UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

DANIELE TASIOR

ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS E MAPEAMENTO MOLECULAR DE QRLs À ANTRACNOSE DO COLMO EM MILHO TROPICAL

PONTA GROSSA

2014

DANIELE TASIOR

ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS E MAPEAMENTO MOLECULAR DE QRLs À ANTRACNOSE DO COLMO EM MILHO TROPICAL

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

PONTA GROSSA

2014

Aos meus pais: **Leonel Tasior** e **Maria Aparecida Tasior,** meu irmão **Douglas Tasior** e ao meu namorado **Ricardo Nunes Machado**. Pelo amor incondicional e a confiança a mim depositado.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, pelas oportunidades que colocou no meu caminho e pela força que a mim concebeu nos momentos de maior dificuldade. Deus deposito em ti todo meu amor e minha fé.

Expresso meus sinceros agradecimentos à Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial ao curso de pós-graduação em Biologia Evolutiva.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro para a realização do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, pelo aprendizado, pela excelente orientação, e pela paciência e bons conselhos durante a realização do presente trabalho.

Aos professores Dr. Marcelo Ricardo Vicari, Dra. Mara Cristina Almeida, Dr. Roberto Ferreira Artoni e Dra. Viviane Nogaroto, que fizeram parte desde o início da minha carreira acadêmica. Pelos ensinamentos transmitidos ao longo dos anos. Muito Obrigada. Vocês são exemplos de profissionais para mim.

Ao técnico Miguel Airton Carvalho pela amizade a mim cedida ao longo dos anos.

Aos meus pais amados, que são minha vida, meu alicerce, pelo amor incondicional, pela força e compreensão que tiveram em todos os momentos, eu amo vocês.

A meu irmão, pela amizade, amor e confiança em mim. Você estará no meu coração sempre. Amo você.

À minha família do coração, Família Nunes (Ione, Taíco e Rafaelly) que me acolheu, encorajou, e acreditou em mim.

Ao Ricardo Nunes Machado, por tudo, pelo amor, carinho principalmente pela força e os conselhos em todos os momentos difíceis, os quais me incentivaram a seguir em frente. Pela imensa ajuda sem a qual tudo seria ainda mais difícil. Obrigada por seu incentivo incondicional.

Aos queridos amigos e irmãos de coração do Laboratório de Genética Molecular: Hellen C. Prochno, Caroline Coelho, Danilo Guimarães, Christiane Romanek, Débora Máximo, Lilian Schafascheck, Guilherme de Jong, Rodrigo Hilbert, Francyelly Ferreira, Thaís da Silva, Eduardo Oliveira, Brenda Luiza, Aghata Charnobay, Lucas Brigola, Gessyca Souvinski, Vanessa de Oliveira, Willian dos Anjos, Renato Bombardelli, Guilherme Schulze, Thiago Portes e Luiza Konrad Zastrutzki pela fundamental ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.

À empresa Dow Agrosciences LTDA pelo fornecimento do isolado do patógeno utilizado no trabalho.

Aos funcionários da UEPG, em especial Zoli da Secretaria de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pelo auxílio e bom atendimento.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e pela minha formação. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O trabalho objetivou caracterizar a resistência de progênies $F_{2:3}$ de milho inoculados com *Colletotrichum graminicola*, estimar os parâmetros genéticos e mapear regiões genômicas associados à alelos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho tropical determinando os efeitos de cada loco sobre a resistência/suscetibilidade a *C. graminicola.* Os indivíduos da geração F_2 foram autofecundados para gerar as progênies $F_{2:3}$, as quais foram avaliadas fenotipicamente para resistência à antracnose do colmo em três experimentos de campo. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, linhagens parentais (L04-2 e L99-4) e da geração F_1, os quais foram utilizados como tratamentos controle. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, com três repetições. Cada parcela foi constituída de 3 m de comprimento e 0,90 m na entrelinha, com aproximadamente 15 plantas por parcela. As plantas dos experimentos foram inoculadas no estádio de florescimento pleno da cultura, através da injeção de 1mL da suspensão de esporos, no meio do primeiro ou segundo internódio visível acima do solo. A avaliação dos sintomas foi realizado 30 dias após a inoculação, através da avaliação do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) em cm e do número de internódios descoloridos (INT). A partir das avaliações fenotípicas das 121 progênies $F_{2:3}$ foram estimados os parâmetros genéticos associados a resistência para as três características avaliadas (CINT, CEXT e INT) em cada experimento. A associação dos marcadores microssatélites e AFLPs a alelos de resistência foi realizada através da regressão linear múltipla. Locos SSR e AFLPs foram utilizados na construção do mapa de ligação através do MAPMAKER versão 3.0. A detecção dos QRLs foi realizada pelo método de mapeamento por intervalo composto utilizando o programa *QTLCartographer*. Os resultados experimentais evidenciaram existência de grande variabilidade genética entre as progênies $F_{2:3}$ de milho para resistência/suscetibilidade à *C. graminicola*. As formas de avaliação da antracnose do colmo (CINT, CEXT e INT), foram igualmente eficientes em discriminar os indivíduos resistentes dos suscetíveis. Os elevados coeficientes de herdabilidade no sentido amplo confirmam a grande contribuição da variância genética para resistência, o que assegura ganhos genéticos com a seleção artificial neste patossistema. A regressão linear múltipla possibilitou identificar marcadores microssatélites e AFLPs altamente associados a alelos de resistência à *C. graminicola*. O marcador AFLP E55534 explicou individualmente a maior proporção da variação fenotípica para o comprimento interno (- 28,43%), comprimento externo de lesão (- 27,70%) e para o número de internódios descoloridos (- 27,45%) nas progênies $F_{2:3}$ de milho. O mapeamento por intervalo composto identificou 31 QRLs à antracnose do colmo segregando na população de mapeamento, os quais foram mapeados entre os 10 grupos de ligação. Este é o primeiro relato de QRLs à antracnose do colmo mapeados nos cromossomos 2, 3 e 10. Pelo grande número de QRLs mapeados sugere-se que a herança da resistência neste germoplasma tropical seja mais complexa, condicionada por um grande número de genes, sendo alguns de grande efeito fenotípico e a grande maioria com pequenos efeitos para a resistência neste patossistema.

