAC	65	35	30	46,2
13	E5M2	E-AAC/M-CCA	72	45	27	37,5
14	E5M4	E-AAC/M-CTC	61	39	22	36,1
15	E5M5	E-AAC/M-CAT	63	37	26	41,3
16	E5M6	E-AAC/M-CCG	47	27	20	42,6
17	E5M8	E-AAC/M-CTA	54	27	27	50,0
18	E5M9	E-AAC/M-CCC	42	34	08	19,0
19	E5M14	E-AAC/M-CAG	61	41	20	32,8
Total			1131	747	384	34,0

TABELA 9 – Combinações de *primers* *EcoRI* + *MseI* selecionadas a partir da presença de polimorfismo entre os bulks de DNA pela análise BSA. Ponta Grossa, 2014.

Combinação de primers <i>EcoRI</i> + <i>MseI</i>	Fragmento/ Marcador	Polimorfismo do Bulk
E1M2 = E-AGT/M-CCA	E1271	Resistência – BR
E1M4 = E-AGT/M-CTC	E1499	Resistência – BR
E1M5 = E-AGT/M-CAT	E15205	Suscetibilidade – BS
	E15127	Resistência – BR
E2M2 = E-ATC/M-CCA	E22237	Resistência – BR
	E22118	Resistência – BR
	E22111	Suscetibilidade – BS
E2M3 = E-ATC/M-CGC	E23208	Resistência – BR
E3M2 = E-AGC/M-CCA	E3287	Resistência – BR
E3M4 = E-AGC/M-CTC	E3484	Suscetibilidade – BS
E3M5 = E-AGC/M-CAT	E3580	Suscetibilidade – BS
E4M3 = E-ACA/M-CGC	E43174	Suscetibilidade – BS
E4M4 = E-ACA/M-CTC	E44337	Resistência – BR
	E44122	Resistência – BR
E4M5 = E-ACA/M-CAT	E45105	Resistência – BR
	E51291	Suscetibilidade – BS
E5M1 = E-AAC/M-CAC	E51177	Resistência – BR
	E51122	Resistência – BR
	E52123	Resistência – BR
E5M4 = E-AAC/M-CTC	E5497	Resistência – BR
E5M5 = E-AAC/M-CAT	E55343	Resistência – BR
	E55100	Resistência – BR
E5M6 = E-AAC/M-CCG	E56154	Resistência – BR
	E56115	Resistência – BR
E5M8 = E-AAC/M-CTA	E58353	Resistência – BR
	E58132	Suscetibilidade – BS
E5M9 = E-AAC/M-CCC	E5979	Resistência – BR
E5M14 = E-AAC/M-CAG	E5486	Resistência – BR

BR = associação com resistência e BS = associação com suscetibilidade à antracnose foliar em milho.

TABELA 10 – Resultados da análise de ligação dos marcadores SSRs e AFLPs na construção do mapa genético da população F₂. Número de marcas agrupadas, ordenadas, comprimento dos grupos de ligação (cM) e distância média entre marcas (DM). Ponta Grossa, 2014.

Grupo de Ligação/Cromossomo	Agrupadas	Ordenadas	Comprimento (cM)	DM (cM)
1	22	16	189,4	11,8
2	22	13	141,7	10,9
3	19	15	120,0	8,0
4	31	20	198,0	9,9
5	24	20	244,3	12,2
6	22	16	179,7	11,2
7	20	12	119,7	10,0
8	17	10	107,5	10,8
9	20	18	218,1	12,1
10	15	11	191,7	17,4
Não agrupadas	12	-	-	-
Não Ordenadas	-	61	-	-
Total	224	151	1710,1	11,4

TABELA 11 – Resumo das análises de regressão linear múltipla para os alelos associados à QRLs à antracnose foliar no 1º experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F	R ² parcial	Cromossomo	Origem AFLP	Fase de Ligação ¹
1ª Avaliação						
E56386	- 0,11057	15,04**	0,1728	8	PR	A
E55139	- 0,20224	9,59**	0,0667	5	PR	A
E51177	- 0,09396	7,41**	0,0584	-	PR	A
E34165	- 0,24909	5,92*	0,0278	6	PR	A
Phi452693	- 0,03680	7,53**	0,0321	6	-	A
E58417	- 0,16168	7,41**	0,0312	1	PR	A
R ² do modelo = 0,389						
2ª Avaliação						
E55139	- 0,30727	17,16**	0,1925	5	PR	A
E56386	- 0,19985	14,02**	0,1331	8	PR	A
E54250	- 0,23085	6,69*	0,0440	4	PR	A
E15391	- 0,20923	8,27**	0,0491	-	PS	R
E1487	- 0,24551	9,50**	0,0501	-	PR	A
E22237	- 0,31984	13,31**	0,0591	2	PR	A
Bnlg1292	- 0,05664	10,44**	0,0301	7	-	A
R ² do modelo = 0,558						
3ª Avaliação						
E56386	- 0,34806	20,05**	0,2178	8	PR	A
E58222	- 0,40176	14,33**	0,1314	6	PR	A
E44114	- 0,19004	14,21**	0,0943	-	PR	A
E14249	- 0,21197	9,50**	0,0561	-	PR	A
E54250	- 0,12106	11,26**	0,0518	4	PR	A
E58190	- 0,18037	10,68**	0,0392	-	PR	A
E45200	- 0,23004	8,85**	0,0235	-	PR	A
Bnlg1337	- 0,01972	5,81*	0,0143	4	-	A
R ² do modelo = 0,628						
Área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD						
E56386	- 2,66514	18,17**	0,2015	8	PR	A
E55139	- 9,20291	12,03**	0,1157	5	PR	A
E54250	- 9,28120	7,60**	0,0491	4	PR	A
E1487	- 3,22374	8,40**	0,0490	-	PR	A
E22237	- 5,63733	11,48**	0,0579	2	PR	A
E15391	- 7,46822	13,49**	0,0572	-	PS	R
Umc1511	- 3,25798	10,32**	0,0324	4	-	A
E43680	- 3,62444	14,78**	0,0300	2	PR	A
R ² do modelo = 0,592						

*, ** significativo a $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente. ¹ Fase de ligação entre o alelo marcador do PR e alelo de resistência no QRL, (A) fase de atração e (R) fase de repulsão.

TABELA 12 – Resumo das análises de regressão linear múltipla para os alelos associados à QRLs à antracnose foliar no 2º experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F	R ² parcial	Cromossomo	Origem AFLP	Fase de Ligação ¹
1ª Avaliação						
E55139	- 0,41046	27,74**	0,2781	5	PR	A
E56386	- 0,29269	15,91**	0,1322	8	PR	A
E22237	- 0,22608	9,03**	0,0674	2	PR	A
E52307	- 0,15722	5,73*	0,0273	-	PR	A
E59216	- 0,14873	4,64*	0,0195	4	PR	A
Umc1319	- 0,07408	5,88*	0,0229	10	-	A
E54138	- 0,08968	7,04*	0,0209	9	PR	A
R ² do modelo = 0,568						
2ª Avaliação						
E55139	- 0,40355	32,68**	0,3122	5	PR	A
E56386	- 0,20906	10,33**	0,0874	8	PR	A
E43680	- 0,23783	10,63**	0,0711	2	PR	A
E59138	- 0,17671	7,86**	0,0417	4	PR	A
E52106	- 0,20563	12,80**	0,0472	1	PR	A
E54160	- 0,10096	9,73**	0,0284	-	PR	A
E15391	- 0,22394	8,61**	0,0162	-	PS	R
R ² do modelo = 0,604						
3ª Avaliação						
E55139	- 0,29255	21,44**	0,2294	5	PR	A
E56386	- 0,11631	15,79**	0,1402	8	PR	A
E22237	- 0,36313	8,04**	0,0443	2	PR	A
E43326	- 0,10644	7,62**	0,0348	-	PS	R
E15391	- 0,25441	9,88**	0,0397	-	PS	R
E44114	- 0,17547	8,43**	0,0303	-	PR	A
E43134	- 0,22706	8,87**	0,0284	-	PR	A
Bnlg125	- 0,10414	11,46**	0,0263	2	-	A
R ² do modelo = 0,573						
Área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD						
E55139	- 5,47977	32,82**	0,3131	5	PR	A
E56386	- 7,95401	15,26**	0,1215	8	PR	A
E59138	- 7,36998	7,65**	0,0443	4	PR	A
E43680	- 2,72652	8,98**	0,0466	2	PR	A
E54250	- 10,85143	8,16**	0,0352	4	PR	A
Umc2084	- 4,83885	6,99**	0,0276	9	-	A
E5585	- 3,90788	8,79**	0,0282	-	PR	A
E1481	- 0,77127	6,35*	0,0142	-	PS	R
R ² do modelo = 0,630						

*, ** significativo a $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente. ¹ Fase de ligação entre o alelo marcador do PR e alelo de resistência no QRL, (A) fase de atração e (R) fase de repulsão.