Palavras-chave: *Colletotrichum graminicola*. Resistência a doenças. Marcadores Moleculares. *Zea mays*.

ABSTRACT

The study aimed to characterize the resistance of $F_{2:3}$ progenies of maize inoculated with *Colletotrichum graminicola*, genetic parameters and map genomic regions associated with quantitative resistance alleles to anthracnose stalk in tropical maize determining the effects of each locus on resistance/susceptibility *C. graminicola*. Individuals of the F_2 generation were selfed to generate $F_{2:3}$ progenies, which were evaluated phenotypically for resistance to anthracnose stalk in three experiments. The treatments were consisted of 121 $F_{2:3}$progenies, parental lines (L_{04-2} and L_{99-4}) and the F_1 generation, which were used as control. The experimental plots were arranged in a randomized block design with three replications. Each plot consisted in one row of 3 m in length with rows spaced 0.90 m apart, with a total of 15 plants per plot. The plants were inoculated in the anthesis stage by injecting 1 mL of spore suspension into the first or second elongated internode above ground. The data was collected 30 days after inoculation by evaluating the internal lesion length (CINT), external lesion length (CEXT) in cm and the number of discolored internodes (INT). From the phenotypic evaluations of 121 $F_{2:3}$ progenies genetic parameters were associated with resistance to all three forms of assessment (CINT, INT and CEXT) in each experiment. The association of microsatellites and AFLP markers to resistance alleles was performed using multiple regression. AFLP and SSR loci used to form the construction of the linkage map by MAPMAKER version 3.0. Detection of the QRL was performed by composite interval mapping method using *QTLCartographer* program. The experimental results showed the existence of high genetic variability among the $F_{2:3}$ progenies for resistance/susceptibility to *C. graminicola*. The forms of assessment of anthracnose stalk (CINT, INT and CEXT) were equally effective in discriminating susceptible from resistant individuals. The high broad-sense heritability confirms the great contribution of genetic variance for resistance, which ensures genetic gain for artificial selection in this pathosystem. The AFLP marker E55534 individually explained the greatest proportion of the phenotypic variation for the internal length (- 28.43%), external lesion length (- 27.70%) and the number of discolored internodes (- 27.45%) in $F_{2:3}$ progenies of maize. The composite interval mapping identified 31 QRLs to anthracnose stalk segregating in the mapping population, which were mapped across the 10 linkage groups. This is the first report of the QRL to anthracnose stalk mapped on chromosomes 2, 3 and 10. At large number of mapped QRL is suggested that the inheritance of resistance in this tropical germplasm is more complex, conditioned by a large number of genes, some large phenotypic effects and the vast majority with small effects for resistance in this pathosystem.

Key words: *Colletotrichum graminicola*. Disease resistance. Molecular markers. *Zea mays*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – **(**A) Internódio perfurado com o auxílio de um furador, (B) Inoculação dos conídios de *C. graminicola* com seringa, (C) Toalete dos colmos e (D) Colmos amarrados e identificados. Ponta Grossa, 2014..... 36

FIGURA 2 – **(**A) Visão de uma placa de Petri contendo colônias esporuladas de *C. graminicola*, (B) Raspagem superficial da colônia para liberação dos conídios, (C) Suspensão concentrada de conídios, (D) Suspensão concentrada de conídios com ampliação de 4x, (E) Ampliação de 40x e (F) Ampliação de 100x. Ponta Grossa, 2014..... 37

FIGURA 3 – Amostras de DNA genômico de parte dos indivíduos da população de mapeamento. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2014..... 39

FIGURA 4 – Lesão interna da antracnose do colmo na linhagem resistente L04-2 (A), na geração F_1 (B) e na linhagem suscetível L99-4 (C). Ponta Grossa, 2014..... 60

FIGURA 5 – Distribuição das médias do comprimento interno de lesão (CINT) entre as progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). LR = linhagem resistente, LS = linhagem suscetível e F_1= geração F_1. Ponta Grossa, 2014..... 61

FIGURA 6 – Distribuição das médias do comprimento externo de lesão (CEXT) entre as progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). LR = linhagem resistente, LS = linhagem suscetível e F_1 = geração F_1. Ponta Grossa, 2014..... 62

FIGURA 7 – Distribuição das médias do número de internódios descoloridos (INT) entre as progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). LR = linhagem resistente, LS = linhagem suscetível e F_1 = geração F_1. Ponta Grossa, 2014..... 63

FIGURA 8 – Gel de agarose 3,0%. Visualização da genotipagem de parte dos indivíduos da população segregante F_2 com o *primer* SSR Umc2084. M= marcador de peso molecular 100pb, PR= parental resistente, PS= parental suscetível, F_1= geração filial. Ponta Grossa, 2014..... 105

FIGURA 9 – Padrão de amplificação da combinação de *primers* E31 (E-ACG/M-CAC). 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, F_1= geração filial e PS= parental suscetível. Ponta Grossa, 2014..... 106