TABELA 13 – Resumo das análises de regressão linear múltipla para os alelos associados à QRLs à antracnose foliar no 3º experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F	R ² parcial	Cromossomo	Origem AFPL	Fase de Ligação ¹
1ª Avaliação						
E55139	- 0,48842	13,38**	0,1567	5	PR	A
E56386	- 0,11301	8,18**	0,0612	8	PR	A
E52154	- 0,06691	8,23**	0,0404	-	PS	R
E2277	- 0,13333	7,55**	0,0336	-	PR	A
E15238	- 0,19672	7,35**	0,0226	-	PR	A
Umc2084	- 0,02996	6,11*	0,0137	9	-	A
R ² do modelo = 0,328						
2ª Avaliação						
E14211	- 0,08269	7,10**	0,0655	-	PS	R
E4486	- 0,14937	6,86*	0,0583	8	PR	A
Phi115	- 0,07318	8,42*	0,0536	8	-	A
E5587	- 0,22397	9,41**	0,0349	-	PR	A
Bnlg240	- 0,04993	7,41**	0,0249	8	-	A
E54250	- 0,17256	7,59**	0,0239	4	PR	A
E45518	- 0,12380	5,52*	0,0161	-	PR	A
R ² do modelo = 0,277						
3ª Avaliação						
E55139	- 0,28236	11,36**	0,1363	5	PR	A
E56386	- 0,15228	8,65**	0,0938	8	PR	A
E35279	- 0,16501	9,02**	0,0879	-	PS	R
E58222	- 0,21500	7,19**	0,0545	6	PR	A
E51490	- 0,27045	6,16*	0,0396	-	PR	A
E22359	- 0,19327	5,88*	0,0281	-	PS	R
E22147	- 0,19693	5,60*	0,0208	-	PR	A
E514284	- 0,21661	9,09**	0,0259	1	PR	A
E52154	- 0,12549	10,49**	0,0202	-	PS	R
R ² do modelo = 0,507						
Área abaixo da curva de progresso da doença – AACPD						
E55139	- 14,65049	12,29**	0,1485	5	PR	A
E56386	- 8,60439	9,35**	0,0994	8	PR	A
E35276	- 5,54381	7,09**	0,0428	-	PS	R
Umc1348	- 2,87565	6,54*	0,0337	5	-	A
E5294	- 5,21100	7,93**	0,0238	-	PS	R
R ² do modelo = 0,348						

*, ** significativo a $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente. ¹ Fase de ligação entre o alelo marcador do PR e alelo de resistência no QRL, (A) fase de atração e (R) fase de repulsão.

TABELA 14 – Número de marcadores associados pela análise de regressão linear múltipla à QRLs à antracnose foliar para a 1ª, 2ª, 3ª avaliação e para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Ponta Grossa, 2014.

Combinação de primers <i>EcoRI</i> + <i>MseI</i>	Avaliação			AACPD	TOTAL
	1ª	2ª	3ª		
E1M2 = E-AGT/M-CCA	0	0	0	0	0
E1M4 = E-AGT/M-CTC	0	2	1	2	5
E1M5 = E-AGT/M-CAT	1	1	1	1	4
E2M2 = E-ATC/M-CCA	2	1	3	1	7
E2M3 = E-ATC/M-CGC	0	0	0	0	0
E3M2 = E-AGC/M-CCA	0	0	0	0	0
E3M4 = E-AGC/M-CTC	1	0	0	0	1
E3M5 = E-AGC/M-CAT	0	0	1	1	2
E4M3 = E-ACA/M-CGC	0	1	2	1	4
E4M4 = E-ACA/M-CTC	0	1	2	0	3
E4M5 = E-ACA/M-CAT	0	1	1	0	2
E5M1 = E-AAC/M-CAC	1	0	0	0	1
E5M2 = E-AAC/M-CCA	2	1	1	1	5
E5M4 = E-AAC/M-CTC	1	2	1	1	5
E5M5 = E-AAC/M-CAT	1	2	1	2	6
E5M6 = E-AAC/M-CCG	1	1	1	1	4
E5M8 = E-AAC/M-CTA	1	0	2	0	3
E5M9 = E-AAC/M-CCC	1	1	0	1	3
E5M14 = E-AAC/M-CAG	0	0	2	0	2
TOTAL	12	14	19	12	57

TABELA 15 – Posição, LOD score e proporção da variação fenotípica explicada pelos QRLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. Ponta Grossa, 2014. (continua)

GL	Intervalo Marcadores			1º Experimento				2º Experimento				3º Experimento			
				A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD
1	E51308 177,9	E15174 189,4	LOD						31,3				15,3		
			Pos						184,7				179,1		
			R ²						90,6				89,7		
			a						- 0,55				- 0,55		
			d						- 0,55				- 0,55		
2	E43680 0,0	E43112 14,1	LOD	31,6											
			Pos	4,0											
			R ²	94,1											
			a	0,52											
			d	- 0,52											
3	E12162 0,0	E1576 7,6	LOD						18,4						
			Pos						3,2						
			R ²						90,6						
			a						0,55						
			d						- 0,55						
3	E51167 51,0	E58104 61,4	LOD						11,5						
			Pos						58,1						
			R ²						75,0						
			a						0,49						
			d						- 0,64						
4	E4487 0,0	E54185 10,4	LOD	10,8		10,7									
			Pos	2,5		3,9									
			R ²	70,3		71,7									
			a	0,41		0,35									
			d	- 0,66		- 0,79									
4	E5973 15,3	E2284 34,8	LOD			21,6							18,6		
			Pos			24,2							26,5		
			R ²			90,6							89,7		
			a			0,07							0,55		
			d			- 1,07							- 0,55		

TABELA 15 – Posição, LOD score e proporção da variação fenotípica explicada pelos QRLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. Ponta Grossa, 2014. (continuação)

GL	Intervalo Marcadores			1º Experimento				2º Experimento				3º Experimento			
				A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD
4	Umc1511 88,1	E56434 119,3	LOD Pos R ² a d						32,3 105,2 90,6 0,55 - 0,55						
4	E56434 119,3	E22135 137,7	LOD Pos R ² a d			24,8 126,7 90,4 0,06 -1,06									
5	E51532 242,0	E55139 244,3	LOD Pos R ² a d						7,3 242,9 61,8 - 0,50 - 0,68						
8	E4480 0,0	E55100 23,9	LOD Pos R ² a d	15,0 4,0 72,6 - 0,45 - 0,61					17,2 4,0 74,8 - 0,50 - 0,63				8,2 16,0 67,5 - 0,44 - 0,72		
8	E5494 57,3	E55248 74,1	LOD Pos R ² a d	43,1 60,0 94,0 0,52 - 0,52		8,0 58,0 72,5 0,46 - 0,66	5,6 60,1 52,2 15,79 - 16,66		29,8 65,2 90,6 0,55 - 0,55				8,8 57,2 69,1 0,46 - 0,70	4,5 72,8 23,4 1,60 - 1,65	8,8 68,8 50,9 22,64 -23,22
8	E4486 85,5	Phi015 107,5	LOD Pos R ² a d									36,5 92,7 87,5 - 0,49 0,50			

TABELA 15 – Posição, LOD score e proporção da variação fenotípica explicada pelos QRLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. Ponta Grossa, 2014. (continuação)

GL	Intervalo Marcadores			1º Experimento				2º Experimento				3º Experimento			
				A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD
9	E51562 126,4	E5197 157,7	LOD	2,8			2,9		6,2		3,9		2,8	6,1	7,7
			Pos	132,2			132,4		147,2		132,2		147,6	132,4	132,2
			R ²	18,0			27,7		32,8		33,8		33,0	34,0	33,8
			a	- 0,90			- 19,90		- 0,92		- 20,68		- 0,91	- 1,35	- 26,79
			d	- 0,93			- 22,19		- 0,89		- 24,08		- 0,79	- 1,45	- 27,87
9	E52314 179,1	E43174 201,1	LOD						5,8						6,24
			Pos						187,1						194,2
			R ²						32,8						37,8
			a						0,92						28,0
			d						- 0,94						- 29,46
10	E58117 0,0	E514698 28,3	LOD	38,0		3,9	5,3				5,1		4,8	7,1	11,1
			Pos	13,9		14,5	14,3				14,1		21,2	11,7	13,9
			R ²	94,1		30,7	36,1				37,7		35,0	40,8	50,7
			a	0,52		0,86	19,62				19,85		0,86	1,45	23,09
			d	- 0,52		- 0,87	- 21,54				- 21,99		- 0,98	- 1,11	- 23,28
10	E514698 28,3	E58207 58,7	LOD	39,7		3,9	5,5				5,6		4,9	7,0	11,1
			Pos	43,8		43,1	44,2				44,4		41,4	47,2	43,2
			R ²	94,1		30,8	39,4				41,5		34,9	41,4	50,8
			a	0,52		0,85	19,0				19,7		0,85	1,45	23,18
			d	- 0,52		- 0,88	- 20,15				- 20,7		- 0,97	- 1,10	- 22,73
10	E55118 85,4	E2381 109,1	LOD			2,6	3,9				3,7		3,6		9,8
			Pos			98,5	98,7				98,5		99,1		98,9
			R ²			29,6	35,0				33,0		33,1		52,1
			a			- 0,86	- 20,2				- 20,61		- 0,89		- 24,01
			d			- 0,92	- 20,0				- 21,44		- 0,89		- 20,86
10	E2381 109,1	E514386 124,7	LOD	2,9											
			Pos	116,6											
			R ²	18,5											
			a	- 0,92											
			d	0,85											

TABELA 15 – Posição, LOD score e proporção da variação fenotípica explicada pelos QRLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. Ponta Grossa, 2014. (conclusão)

GL	Intervalo Marcadores			1º Experimento				2º Experimento				3º Experimento			
				A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD	A1	A2	A3	AACPD
10	E5876	Umc1084	LOD	45,1		18,5	7,3		33,4		7,7		18,36	6,0	9,6
	161,6	191,7	Pos	171,3		174,3	167,5		171,4		167,5		173,1	163,2	166,7
			R ²	94,1		90,0	48,3		90,6		49,1		89,7	35,3	54,3
			a	0,52		0,55	17,6		0,55		18,16		0,55	1,42	20,35
			d	- 0,52		- 0,55	- 17,5		- 0,55		- 19,49		- 0,55	- 1,25	- 19,41
Nº de Intervalos				9	0	8	6	0	10	0	5	1	9	5	7

GL: grupo de ligação = cromossomo.

A1 (1ª avaliação), A2 (2ª avaliação), A3 (3ª avaliação) e AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença).

Pos: posição em centimorgans (Haldane) do QRL a partir do início do grupo de ligação.

LOD: LOD score que sustenta a posição do QRL.

R²: proporção da variação fenotípica explicada pelo QRL na posição considerando H3 ($a \neq 0$, $d \neq 0$) em relação a H0 ($a = 0$, $d = 0$) a variância residual estimada a partir de H0.

a: estimativa do efeito aditivo do QRL sob H3.

d: estimativa do efeito dos desvios de dominância sob H3.

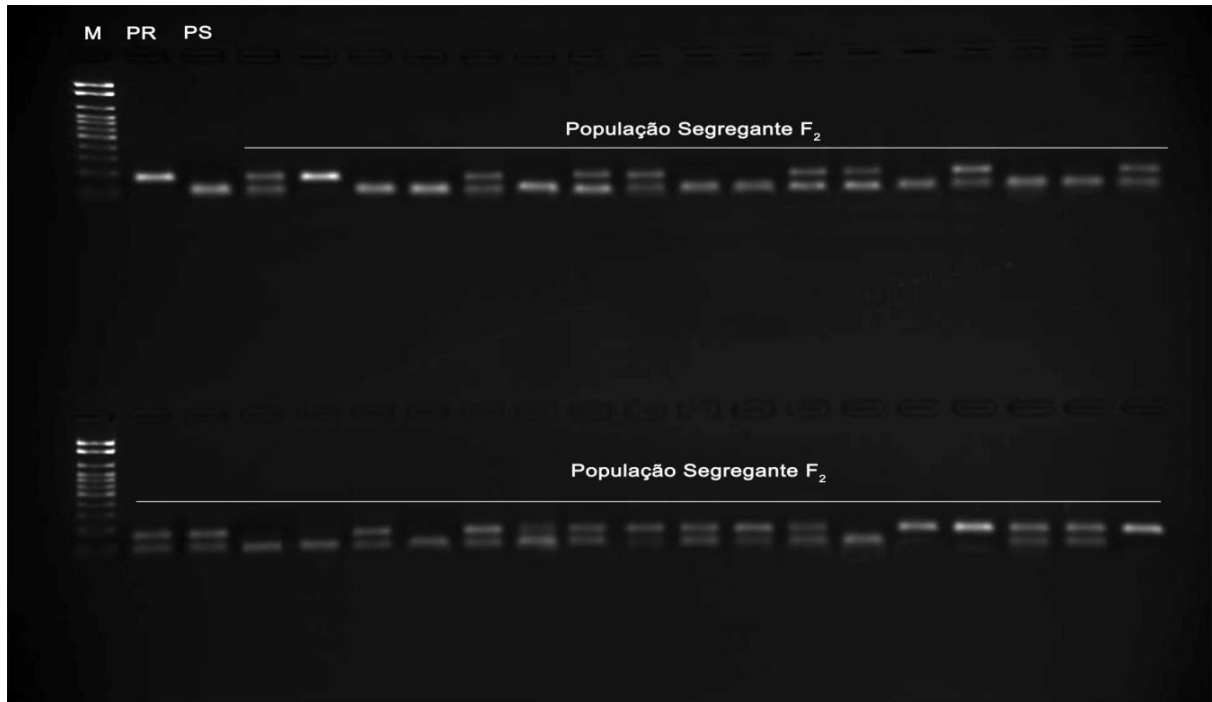


FIGURA 5 – Gel de agarose (2%). Visualização da genotipagem em parte dos indivíduos da população segregante F₂ com o *primer* SSR Umc1511. M= marcador molecular 100pb, PR= parental resistente, PS= parental suscetível. Ponta Grossa, 2014.

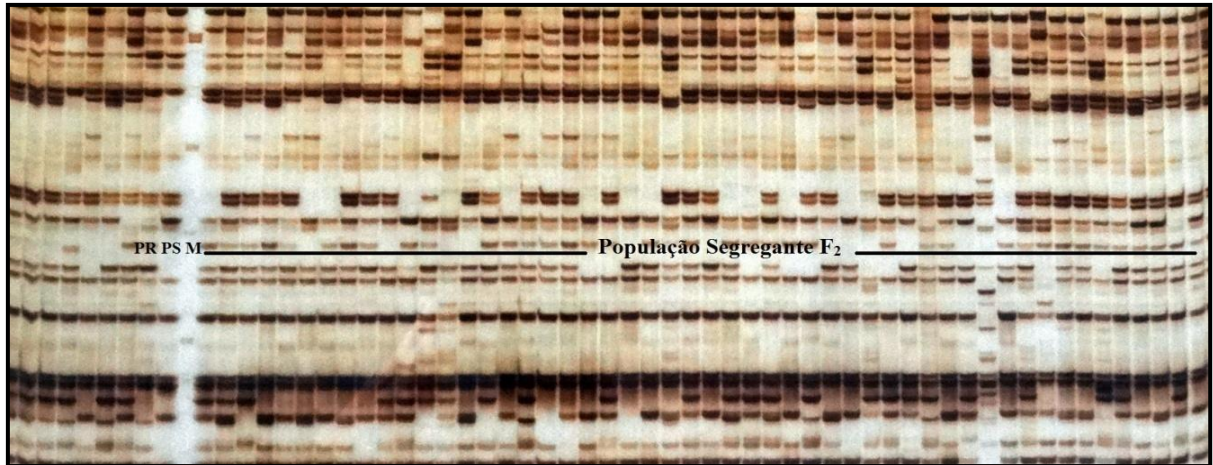


FIGURA 6 - Padrão de amplificação da combinação de *primers* E5M14 (E-AAC/M-CAG). O gel de AFLP demonstra a segregação de alguns fragmentos polimórficos (presença ou ausência) genotipados em parte dos indivíduos da população segregante. M= marcador molecular 50pb, PR= parental resistente, PS= parental suscetível. Ponta Grossa, 2014.

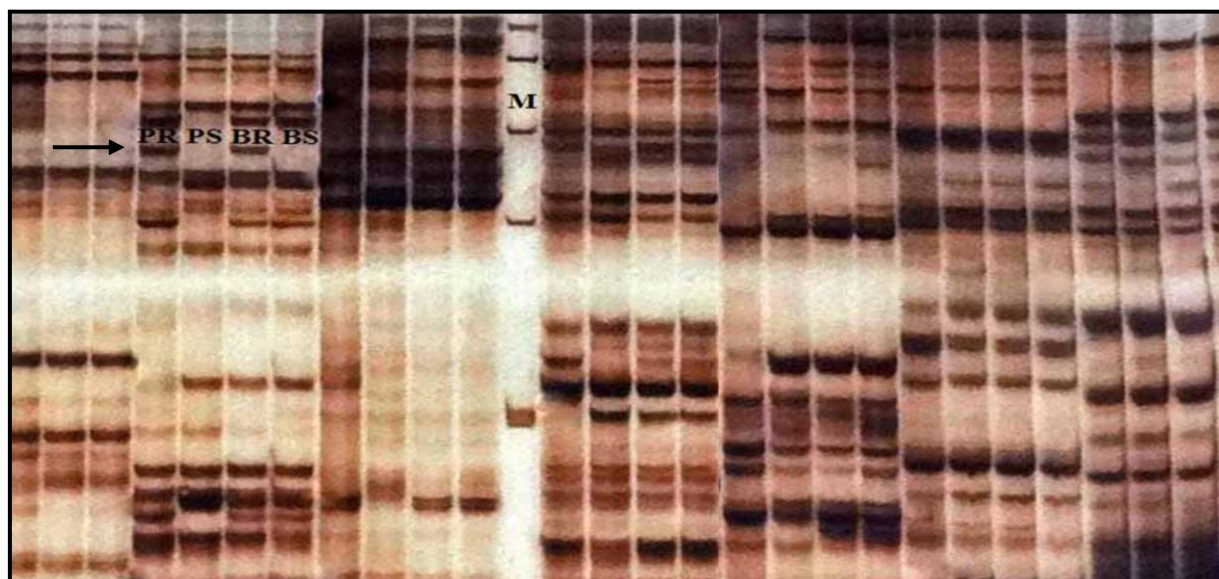


FIGURA 7 - Visualização de parte de um gel de poliacrilamida (6%) para algumas combinações de *primers* *EcoRI* + *MseI*. A seta indica o fragmento AFLP E58353 (353pb) da combinação E5M8 (E-AAC/M-CTA) possivelmente associado à QRL pela metodologia BSA. PR= parental resistente, PS= parental suscetível. BR/BS = bulks de DNA (resistente e suscetível) dos três experimentos. Ponta Grossa, 2014.