FIGURA 10 – Visualização de parte de um gel de poliacrilamida (6%) para a combinação de *primers EcoR*I + *Mse*I (E14= E-AGT/M-CTC). A seta indica o fragmento AFLP E14268 (268pb) possivelmente associado à QRL pela metodologia BSA. BR1/BS1= bulks de DNA (resistente e suscetível) do primeiro experimento, PR= parental resistente, PS= parental suscetível, F_1= geração filial e BR23/BS23= bulks de DNA (resistente e suscetível) do segundo/terceiro experimento. Ponta Grossa, 2014..... 107

FIGURA 11 – 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 obtidos pela função de mapeamento de Haldane. Ponta grossa, 2014..... 108

FIGURA 12 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) no primeiro experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014..... 109

FIGURA 13 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) no segundo experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014..... 110

FIGURA 14 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) no terceiro experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014..... 111

FIGURA 15 – Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) na análise conjunta dos experimentos. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014..... 112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Relação dos 79 locos microssatélites, localização no mapa consenso (grupo/bin), motivo repetido e programa de PCR otimizado. Ponta Grossa, 2014..... 40

TABELA 2 – Relação das 25 combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I testadas nas gerações parentais (L04-2, L99-4 e F_1) e nos bulks de DNA do BSA. Ponta Grossa, 2014..... 42

TABELA 3 – Resumo da análise de variância e dos coeficientes de correlação de Pearson do primeiro, segundo e terceiro experimento para as variáveis comprimento interno (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT). Ponta Grossa, 2014..... 58

TABELA 4 – Estimativa dos parâmetros genéticos associados a resistência à antracnose do colmo a partir das variáveis comprimento interno (CINT), externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT). Ponta Grossa, 2014..... 59

TABELA 5 – Distribuição dos locos microssatélites polimórficos e monomórficos entre as linhagens parentais L04-2 e L99-4, bem como o número de locos com segregação esperada nos grupos de ligação do mapa consenso de milho. Ponta Grossa, 2014..... 89

TABELA 6 – Locos SSR polimórficos genotipados em 121 indivíduos da população de mapeamento L04-2 x L99-4. Ponta Grossa, 2014..... 90

TABELA 7 – Número total de fragmentos amplificados (monomórfico e polimórfico) e porcentagem de polimorfismo para 12 combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I testados nas linhagens parentais L04-2 e L99-4. Ponta Grossa, 2014..... 91

TABELA 8 – Combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I selecionadas a partir da presença de polimorfismo entre os bulks de DNA pela estratégia do BSA. Ponta Grossa, 2014..... 92

TABELA 9– Resultados da análise de ligação dos marcadores SSR 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..... 93

TABELA 10 – Resumo das análises de regressão linear múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo no primeiro experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014..... 94

TABELA 11 – Resumo das análises de regressão linear múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo no segundo experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014..... 95

TABELA 12 – Resumo das análises de regressão linear múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo no terceiro experimento, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014..... 96

TABELA 13 – Resumo das análises de regressão linear múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo na análise conjunta, utilizando o processo “Stepwise” para a seleção de marcadores. Ponta Grossa, 2014..... 97

TABELA 14 – Número de marcadores associados pela análise de regressão linear múltipla a QRLs à antracnose do colmo para comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT). Ponta Grossa, 2014..... 98

TABELA 15 – Posição, LOD score e proporção da variância fenotípica explicada pelos QRLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto. Ponta Grossa, 2014..... 99

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 A CULTURA DO MILHO..... 15
2.2 PODRIDÕES DO COLMO EM MILHO..... 16
2.3 DANOS ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO COLMO..... 18
2.4 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DE *C. graminicola*..... 19
2.5 MARCADORES MOLECULARES..... 21
2.5.1 Marcadores Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*)..... 23
2.5.2 Marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)..... 24
2.6 MAPEAMENTO GENÉTICO..... 25
2.7 CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA..... 29
3 OBJETIVOS..... 33
3.1 GERAL..... 33
3.2 ESPECÍFICOS..... 33
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 34
4.1 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES $F_{2:3}$ DE MILHO À ANTRACNOSE DO COLMO..... 34
4.1.1 Material Vegetal..... 34
4.1.2 Experimentos de Campo..... 34
4.1.3 Multiplicação e Preparo do Inóculo de *C. graminicola*..... 36
4.1.4 Análises Estatísticas de Parâmetros Genéticos da Resistência..... 38
4.2 MARCADORES MOLECULARES..... 39
4.2.1 Extração do DNA Genômico..... 39
4.2.2 Genotipagem com o Marcador SSR..... 40
4.2.3 Genotipagem com o Marcador AFLP..... 42
4.2.4 Regressão Linear Múltipla..... 44
4.2.5 Construção do Mapa de Ligação..... 45
4.2.6 Localização dos QRLs através do Mapeamento por Intervalo Composto..... 45
5 CAPÍTULO I..... 46
5.1 Resistência de progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose do colmo..... 47
6 CAPÍTULO II..... 64
6.1 Mapeamento de locos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho..... 65
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 115
ANEXO 1– Distribuição mensal da precipitação (mm) e da temperatura (°C)..... 128

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho apresenta destaque no setor agropecuário brasileiro. A importância social e econômica do grão se deve ao fato de ser fundamental na alimentação humana, da inclusão em produtos derivados e pela utilização direta na cadeia produtiva de suínos e aves.