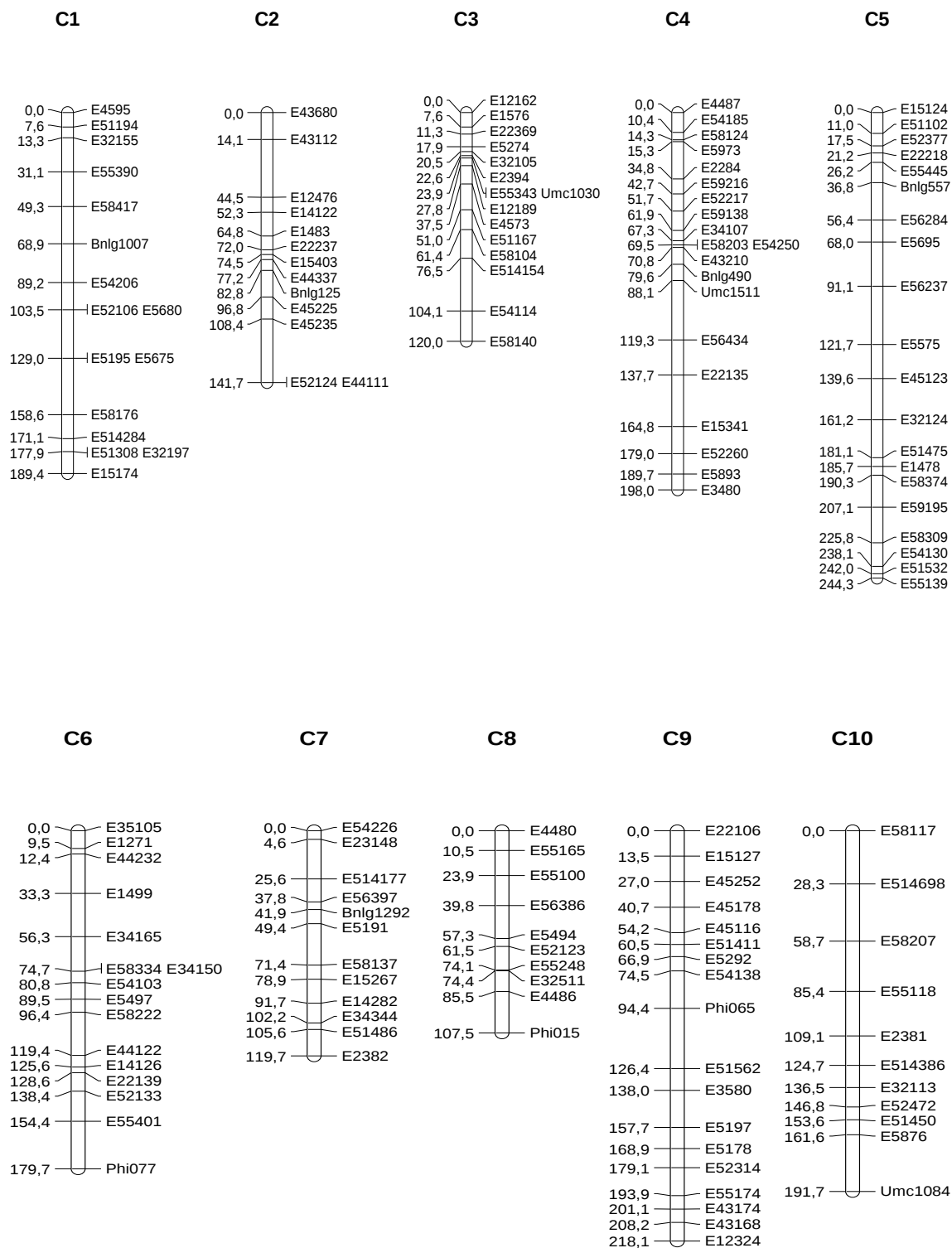


FIGURA 8 – Mapa genético gerado pelos marcadores SSRs e AFLPs. À direita estão os locos marcadores (SSR e/ou AFLP) e a esquerda as distâncias em cM segundo a função de mapeamento de Haldane. Ponta Grossa, 2014.

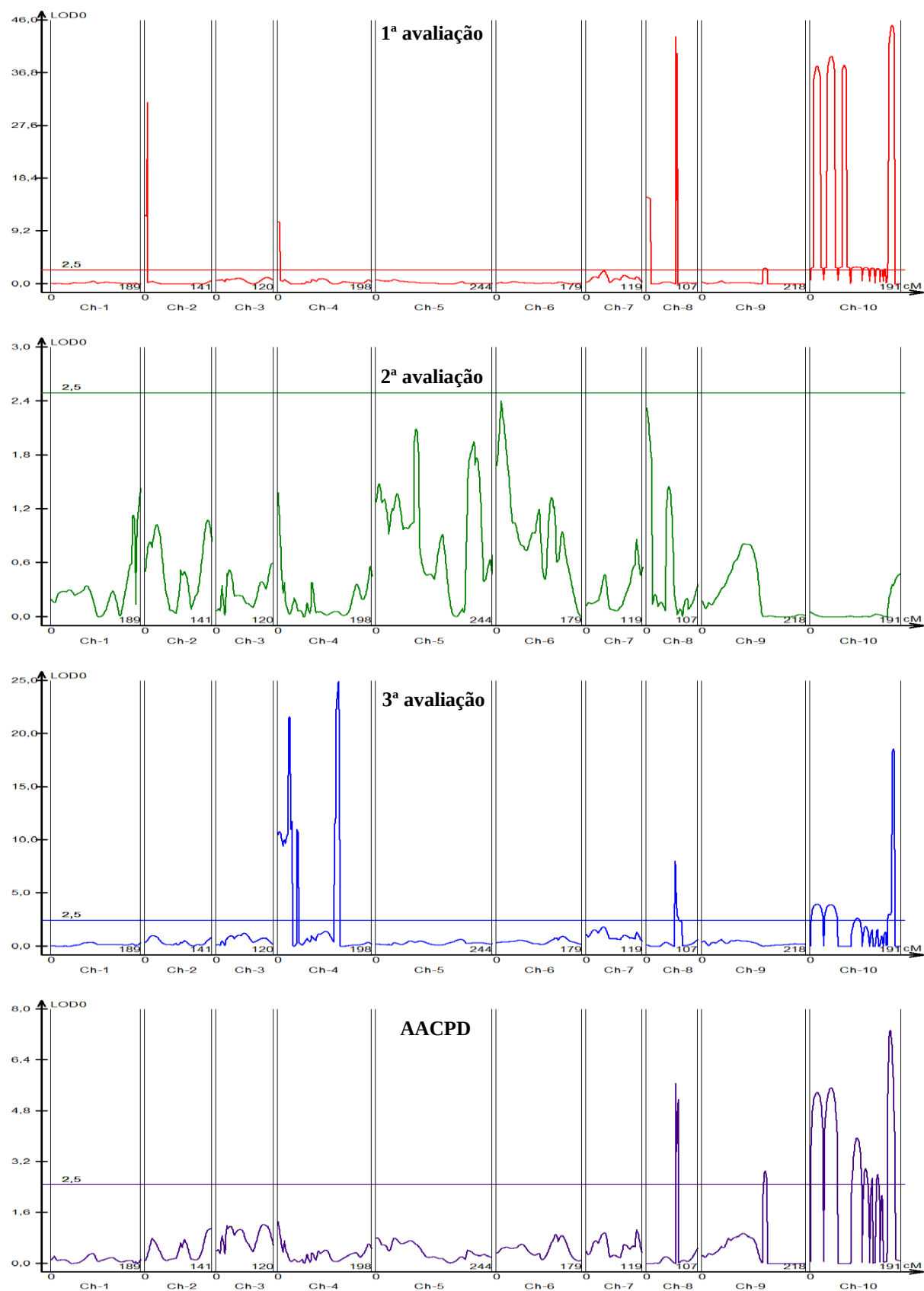


Figura 9 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs à antracnose foliar nas três avaliações pontuais e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no 1º experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abscissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