A produção da cultura safra 2012/2013 destacou-se no setor agropecuário brasileiro. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), a produção do grão chegou a 80 milhões de toneladas. Apesar do crescente aumento na produção de milho no Brasil nos últimos anos, a produtividade do cereal não atingiu o máximo potencial produtivo, devido ao aumento da incidência e severidade de doenças na cultura. Entre as doenças, estão as podridões da base do colmo (PBC), as quais causam redução na produção e qualidade dos grãos. Entre as podridões do colmo destaca-se a antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. O fungo pode infectar qualquer parte da planta e estádios de desenvolvimento. Esse patógeno é responsável pela necrose dos tecidos internos do colmo, interrupção do fluxo de nutrientes do colmo para as espigas e posteriormente pelo quebramento dos colmos.

A ocorrência desta doença tem aumentado significativamente nos últimos anos, em todas as regiões de cultivo do Brasil. O aumento do cultivo de segunda época e o incremento das áreas no sistema plantio direto sem rotação de culturas associado ao uso de híbridos suscetíveis acarretou um aumento progressivo na severidade da doença em função da elevada capacidade do patógeno sobreviver em resíduos culturais, resultando no rápido acúmulo de inóculo nas áreas de cultivo (COSTA et al., 2008).

A maneira mais eficaz de controlar a doença é através da resistência genética. Esse método é almejado por ser mais barato, eficiente e de simples utilização (MATIELLO, 2004; SILVA, 2006). O entendimento da base genética da resistência de milho à antracnose do colmo aliado ao mapeamento molecular de regiões genômicas associadas à QRLs (locos de resistência quantitativa) neste patossistema, possibilitará individualizar os locos de resistência bem como quantificar o efeito dos mesmos na expressão fenotípica da resistência. Pela complexidade para estudar a genética da interação milho x *C. graminicola* existem poucos trabalhos na literatura relatando a localização genômica de genes de resistência neste patossistema.

Neste sentido, este trabalho permitirá mapear posições genômicas responsáveis pela resistência a *C. graminicola* bem como auxiliar no entendimento das bases genéticas da resistência de milho tropical a este patógeno.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO MILHO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) desponta no segmento agropecuário brasileiro, pela importância socioeconômica, pela área de cultivo bem como por constituir um dos principais insumos agrícolas no complexo industrial. O cereal é amplamente utilizado na alimentação humana, sendo os grãos transformados em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose, flocos para cereais matinais dentre outros produtos utilizados na dieta humana. Além disso, tem participação direta nas cadeias produtivas de aves e suínos. O Brasil destaca-se no cenário internacional como um dos principais países produtores de carne, o que demanda um elevado consumo interno desse grão para a alimentação animal.

O Brasil encontra-se entre os principais produtores mundiais de milho, ocupando a terceira posição, com produção de aproximadamente 80 milhões de toneladas, atrás dos Estados Unidos da América e da China com 273,83 e 205,60 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2013). A produção de milho no Brasil na safra 2012/2013 foi considerada recorde, com evolução de 9,6% em relação à safra anterior (CONAB, 2013). O Paraná é considerado o maior produtor nacional de milho, e grande parte da produção são consumidos no próprio estado, prioritariamente nas atividades pecuárias, relacionadas à avicultura e a suinocultura (ZANOLLA; GALANTE, 2004).

Apesar da redução de 13% na área de cultivo do milho no Paraná na safra 2012/2013, a produção aumentou 4% quando comparada à safra 2011/2012, possivelmente pelo incremento de 19% na produtividade média de grãos do estado. A área cultivada na safra 2012/2013 foi de 845.219 ha, com produção total de 6.891.206 toneladas e produtividade média de 8.158 kg ha^{-1}(SEAB, 2013). A produtividade da cultura vem crescendo gradativamente nos últimos anos embora o potencial produtivo não tenha atingido o seu máximo. Isto se deve a inúmeras limitações relacionadas a estresses abióticos e bióticos que incidem sobre a cultura, inviabilizando alcançar o máximo potencial genético deste cereal. Dentre os limitadores bióticos destacam-se as doenças. Nos últimos anos tem aumentado à incidência/severidade das podridões da base do colmo (PBC), causadas por um complexo de patógenos, onde o fungo *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose do colmo, destaca-se como principal limitador da cultura. O patógeno pode infectar qualquer parte da planta

independente do estádio de desenvolvimento. Os danos na produção de grãos são consequências diretas da ação do patógeno sobre a cultura como: necrose dos tecidos internos do colmo, interrupção do fluxo de nutrientes do colmo para as espigas bem como pelo quebramento dos colmos na lavoura.

Estimativas de danos na produtividade de grãos ocasionados pela podridão do colmo variam de zero a 40%, dependendo do genótipo, do ambiente e da época de infecção (CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1992; KELLER; BERGSTROM; CARRUTHERS, 1986; PERKINS, HOOKER, 1979; SMITH, 1976; MATIELLO et al., 2013). Diante do potencial destrutivo desta doença, o emprego de genótipos resistentes apresenta-se como estratégia promissora e eficiente para o controle de *C. graminicola.*

2.2 PODRIDÕES DO COLMO EM MILHO

As podridões do colmo tornaram-se uma das principais causas da redução na produtividade da cultura do milho no mundo. São causadas por diversos patógenos, os quais variam na incidência/severidade de acordo com o ambiente e com as condições climáticas (KELLER; BERGSTROM, 1988).