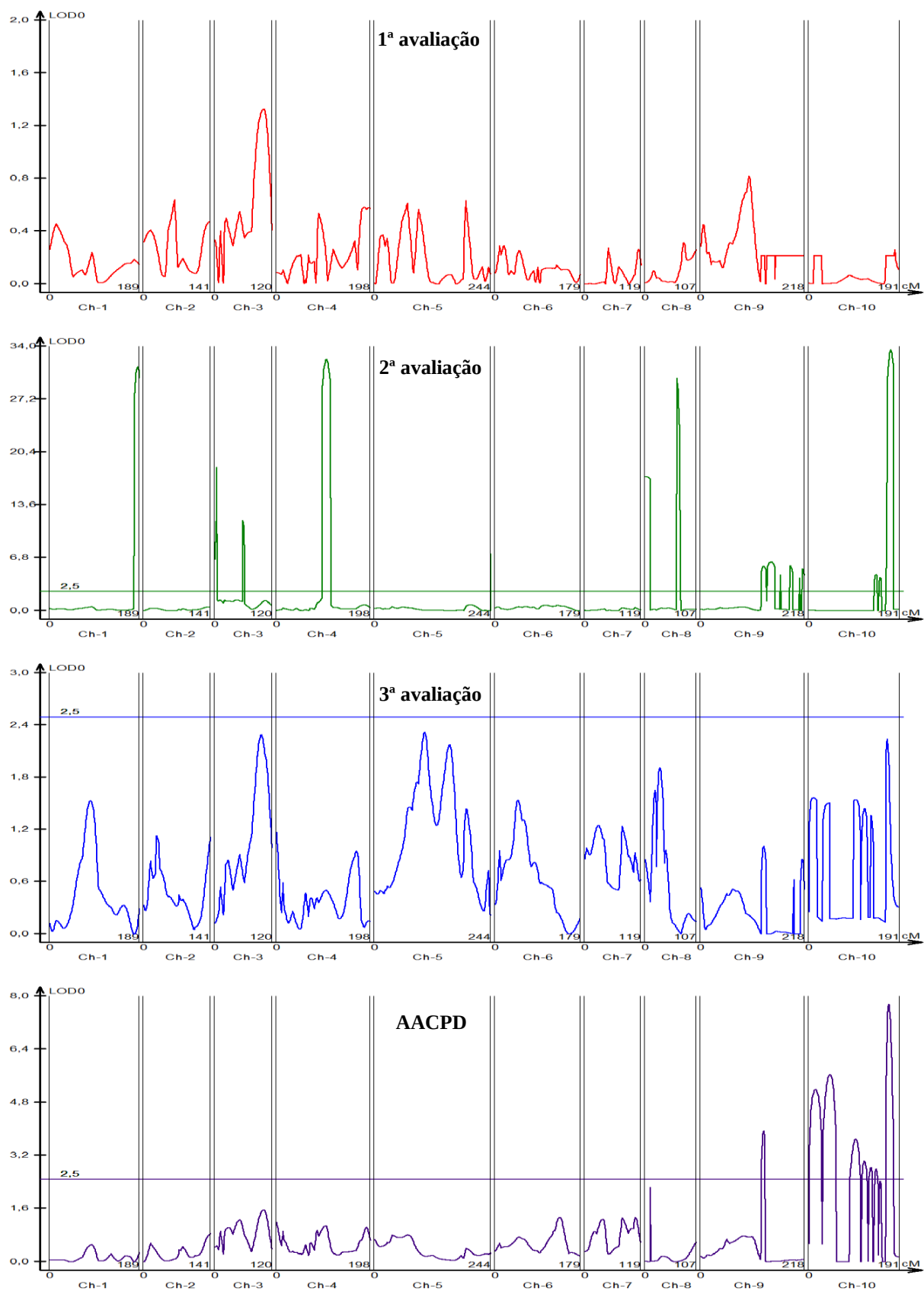


Figura 10 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs à antracnose foliar nas três avaliações pontuais e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no 2º experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abscissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

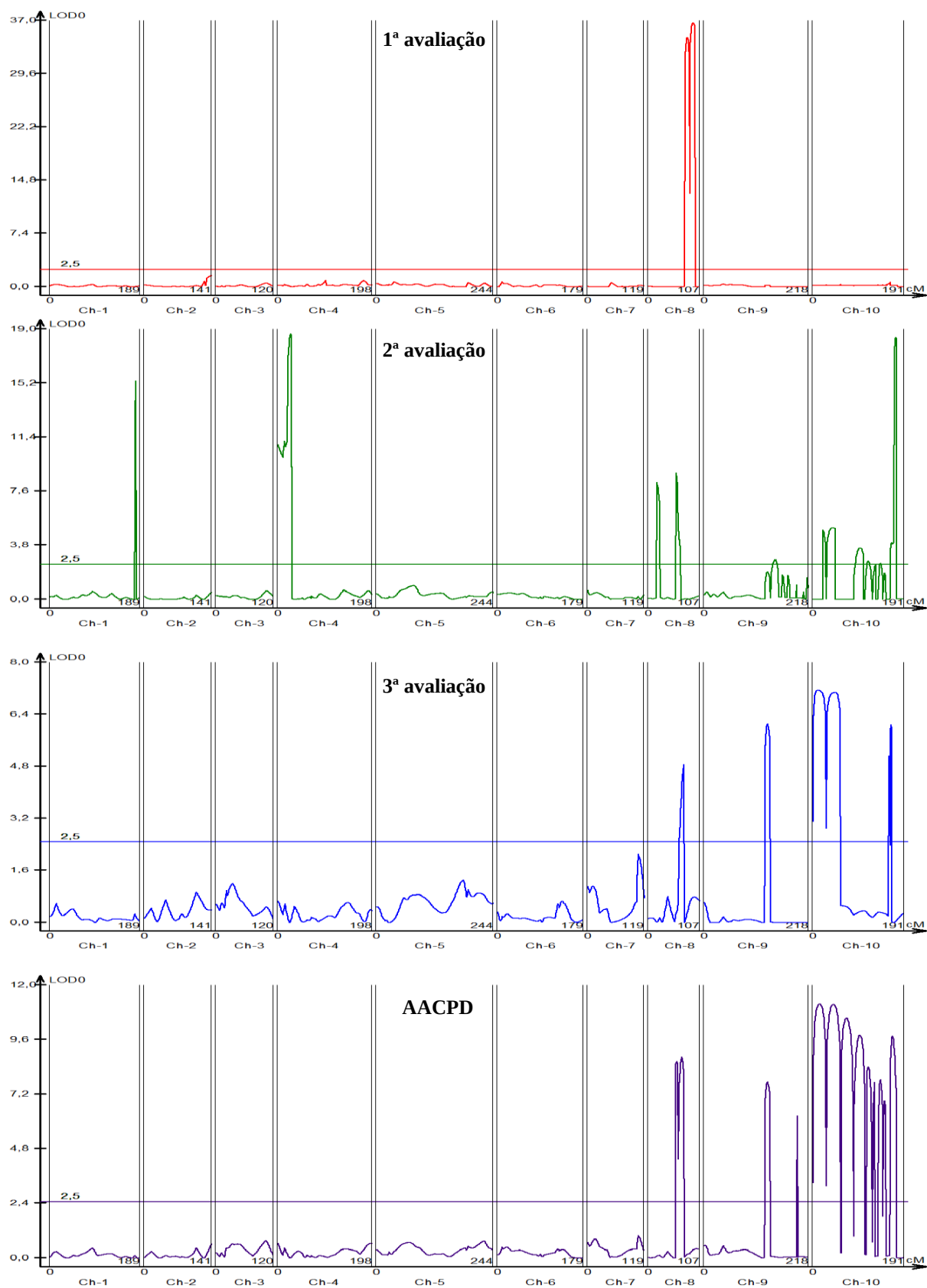


Figura 11 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs à antracnose foliar nas três avaliações pontuais e na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no 3º experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização fenotípica das progêneses $F_{2:3}$ de milho a partir da infecção por *Colletotrichum graminicola*, possibilitou identificar progêneses de milho resistentes à antracnose foliar.

A maior contribuição da variância genética para a expressão fenotípica da resistência confirma a existência de grande variabilidade genética no conjunto de progêneses estudadas.

As elevadas magnitudes dos parâmetros genéticos estimados: variância genética, herdabilidade no sentido amplo e quociente $\hat{b}$ indicam sucesso na obtenção de progresso genético com a seleção artificial para a resistência de progêneses de milho à antracnose foliar.

As análises de regressão linear múltipla possibilitaram identificar marcadores moleculares associados à QRLs para a antracnose foliar.

Os marcadores AFLPs E55139 e E56386 explicaram individualmente as maiores proporções da variação fenotípica independente do experimento e da forma de quantificação da doença.

Foram mapeados 19 QRLs à antracnose foliar em diferentes regiões genômicas de 8 grupos de ligação do mapa consenso de milho. A linhagem resistente L04-2 contribuiu com 7 alelos e a L95-1 com 12 alelos de resistência à antracnose foliar.

A grande maioria dos QRLs mapeados foram dependentes do ambiente de avaliação (experimento) e das formas de quantificação da doença, demonstrando forte interação QRLs x ambientes de avaliação neste patossistema.

Os QRLs mapeados nos intervalos E5494-E55248 (GL 8), E51562-E5197 (GL 9), E58117-E514698 (GL 10), E514698-E58207 (GL 10), E55118-E2381 (GL 10) e E5876-Umc1084 (GL 10) foram os mais estáveis nos ambientes de avaliação da doença, podendo ser fortes candidatos para esquemas de seleção assistida por marcadores.

O grande número de QRLs mapeados neste trabalho confirma a herança quantitativa da resistência à antracnose foliar neste germoplasma de milho tropical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJMONE-MARSAN, P. et al. Identification of QLTs for grain yield and grain related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different testers, and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 230-243, 2001.
- ALI, F.; YAN, J. Disease resistance in maize and the role of molecular breeding in defending against global threat. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 54, n.3, p.134-151, 2012.
- ARAUJO, G. S. **Seleção de progênes e estimativas de parâmetro genéticos em *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae) para caracteres morfo-agronômico**. 2010. 128 f Dissertação - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2010.
- ASEA, G. et al. Genetic gain and cost efficiency of marker-assisted selection of maize for improved resistance to multiple foliar pathogens. **Molecular Breeding**, v. 29, p. 515-527, 2012.
- BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V. E.; BERGSTROM, G. C. A major gene for resistance stalk rot in maize. **Phytopathology**, v. 77, n. 6, p. 957-959. 1987a.
- BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V. E.; BERGSTROM, G. C. A major gene for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Plant Breeding**, v. 98, n. 3, p. 194-199, jun. 1987b.
- BALINT-KURTI, P. J.; CARSON, M. L. Analysis of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight in juvenile maize. **Phytopathology**, v. 96, p. 221-225, 2006.
- BALINT-KURTI, P. J. et al. Identification of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight and days to anthesis in a maize recombinant inbred line population. **Phytopathology**, v. 96, p. 1067-1071, 2006.
- BALINT-KURTI, P. J. et al. Identification of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight and days to anthesis in two maize recombinant inbred line populations. **Phytopathology**, v. 98, p. 315-320, 2008.
- BALINT-KURTI, P. J.; JOHAL, G. S. Maize disease resistance. In: BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. C. **Handbook of maize: its biology**. Nova York: Springer, 2009. p. 229-250.
- BARAKAT, M. N.; EL-SHAFEI, A. A.; AL-DOSS, A. A. Identification of molecular markers linked to northern corn leaf blight resistance in yellow population of maize. **G3: Genes/Genomes/Genetics**, v. 3, p. 89-95, 2009.
- BARBOSA, M. P. M. **Variabilidade patogênica de *Colletotrichum graminicola* isolado de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 112 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2001.
- BASF. Estação experimental de Ponta Grossa. **Dados meteorológicos**. Ponta Grossa, 2013.
- BASTEN, C. J.; WEIR, B. S.; ZENG, B. Z. **QTL Cartographer**, Version 1.17. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, 2003.

BATISTA, C. E. A. **Mapeamento de genes associados à resistência da soja a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*)**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J. B., CARNEIRO, I. F (Eds.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 63-223.

BEAVIS, W. D. et al. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F₄ progeny from maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 882-896, 1994.

BELL, C. J.; ECKER, J. R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. **Genome**, v. 19, p. 137-144, 1994.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 647-666.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. Effect of the *Colletotrichum graminicola* conidial matrix on the development of anthracnose seedling blight in maize. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 447-453, 1983.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 596-608. 1999.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma Press, 2002, 369p.

BORÉM A.; GIÚDICE M. P. Del., Cultivares transgênicos In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. **Tecnologias de Produção do Milho**. 2ª reimpressão (1 edição 2004). Viçosa, UFV, 2012, p. 85-108.

BOSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRITO, A. H. et al. Avaliação da severidade da cercosporiose e rendimento de grãos em híbridos comerciais de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, n. 1, p. 19-31. 2008.

BROWERS, J. E. et al. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, v. 39, n. 4, p. 628-633, 1996.

BROWN, A. F.; JUVIK, J. A.; PATAKY, J. K. Quantitative trait loci in sweet corn associated with partial resistance to Stewart's wilt, northern corn leaf blight, and common rust. **Phytopathology**, v. 91, p. 293-300, 2001.

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

BUBECK, D. M. et al. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, v.33, p.838-847, 1993.

BUBECK, D. M. **Molecular and biometric evaluation of gray leaf spot and southern corn leaf blight resistance in maize**. 1992. Dissertação, North Carolina State University, 1992.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, 2009, p. 95-102.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas**. Viçosa, 2013, p. 31-68.

CALLAWAY, M.B.; SMITH, M.E.; COFFMAN, W.R. Diallel analysis of resistance to anthracnose stalk rot in maize inbreds. **Crop Science**, v. 30, p. 335-337, 1990.

CALLAWAY, M.B.; SMITH, M.E.; COFFMAN, W.R. Effect of anthracnose stalk rot on grain yield and related traits of maize adapted to the Northeastern United States. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 72, p. 1031-1036, 1992.

CARSON, M. L.; HOOKER, A. L. Inheritance of resistance to anthracnose leaf blight in five inbred lines of corn. **Phytopathology**, v. 71, n. 5, p. 488-491. 1981a.

CARSON, M. L.; HOOKER, A. L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 71, n. 11, p. 1190-1196. 1981b.

CARSON, M.L.; HOOKER, A.L. Reciprocal translocation testcross analysis of genes for anthracnose stalk rot resistance in a corn inbred line. **Phytopathology**, v.72, p.175-177, 1982.

CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Milho: estratégia de manejo para alta produtividade**. Piracicaba, ESALQ/USP, 2003, p. 01-18.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 83).

CASTELANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CASTIGLIONI, P. et al. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. **Genetics**, v.149, p. 2039-2056, 1998.

CASTIGLIONI, P. et al. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.425-431, 1999.

CLEMENTS, M. J.; DUDLEY, J. W.; WHITE, D. G. Quantitative trait loci associated with resistance to gray leaf spot of corn. **Phytopathology**, v. 90, p. 1018-1025, 2000.

COÊLHO, R. M. S. et al. Controle genético da antracnose foliar em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.640-643, 2001.

COELHO, A. S. G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. (Eds.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000, p. 1-36.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos**. Décimo primeiro levantamento, Brasília, julho, 2014.

CORREA, A. M. et al. Estimativas de parâmetros genéticos e correlações entre caracteres fenológicos e morfoagronômicos em feijão-caupi. **Revista Ceres**, v. 59, n.1, p. 88-94, 2012.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Cultivo do Milho – Doenças. Sistemas de produção, 2. Versão eletrônica: 5ª edição. Set/2009. Disponível em: www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm. Acesso em: 15/03/2014

COSTA, R. V. et al. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 122-128. 2010.

COSTA, R. V. et al. Races *Colletotrichum graminicola* pathogenic to maize in Brazil. **Crop Protection**, v. 56, p. 44-49, 2014.

COTA, L. V. et al. Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. **J. Phytopathology**, v. 160, p. 680-684, 2012.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorfisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver stainig. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, J. C.; MONTEIRO, J. A.; SANTANA, D. P.; **Agricultura real: recomendações técnicas para a cultura do milho**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1996. 204p.

CRUZ, J. C. et al. **Produção de milho na agricultura familiar**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 42 f. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 159). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/905143/1/circ159.pdf>>. Acesso em: 23/04/2014.

DALE, J. L. Corn anthracnose. **Plant Disease**, v. 47, n. 4, p. 245-249, 1963.

DINGERDISSEN, A. L. et al. Interval mapping of genes for quantitative resistance of maize to *Setosphaeria turcica*, cause of northern leaf blight, in a tropical environment. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 143-156, 1996

DOERGE, R. W.; ZENG, Z-B.; WEIR, B. S. Statistical issues in the search for genes affecting quantitative traits in experimental populations. **Statistical Science**, v. 12, n. 3, p. 195-219, 1997.

DRAPER, J.M.; SMITH, H. **Applied regression analysis**.2.ed. New York: John Wiley and Sons, 1981. 709p.

EATHINGTON, S. R. Practical applications of molecular technology in the development of commercial maize hybrids. In: **Proceeding of the 60th Annual Corn and Sorghum Seed Research Conferences**, Chicago. 2005. American Seed Trade Association, Washington, DC.

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**, v.116, p.113-125, 1987.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2006.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. London: Logman Scientific e Technical, 1996, 464p.

FANCELLI, A. L. **Plantas alimentícias**: guia para aula, estudos e discussão. Piracicaba: ESALQ, 1986. 131 p.

FERNANDES, F. T.; BALMER, E. Situação das doenças de milho no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 14, n. 165, p. 35-37, 1990.

FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. **Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 6p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 13).

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: programa estatístico. Versão 5.3. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1999.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995. 220p.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.

FREYMARK, P. J. et al. C. A. Quantitative and qualitative trait loci affecting host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 537-544, 1993.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Livraria Nobel, 1990. 430 p.

GOMES, R. F.; SILVA, A. G.; ASSIS, R. L.; PIRES, F. R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agrônômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 31, p.931-938, 2007.

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values, and calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v. 8, p. 299-309, 1919.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R. L. Resistance of maize to anthracnose: Effect of light intensity on lesion development. **Phytopathology**, v. 67, p. 247-250, 1977.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ DE LEON, D. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. 2. ed. México: CIMMYT, 1994. 51p.

HARTL, D.; JONES, E. **Genetics: Analysis of Genes and Genomes**, Jones; Bartlett Publishers, 2001, Sudbury, MA.

HOOKER, A. L. Corn anthracnose leaf blight and stalk rot. Proceedings of the thirty-first annual corn and sorghum research conference. **American Seed Trade Association**, p. 167-183, 1976.

HOOKER, A. L.; WHITE, D. G. Prevalence of corn stalk rot fungi in Illinois. **Plant Disease**, v. 60, p. 1032-1034, 1976.

IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná. Cartas climáticas do Paraná. Disponível em: <<http://www.iapar.br>>. Acesso em: 28/11/2012.

HUBER, D. M.; THOMPSON, L. A. Nitrogen and plant disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. **Mineral nutrition and plant disease**. St Paul, The American Phytopathological Society Press. p. 31-44, 2007.

INGHELANDT, D. V. et al. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm. **Plant Biology**, v. 12, p. 56-70, 2012.

JACOB, H. J. et al. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, p. 213-224, 1991.

JAMIL, F. F.; NICHOLSON, R. L. Susceptibility of corn to isolates of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to other grasses. **Plant Disease**, v. 71, n. 9, p. 809-810, 1987.

JANSEN, R. C. A general mixture model mapping quantitative trait loci by using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 252-260, 1992.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v.135, n.1, p. 205-211, 1993.

JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative trait into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v.136, p.1447-1455, 1994.

JANSEN, R. C. et al. Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 33-37, 1995.

JARDINE, D. F.; LACA, B. J. P. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares na cultura do milho. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 6, p. 11-52, 2009.

JIANG, L. et al. The Pic19 NBS-LRR gene family members are closely linked to Scmv1, but not involved in maize resistance to sugarcane mosaic virus. **Genome**, v. 51, p. 673-684, 2008.

JIANG, C.; ZENG, Z. Multiple trait analysis of genetics mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v. 140, n. 3, p. 1111-1127, 1995.

JIRAK-PETERSON, J. C.; ESKER, P. D. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 95, n.5, p. 601-610, 2011.

JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v. 77, p. 230-240, 1999.

JUNG, M. et al. Generation means analysis and quantitative trait locus mapping of anthracnose stalk rot genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 413-418, 1994.

KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309-334, 2011.

KEARSEY, M.; POONI, H. The genetical analysis of quantitative traits. **Chapman and Hall**, London, 1996.