Nos Estados Unidos, os agentes causais das podridões compreendem as espécies: *Giberella zea* (Schwien) Petch, *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils, *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton e espécies do gênero *Fusarium [F. verticillioides* (Sacc.) Niremberg, *F. proliferatum* (Matsush.) Niremberg e *F. subglutinans* (Wollenw.) Reinking] (BYRNES; CARROL, 1986; GATCH; MUNKVOLD, 2002). No Brasil, os principais fungos associados à podridão de colmo são: *C. graminicola, S. maydis, S. macrospora* (Earle.) Sutton, *F. graminearum* (Earle.) Sutton e *F. moniliforme* Shel. (BALMER; PEREIRA, 1987; DENTI; REIS, 2001; PEREIRA; PEREIRA, 1976; REIS; CASA, 1996). Para Gilbertson, Brown e Ruppel (1985), *C. graminicola* e *G. zea* (Schwien) Petch, são os patógenos mais agressivos dentre as espécies causadoras da podridão do colmo. No Brasil, estudos indicam *C. graminicola* como um dos agentes causais mais predominantes nos colmos de milho com sintoma de podridão (DENTI; REIS, 2003; COSTA et al., 2010).

Na década de 80 nos Estados Unidos, os danos na produção de grãos de milho decorrentes da antracnose do colmo chegaram a 28% (CARSON; HOOKER, 1982). Estudos demonstram que *C. graminicola* tem se tornado um dos principais agentes causais das podridões de colmo (CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1990). Somente

nos Estados Unidos este patógeno causa perdas anuais significativas na produtividade, com estimativas de mais de um bilhão de dólares (OESTREICH, 2005). Williams e Willis (1963) relataram que *C. graminicola* foi isolado em 50% dos colmos infectados no campo experimental de Ohio, assim como Hooker e White (1976) relataram que 78% dos colmos analisados estavam infectados com o patógeno nos campos de produção de Illinois.

No Brasil, Denti e Reis (2003) quantificando os patógenos associados a podridões do colmo em lavouras do Planalto Gaúcho, na safra 1997/1998, relataram a predominância de *C. graminicola* (62,6%) nos colmos analisados. Possivelmente a maior incidência do patógeno esteja associada à maior frequência de chuvas durante o período de crescimento e desenvolvimento da cultura. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2005) avaliando a incidência de podridões do colmo em diferentes sistemas de produção de milho, verificaram que *C. graminicola* foi o principal patógeno associado às podridões do colmo na cultura. Estimativas de patógenos associados à podridão do colmo em milho, realizados pela Embrapa Milho e Sorgo, evidenciaram a predominância de *C. graminicola* em 62% das plantas com sintomas de podridão do colmo (COSTA et al., 2008).

Costa et al. (2010) avaliaram a incidência de *C. graminicola* em diferentes partes do colmo de híbridos comerciais, e relataram incidência de *C. graminicola* variando de 26,3 a 62,5%. O patógeno foi detectado em todos os segmentos do colmo (segundo entrenó, entrenó de inserção da espiga e entrenó abaixo do pendão), com predomínio no terço médio superior para a maioria dos híbridos estudados.

Cota et al. (2009) relataram queda na produtividade de grãos em híbridos de milho resistentes e suscetíveis a podridão do colmo causada por *C. graminicola* em duas safras agrícolas. Os autores demonstraram redução de 27,5% para todos os híbridos avaliados, com reflexo significativo na produtividade da cultura.

Vieira et al. (2012) avaliaram o impacto da desfolha realizada em diferentes estádios fenológicos sobre a incidência de podridões da base do colmo bem como na percentagem de colmos quebrados em milho, e demonstraram que desfolhas realizadas nos estádios V8 e V12 não aumentaram a incidência de podridões da base do colmo (PBC) nem mesmo a percentagem de colmos quebrados. Por outro lado, desfolhas mais tardias (V16 e V20) aumentaram tanto a incidência das PBC quanto a percentagem de colmos quebrados.

Muitos fatores contribuem para o aumento da severidade das podridões do colmo na cultura do milho. Alterações na relação fonte e dreno de nutrientes durante a fase de enchimento de grãos podem favorecer a ocorrência das podridões do colmo (REIS; CASA, 1996). De acordo com Blum et al. (2003) híbridos com baixa relação fonte e dreno (superprecoces), são os mais afetados pelas podridões do colmo. Por exemplo, o híbrido superprecoce P32R21 foi mais atacado pelas podridões do colmo do que os híbridos mais tardios, exceto para a podridão ocasionada por *Stenocarpella maydis*. Segundo Fancelli (2000), quanto maior a precocidade de um híbrido menor é a área foliar. A redução da área foliar aumenta a contribuição de fotoassimilados do colmo para o enchimento de grãos. Este fato possivelmente contribui para a maior incidência de podridões do colmo em híbridos superprecoces.

O aumento da população de plantas na lavoura também pode favorecer as podridões da base do colmo (PBC). Sangoi et al. (2000) avaliando a incidência e a severidade das principais doenças foliares, de colmo e de espigas de híbridos de milho no Planalto Catarinense a partir de diferentes densidades de semeadura, observaram que o aumento da população de plantas promoveu um incremento na incidência de doenças de colmo causadas por *F. moniliforme, C. graminicola* e *D. maydis.*

Dentre os principais fatores que contribuem para o aumento da severidade das PBC na cultura do milho, destacam-se a ampla adoção do sistema plantio direto sem a devida rotação de culturas (BARBOSA, 2010). Em áreas com cultivo safrinha em sistema plantio direto, a antracnose do colmo foi reconhecida como um dos principais problemas associados a cultura (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). Outros fatores como o aumento das áreas irrigadas (BARBOSA, 2010; BRASIL; CARVALHO, 1998), a aplicação excessiva de adubação nitrogenada (TOMAZELA et al., 2006) e as alterações climáticas (PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006; COSTA et al., 2010) podem contribuir para o aumento da antracnose do colmo na cultura.