KELLER, N. P.; BERGSTROM, G. C.; CARRUTHERS, R. I. Potential yield reductions in maize associated with an anthracnose/European corn borer pest complex in New York. **Phytopathology**, v.6, p.586-589, 1986.

KELLER, N. P.; BERGSTROM, G. C. Developmental predisposition of maize to anthracnose stalk rot. **Plant Disease**, v. 72, p. 977-980, 1988.

KERNS, M. R.; DUDLEY, J. W.; RUFENER II, G. K. QTL for resistance to common rust and smut in maize. **Maydica**, v. 44, p. 37-45, 1999.

KOEBNER, R.M. Marker assisted selection in the cereals: The dream and the reality. In: GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. **Cereal genomics**. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands, p. 317-329, 2004.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1111-1115, 1993.

LANDER, E. S. et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p. 174-181, 1987.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, n.1, p.185-199, 1989.

LANZA, L. L. B. et al. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 1023-1030, 1997.

LANZA, F. E. **Mancha Branca do milho: Etiologia e resistência de genótipos**. 2009. 32 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.55, p. 265-344, 1995.

LEHMENSIEK, A. et al. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 5, p. 797-803, 2001.

LEONARD, K. L. Foliar pathogens of corn in North Caroline. **Plant Disease**, v. 27, p. 70-73, 1974.

LEONARD, K. J.; THOMPSON, D. L. Effects of temperature and host maturity on lesion development of *Colletotrichum graminicola* on corn. **Phytopathology**, v. 66, p. 635-639, 1976.

LIM, S.M.; WHITE, D.G. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 68, p. 1336-1342, 1978.

LIMA, L. M. et al. Relação nitrogênio/potássio com mancha de Phoma e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 223-228, 2010.

LIPPS, P. E. Spread of corn anthracnose from surface residues in continuous corn and corn-soybean rotation plots. **Phytopathology**, v. 78, p. 756-761, 1988.

LITT, M.; LUTY, J. A. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.

LOPES, M. T. G. **Mapeamento de genes de resistência à mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2003. 117 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbred. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 613-617, 2001.

LÜEBBERSTEDT, T.; KLEIN, D.; MELCHINGER, A. E. Comparative QTL mapping of resistance to *Ustilago maydis* across four populations of European flint-maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 1321-1330, 1998.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998, 978p.

LYONS, P. C.; WOOD, K. V.; NICHOLSON, R. L. Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 29, p. 97-101, 1990.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MANGOLIN, C. A. et al. Mapping QTLs for kernel oil content in a tropical maize population. **Euphytica**, v. 137, p. 251-259, 2004.

MARIOT, M. P. et al. Variabilidade genética para caracteres morfológicos e fisiológicos em espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n.3, p. 310-316, 2009.

MAROOF, M. A. S. et al. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 539-546, 1996.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2^a. Ed. London, Academic Press, 1995.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical genetics**. Ithaca: Cornell University Press, 1971. 382 p.

MATIELLO, R. R. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos na produção**. 2004. 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MATIELLO, R. R. et al. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize inbred lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 179-184, 2012.

MATIELLO, R. R. et al. Comparison of yield damages of tropical maize hybrids caused by anthracnose stalk rot. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 128-132, 2013.

MÁXIMO, D. S. **Controle genético da resistência de milho à antracnose do colmo**. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

McCOUCH, S. R.; DOERGE, R. W. QTL mapping in rice. **Trends in Genetics**, v. 11, p. 482-487, 1995.

MCMULLEN, M. D.; SIMCOX, K. D. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 8, p. 811-815, 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. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.88, p.9828-9832, 1991.

MOREIRA, J. U. V. et al. QTL mapping for reaction to *Phaeosphaeria* leaf spot in a tropical maize population. **Theoretical Applied Genetics**, v. 119, p. 1361-1369, 2009.

MOREIRA, J. U. V. **Mapeamento de QTLs para reação à doença mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2004. 86 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MORELLO, R.M.S.C. **Resistencia em milho (*Zea mays* L.) a *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils.** 2000. 94 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2000.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

MULIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NOGUEIRA NETTO, V. S. **Impactos do Mercosul na produção e comercialização do milho e da soja da região Centro-Oeste.** 1996, 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.

OGLIARI, J. B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, através do uso de marcadores moleculares microssatélites.** 1999. 114 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

OGLIARI, J.B.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification maize microsatellites loci. **Genetic and Molecular Biology**, v.23, p.395-398, 2000.

PARIDA, S. K. et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 327-338, 2009.

PATERSON, A.H. Making genetic maps. In: PATERSON, A.H. **Genome Mapping in Plants**, p. 23-39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas, 1996.

PAUL, C. et al. Quantitative trait loci for low aflatoxin production in two related maize populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p 263-270, 2003.

PÊ, M. E. et al. Mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize. **Molecular General Genetics**, v.241, p.11-16, 1993.

PEREIRA, O. A. P. **Herança da resistência à podridão do colmo em milho (*Zea mays* L.) causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils.** 1983, 115 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1983.

PEREIRA, O. A. P.; BALMER, E.; MIRANDA FILHO, J. B. Inheritance of resistance to stalk rot, caused by *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. in maize (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, p. 53-65, 1989.

PERKINS, J. M.; HOOKER, A. L. The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. **Plant Disease**, v. 63, p. 26-30, 1979.

PERNET, A. et al. Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. II. Resistance in line CIRAD390 and stability across germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 540-553, 1999.

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 134-138, 2004.

POLAND, J. A. et al. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 21-29, 2009.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 215-222, 1996.

POZAR, G. et al. Mapping and validation of quantitative trait loci for resistance to cercospora infection in tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 118, n. 3, p. 553-564, 2009.

PROCHNO, H. C. **Herança da resistência de milho à antracnose foliar**. 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

PUPIPAT, U.; MEHTA, Y. R. Stalk rot of maize caused by *Colletotrichum graminicola*. **Indian Phytopathology**, v. 22, p. 246-348, 1969.

RAFALSKI, J.; TINGEY, S. Genetic diagnostics in Plant Breed: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, v. 9, p. 275-280, 1993.

RAGOT, M. et al. Efficient selection for the adaptation to the environment through QTL mapping and manipulation in maize. p. 128-130. In: RIBAUT, J. M.; POLAND D. **Molecular approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environments**. CIMMYT, Mexico, DF, 2000.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da Genética Quantitativa no Melhoramento de Plantas Autógamas**. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; REIS, A. C. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2004. 141 p.

REZENDE, V. F. **Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho**. 2004, 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

REZENDE, V. F. et al. Mixed inheritance model for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 115-122. 2004.

RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. Marker-assisted selection: New tools and strategies. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 236-239, 1998.

RIBAUT, J. M.; JIANG, C.; GONZALEZ, D. L. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. **Theoretical and Applied Genetics**, v, 94, p. 887-896, 1997.

RÖDER, M. S. et al. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. **Molecular General Genetics**, v, 246, p. 327-333, 1995.

RODRIGUES, M. A. **Identificação e mapeamento de marcadores associados a locos de resistência a virose do mosaico dourado em feijão**. 2011. 54 f. (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santa, Bahia, 2011.

RONGWEN, J. et al. The use of simple sequence repeat DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, n.1, p.43-48, 1995

SAGHAI MAROOF, M. A. et al. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.539-546, 1996.

SANTOS, G. R. et al. Severidade de doenças foliares e produtividade de genótipos de milho em resposta à adubação nitrogenada. **Revista Ceres**, v. 60, n. 4, p. 505-513, 2013.

SCHECHERT, A. W.; WELZ, H. G.; GEIGER, H. H. QTL for resistance to *Setosphaeria turcica* in tropical African maize. **Crop Science**, v. 39, p. 514-523, 1999.

SENIOR, M. L. et al. Mapping simple sequence repeats in maize. **Maize Newsletter**, v.70, p.50-54, 1996.

SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of show-mildwing in knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1055, 1977.

SIBOV S. T. et al. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. **Hereditas**, v. 139, p. 96-106, 2003.

SILVA, H. P. **Herança da resistência à antracnose foliar em milho (*Zea mays* L.) e métodos de avaliação**. 1983. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

SILVA, H. P. et al. Capacidade de combinação e heterose para resistência a *Puccinia polysora* Underw. em milho. **Scientia Agricola**, v.58, n. 3, p.777-783, mar. 2001.

SILVA, H. P. et al. Análise genética da resistência da nervura central da folha do milho ao *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 12, n. 1-2, p. 80-91, 1986.

SILVA, V. A. **Resposta de cultivares de milho a *Colletotrichum graminicola***. Jaboticabal, 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

SILVA, H. D.; VENCOSKY, R. Testes múltiplos e associação de marcas associadas à QTL's. **Scientia Agricola**, v. 10, p. 755-762, 2002.

SILVEIRA, A. P.; FIGUEIREDO, M. F.; CRUZ, B. P. Ocorrência de antracnose do milho no Estado de São Paulo. **O Biológico**, v. 31, p. 192-194, 1965.

SILVEIRA, G. D.; MAURO, A. O.; CENTURION, M. A. P. C. Selection of soybean genotypes for the region of Jaboticabal (SP), Brazil. (Cropping season of 2003-2004). **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.92 - 98, 2006.

SIMCOX, K. D.; BENNETZEN, J. L. The use of molecular markers to study *Septosphaeria turcica* resistance in maize. **Phytopathology**, v. 83, p. 1326-1330, 1993.

SKOROPAD, W. P. Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form apressoria and penetrate barley leaves. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 47, p. 431-434, 1967.

SMITH, D. R. Yield reduction in dent corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Plant Disease**, v. 60, p. 967-970, 1976.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Fundação MT, 2001. p. 939-965.

SPYRIDES-CUNHA, M. H. ; DEMÉTRIO, C. G. B. ; CAMARGO, L. E. A. Proportional odds model applied to mapping disease resistance genes in plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 23, n. 1, p. 223-227, 2000.

STAUB, J.E, SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **Hort Science**, Alexandria, v.31, n.5, p.729-740, 1996.

TAMBARUSSI, E. V. et al. Estimative of genetic parameters in progeny test of *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari by quantitative traits and microsatellite markers. **Bragantia**, v. 69, n.1, p. 39-47, 2010.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.

TANKSLEY, S. D. et al. **Molecular mapping of plant chromosomes**. In: GUSTAFSON, J. P.; APPELS, R. (Eds.). New York: Plenum Press, 1988. p.157-173.

TASIOR, D. **Estimativas de parâmetros genéticos e mapeamento molecular de QRLs à antracnose do colmo em milho tropical**. 2014. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p. 6463-6471, 1989.

TOMAN JR, J.; WHITE, D. G. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot of corn. **Phytopathology**, v. 83, p. 981-986, 1993.

TROCCOLI, I. R. **Milho: prognóstico de safra 1994-95**. Agroanalysis, p. 17-21, 1994.

USDA, United States Department of Agriculture. **World Corn Production, Consumption, and Stocks**. 2013. Disponível em:<<http://www.fas.usda.gov>>. Acesso em: 15/07/214.

VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. N. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. **Experimental Mycology**, Duluth, v. 16, n. 3, p. 219-229, 1992.

VAN DER VOORT, J. N. A. M. et al. Linkage analysis by genotyping of sibling populations: a genetic map for the potato cyst nematode constructed using a “pseudo-F₂” mapping strategy. **Molecular and General Genetics**, v.261, n.6, p.1021-1031, 1999.

VARGAS, W. A. et al. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. **Plant Physiology**, v. 158, p. 1342-1358, 2012.

VEIGA, A. D. et al. Quantitative trait loci associated with resistance to gray leaf spot and grain yield in corn. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 1, p. 31-38, 2012.

VERSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.1, p.47-55, 2005.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 137-214.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

VIEIRA, R. A. et al. Resistência de híbridos de milho-pipoca a *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho. **Scientia Agraria**, v. 10, n. 5, p. 391-395, 2009.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23. n.21, p.4407-4414, 1995.

VUYLSTEKE, M. et al. Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 921-935, 1999.

WARREN, H. L. et al. Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. **Plant Disease**, v. 57, p. 143-144. 1973.

WARREN, H.L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in corn kernels. **Phytopathology**, v. 67, p. 160-162, 1977.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.

WELZ, H. G.; SCHECHERT, A. W.; GEIGER, H. H. Dynamic gene action at QTLs for resistance to *Setosphaeria turcica* in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 1036-1045, 1999a.

WELZ, H. G. et al. QTLs for resistance to *Setosphaeria turcica* in an early maturing Dent x Flint maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v 99, p 649-655, 1999b.

WHEELER, H.; POLITIS, D. J.; PONELEIT, C. G. Pathogenicity, host range, and distribution of *Colletotrichum graminicola* on corn. **Phytopathology**, v. 64, p. 293-296, 1974.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. 128 p.

WHITE, D. G.; YANNEY, J.; NATTI, T. A. **Anthracnose stalk rot**. Proceedings, Thirty-fourth annual corn and sorghum research conference. American Seed Trade Association, 1979, 115p.

WILLIANS, M. A.; FOKKEMA, N. J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from apressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Journal Plant Pathology**, v. 91, p. 265-276, 1985.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WISSER, R. J.; BALINT-KURTI, P. J.; NELSON, R. J. The genetic architecture of disease resistance in maize: a synthesis of published studies. **Phytopathology**, v. 96, p. 120-129, 2006.

WORDELL, F. J.; CASA, R. T. Doenças na cultura do milho. In. WORDELL FILHO et al., **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2010. 480p.

XIAO, W. K. et al. Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 63-72, 2006.

XU, Y. Developing marker-assisted selection strategies for breeding hybrid rice. **Plant Breeding**, v. 23, p.73-174, 2003.

XU, M. L. et al. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. **Molecular and General Genetics**, v.261, n.3, p.574-581, 1999.

YAO, Q. et al. Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data. **Journal Genetics and Genomics**, v. 34, n. 1, p. 851-860, 2007.

ZAMBRANO, J. L. et al. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, p. 867-880, 2014.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

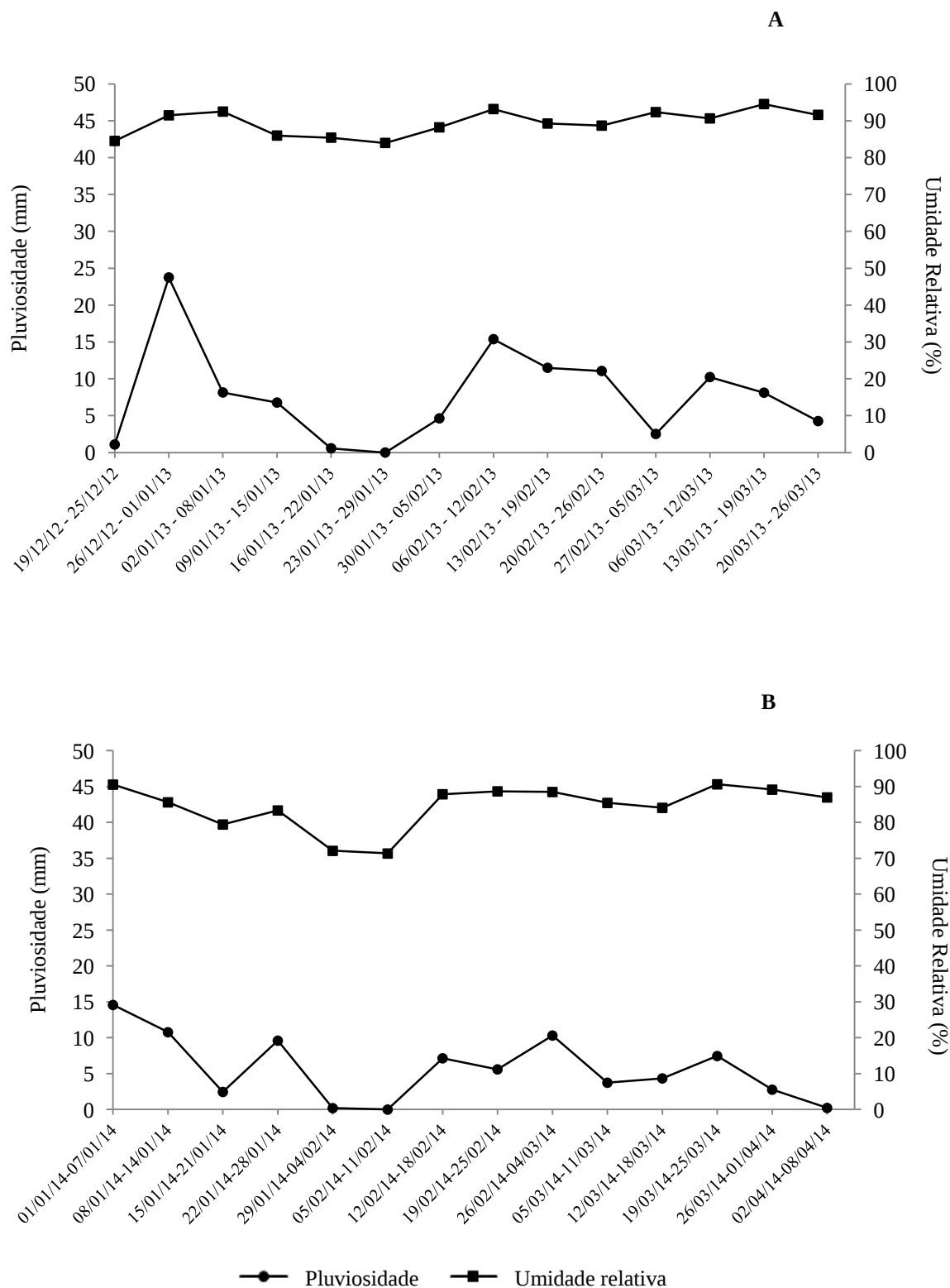
ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effect in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p.10972-10976, 1993.

ZIMMER, D. P.; OLIVEIRA, A.C.; MALONE, G. **Ferramentas da Biotecnologia: no melhoramento genético vegetal**. Pelotas - RS: UFPEL, 2005. 158p.

ZHANG, L. Q. et al. Population genetics of duplicated disease-defense genes, hm1 and hm2, in maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) and its wild ancestor (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). **Genetics**, v. 162, p. 851-860, 2002.

ZUBER, M. S. et al. Effect of anthracnose leaf blight on stalk rind strength and yield in F₁ single crosses in maize. **Plant Disease**, v. 65, p. 719-722, 1981.

ZWONITZER, J. C. et al. Mapping resistance quantitative trait loci for three foliar diseases in a maize recombinant inbred line population-evidence for multiple disease resistance. **Phytopathology**, v. 100, p.72-79, 2010.



ANEXO 1 – Pluviosidade (mm) e umidade relativa (%) semanal para a safrinha 2012/2013 (A) e 2013/2014 (B). Ponta Grossa, 2014. Fonte: BASF (2013/2014)