2.3 DANOS ASSOCIADOS À ANTRACNOSE DO COLMO

Diversos trabalhos têm demonstrado o potencial da antracnose do colmo em causar danos no potencial de rendimento da cultura. Perkins e Hooker (1979) relataram redução superior a 17,2% em híbridos sob condição de infecção natural. Para os autores os danos foram associados à morte prematura das plantas antes do período de enchimento de grãos. A partir da inoculação de híbridos suscetíveis com *C. graminicola*

White, Yanney e Natti (1979) estimaram reduções superiores a 40% no rendimento de grãos quando comparado com plantas não inoculadas.

Estimativas de danos na produção, causados por *C. graminicola*, têm sido relatado em diversos países. Nos EUA, os danos na produção de grãos variaram de 10 a 20% em híbridos suscetíveis. Por outro lado, em países como a Índia, França e as Filipinas as estimativas chegam até 50% (CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1992; CARSON; HOOKER, 1981; PERKINS; HOOKER, 1979; SHURTLEEF, 1992; SMITH, 1976; WHITE; YANNEY; NATTI, 1979). Nos Estados Unidos, epidemias severas chegaram a inviabilizar a cultura de milho doce no Estado de Indiana, durante dois anos após a detecção a campo da doença (WARREN et al., 1973; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

Segundo Callaway, Smith e Coffman (1990), à antracnose do colmo é uma doença com distribuição mundial e a incidência da infecção irá incrementar no futuro, principalmente pela contínua redução das práticas adequadas de manejo a campo (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999), bem como pelo aumento na área de cultivo, em função da crescente demanda mundial por etanol (FREY et al., 2011).

Silveira, Figueiredo e Cruz (1965) relataram pela primeira vez a presença da antracnose do milho no Brasil, no município de Campinas, Estado de São Paulo, em área de produção de sementes híbridas, com redução estimada de 30% na produção de grãos. Desde então, a antracnose do colmo tornou-se limitante à produtividade nas lavouras de milho. As grandes extensões de áreas cultivadas, a utilização da sucessão ao invés da rotação de culturas e o uso de cultivares com base genética estreita, contribuíram para o aumento da incidência de *C. graminicola* nas principais regiões produtoras de milho (CRUZ et al., 1996). Para Ribeiro et al. (2005) a recomendação de cultivares de milho com base genética estreita influencia na incidência de podridões de colmo, principalmente quando o milho é cultivado em monocultura no sistema plantio direto, independente do nível tecnológico adotado na lavoura.

Nazareno (1989) relatou redução na produção de grãos variando de 12 a 40% no estado do Paraná, os quais foram dependentes do ano, do local e do híbrido utilizado. Recentemente Matiello et al. (2013), estimaram danos significativos na produção de um híbrido suscetível inoculado com *C. graminicola* variando de 16,1 à 20,2%.

2.4 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DE *C. graminicola*

O fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils é o agente causal da antracnose do colmo e da folha em milho (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987a). A fase sexual (forma perfeita) de *C. graminicola* é denominada *Glomerella graminicola* (Politis). Essa fase raramente é observada na natureza e caracteriza-se pela presença de peritécios, no interior dos quais são produzidas ascas cilíndricas clavadas, que contêm os ascósporos hialinos e unicelulares (CASELA; FERREIRA, 1998). Na fase assexual (forma imperfeita) o patógeno produz frutificações denominadas de acérvulos. No interior são produzidos conidióforos eretos, hialinos e falciformes, onde na parte terminal são gerados os conídios. Os conídios são unicelulares, medindo aproximadamente 30µ de comprimento por 5µ de largura, hialinos e falciformes (FERREIRA; CASELA, 2001; VAILLACOURT; HANAU, 1992).

Os conídios podem permanecer viáveis de semanas a meses, dependendo da umidade relativa do ar, desde que estejam recobertos pela matriz mucilaginosa composta de polissacarídeos e proteínas (BERGSTROM; NICHOLSON, 1983; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; NICHOLSON; MORAES, 1980). Normalmente, a dispersão dos conídios é de curta distância e ocorre por respingos de chuva e pelo vento. Bergstrom e Nicholson (1983) relataram que a matriz mucilaginosa não está envolvida apenas na sobrevivência dos conídios, mas também na indução da patogenicidade. Em sementes infectadas, o patógeno pode sobreviver por até três anos (LIPPS, 1988; WARREN, 1977).

Os conídios produzidos em resíduos culturais deixados na superfície do solo constituem a fonte de inóculo primário para a próxima cultura (JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011; LE BEAU; STOKES; COLEMAN, 1951; LIPPS, 1985; NAYLOR; LEONARD, 1977). A esporulação nas lesões de folhas maduras (antracnose foliar) servem como inóculo secundário, o qual será responsável tanto por novas lesões foliares como pela infecção do colmo (LIPPS, 1988; WHITE; YANNEY; NATTI, 1979). Dessa forma, verifica-se que o cultivo de milho sob sistema de monocultivo favorece o aumento da ocorrência da antracnose do colmo, pois a incidência da doença apresenta uma relação direta com a quantidade de resíduos culturais infectados presentes na superfície do solo (BYRNES; CARROL, 1986; DEL RIO; ZÚNGIA, 1991) e, consequentemente, com o maior período de sobrevivência do patógeno associado aos resíduos culturais (JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011; SNYMAN; WEHNER, 1988).

O *C. graminicola*, pode infectar toda a planta em diferentes estádios de desenvolvimento, causando danos relacionados à redução do potencial de rendimento bem como na qualidade dos grãos produzidos (CHRISTENSEN; WILCOXSON, 1966). Três tipos de sintomas podem ser observados em plantas infectadas por *C. graminicola*: queima das folhas, seca do ponteiro e a podridão do colmo (CARSON, 1999; WHITE; HUMY, 1976). Os sintomas da antracnose foliar podem aparecer em qualquer estádio de desenvolvimento da cultura e caracterizam-se pela presença de lesões escuras de tamanho variável (0,5 a 1,5 cm), de forma ovalada a elíptica, podendo apresentar bordas irregulares que podem coalescer e ocasionar dano extenso às folhas. Nessas lesões formam-se numerosos acérvulos, os quais permitem a identificação da doença sob condições de campo e em laboratório (FERREIRA; CASELA, 2001).

No colmo do milho os sintomas são mais visíveis após o estádio de florescimento pleno da cultura. Na casca caracterizam-se por lesões encharcadas, estreitas e elípticas, as quais se tornam posteriormente marrom-escuras a negras que podem coalescer e formar manchas ou estrias um pouco deprimidas. O tecido interno do colmo apresenta coloração marrom-escura podendo desintegrar-se totalmente (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; COSTA et al., 2010). Com certa frequência pode ocorrer à seca do ponteiro, sintoma conhecido como “top dieback” onde, inicialmente, observa-se o murchamento das folhas apicais, que posteriormente secam (COSTA et al., 2008; COTA et al., 2009).

Skoropad (1967) relata que a germinação e formação dos apressórios podem ocorrer em uma faixa maior de temperatura de 15 a 35°C, mas a penetração no hospedeiro ocorre numa amplitude de 25 a 30°C. De acordo com Leonard e Thompson (1976), a temperatura ideal para o desenvolvimento de *C. graminicola* é de 30°C podendo haver variação em relação ao cultivar adotado.

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores do DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 80 (SOLLER, BECKMANN, 1983). Podem ser obtidos por métodos que combinam o uso de enzimas de restrição à hibridização entre seqüências complementares de DNA, como no caso do RFLP ou pela reação de polimerização em cadeia (PCR). O grande potencial dos marcadores moleculares no melhoramento reside no fato de serem praticamente ilimitados em número, de fácil detecção e por evidenciar

padrão de herança mendeliana, não sendo influenciados pelo ambiente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). De acordo com Milach (1998) os marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são geneticamente herdados. Marcadores de DNA têm sido utilizados para identificação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma, seleção auxiliada por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos, entre outros (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; MILACH, 1998).

Federizzi (1998) enfatiza que o maior impacto dos marcadores moleculares no melhoramento vegetal será através do emprego da seleção assistida para identificação de genótipos superiores em populações segregantes. O surgimento das técnicas baseadas nos marcadores moleculares de DNA acelerou os métodos de seleção/condução nos programas de melhoramento. A partir da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) e do mapeamento genético, o tempo de liberação de novos genótipos, tamanho da população analisada, além dos custos operacionais dos programas puderam ser reduzidos.

Nos últimos anos, os marcadores moleculares foram utilizados com maior frequência nos programas de melhoramento na seleção indireta de marcadores moleculares ligados a genes de interesse agronômico, pois podem ser utilizados em qualquer estádio de desenvolvimento da planta, além de não serem influenciados pelo ambiente (GUPTA et al., 1999).

A utilização dos marcadores moleculares na construção de mapas genéticos saturados tem permitido consideráveis avanços no estudo genético de plantas, pois possibilitaram a seleção assistida por marcadores moleculares para características agronômicas de difícil seleção a campo pelos programas de melhoramento. A base genética da utilização dos marcadores é o polimorfismo de fragmentos amplificados entre os genótipos parentais, seguido da avaliação da segregação dos alelos do marcador numa população segregante.

No início da década de 80 Kery Mulis desenvolveu um processo simples e eficiente de multiplicação exponencial de moléculas de DNA *in vitro,* a partir de uma única molécula de DNA, técnica conhecida como Reação em Cadeia da *Polimerase*, ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica consiste em ciclos repetidos de

replicação de moléculas de DNA *in vitro*. Cada nova molécula sintetizada em um ciclo é utilizada como molde no ciclo seguinte, o que resulta no aumento exponencial do número de moléculas de DNA amplificadas (BORÉM, 2009).

A análise direta do DNA através dos marcadores moleculares permitiu acessar pela primeira vez as variações diretas do genótipo, eliminando completamente as inconsistências do fenótipo, o que resulta normalmente em baixos coeficientes de herdabilidade (MILACH, 1998).

Vários marcadores moleculares baseados em DNA já foram desenvolvidos. Dentre eles, podem-se destacar os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) (TAUTZ, 1989) e os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995). Estes marcadores apresentam diferenças técnicas, em termos de custo, velocidade, quantidade de DNA, grau de polimorfismo, precisão da estimativa das distâncias genéticas e poder estatístico dos testes (GARCIA et al., 2004). Embora cada tipo de marcador esteja associado com algumas vantagens e desvantagens, a escolha do marcador depende na maioria das vezes da aplicação pretendida e dos custos envolvidos na utilização (GUPTA et al., 1999).

2.5.1 Marcadores Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*)

Microssatélites ou SSR's são sequências de DNA muito curtas, normalmente constituídas de 2 a 10 nucleotídeos repetidos em tandem, sendo o elemento repetido mais comum o di-nucleotídeo AT (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). De acordo com Chin, Senior e Smith (1996) os SSRs ocorrem de maneira relativamente dispersa nos cromossomos de milho, são codominantes e apresentam um satisfatório nível de polimorfismo. Os locos SSRs apresentam regiões flanqueadoras conservadas dentro da espécie e entre espécies de gêneros correlacionados (HOPKINS et al., 1999), permitindo, desta forma, a seleção de *primers* específicos que amplificam via PCR, fragmentos contendo as sequências repetitivas.

A utilização do marcador microssatélite se deve ao alto nível de polimorfismo encontrado nos locos. A variação no tamanho dos produtos de PCR é resultante da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite, a qual pode ser originada por *crossing-over* desigual ou por erro da DNA *polimerase* durante o processo de replicação das moléculas de DNA (*slippage*) (BORÉM, 2009).

Os SSRs ocorrem com alta frequência na maioria dos genomas eucariotos, podem ser muito informativos, multialélicos e reprodutíveis. Foram propostos a fim de ultrapassar as limitações associadas com outros tipos de marcadores (GARCIA et al., 2004). A maior dificuldade está na obtenção de *primers* específicos pelo fato de requerer conhecimento prévio da sequência de DNA do organismo em estudo.

Marcadores microssatélites foram desenvolvidos e estão disponíveis para diversas espécies agrícolas, entre elas: soja (RONGWEN et al., 1995), arroz (ZHAO; KOCHERT, 1993), milho (TARAMINO; TINGEY, 1996). Segundo Prasanna et al. (2010), os SSR são os mais utilizados em milho, devido a grande disponibilidade de sequências depositadas em bancos de dados de domínio público (Maize GDB; http:// www.maizegdb.org), associados a simplicidade e eficácia na utilização.

2.5.2 Marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os marcadores AFLPs (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) são desenvolvidos a partir da dupla digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição (corte raro e frequente) aliado a rapidez e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Esta técnica foi desenvolvida por Vos et al. (1995) e envolve quatro etapas distintas: (a) digestão do DNA genômico com a combinação de duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente; (b) ligação de adaptadores com sequência conhecida nas duas extremidades de cada fragmento; (c) pré-amplificação de fragmentos, onde um subconjunto de fragmentos é amplificado com *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na extremidade 3’ e (d) amplificação seletiva dos fragmentos pré-amplificados, com *primers* contendo 3 nucleotídeos seletivos na extremidade 3’.

A grande vantagem deste marcador é a detecção de um número maior de fragmentos polimórficos num único gel num curto período de tempo, permitindo desta forma, uma rápida saturação dos mapas genéticos (CASTIGLIONI et al., 1999). Em várias espécies vegetais a utilização do AFLP foi eficiente na construção de mapas de ligação. As desvantagens apresentadas por este marcador dizem respeito a várias etapas e reagentes necessários a sua obtenção, e a incapacidade de distinguir genótipos heterozigotos dos homozigotos para os alelos do marcador (expressão dominante). Em relação ao último, Gerber et al. (2000) sugerem que o elevado número de locos

polimórficos revelados pela técnica contrabalancem a perda de informação resultantes da expressão fenotípica do marcador.

A alta frequência de fragmentos polimórficos em cada reação de amplificação do marcador AFLP, juntamente com a alta reprodutibilidade torna esta tecnologia uma ferramenta importante para a detecção de polimorfismo, bem como para o mapeamento de regiões genômicas associadas a genes de interesse agronômico em populações segregantes de diversas culturas agrícolas (GRUPTA et al., 1999).

2.6 MAPEAMENTO GENÉTICO

A partir da década de 80, com o advento dos marcadores de DNA, o mapeamento genético de genes de interesse tornou-se ilimitado para um grande número de espécies vegetais (BOSTEIN et al., 1980).

A disponibilidade de marcadores altamente polimórficos, sem efeito ambiental, aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação bem saturados para a maioria das espécies vegetais de interesse agronômico, até mesmo para culturas perenes, como espécies florestais e frutíferas (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

A construção de mapas de ligação tem como base a análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, é computadorizada. Programas como “Mapmaker” (LANDER et al., 1987), “Linkage 1” (SUITER; WENDELL; CASE, 1983), “Gmendel” (LIU; KNAPP; GMENDEL, 1992) foram desenvolvidos para auxiliar na análise de ligação dos marcadores visando à construção de mapas genéticos (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Para a construção de um mapa genético deve-se primeiramente escolher o tipo de população segregante. Este passo envolve a escolha de genitores e a determinação do tipo de população (F_2, retrocruzamento), sendo considerada uma etapa crítica para a construção do mapa de ligação (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996). Independentemente do tipo de população, duas condições básicas devem ser atendidas: o máximo de polimorfismo entre os genitores, e que sejam maximizados o desequilíbrio de ligação entre os locos (PATERSON; TANKSLEY; SORRELLS, 1991; TANKSLEY, 1993). As gerações F_2, retrocruzamentos, cruzamentos entre heterozigotos e linhagens duplo-haplóides são as populações mais usadas na construção de mapas de ligação (TANKSLEY, 1993; LYNCH; WALSH, 1998).

Para Coelho (2000) indivíduos da geração F_2 podem ser portadores de dois gametas informativos, enquanto em outras populações (retrocruzamento), cada indivíduo carrega somente um gameta informativo, sendo o outro complemento não informativo. Assim, de modo aproximado, um indivíduo da geração F_2 pode fornecer duas vezes mais informações que um indivíduo oriundo de uma geração de retrocruzamento (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Esta relação é aproximada porque nem todos os genótipos de F_2 são informativos (PATERSON; TANKSLEY; SORRELLS, 1991; LIU, 1998). A escolha do tipo de população segregante mais adequada para a construção de mapas de ligação e para o mapeamento de genes está relacionada como tipo de marcador molecular (TANKSLEY et al., 1988). O máximo de informação genética é alcançado quando se utiliza uma população da geração F_2 e marcadores de expressão codominante (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996).

Para Liu (1998), locos que apresentam distorção de segregação mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação entre marcadores podendo gerar falsos positivos. Desta forma é recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorção da segregação mendeliana esperada para não comprometer a qualidade do mapa (YAO; BAN; BRANDLE, 1999; BEARZOTI, 2000). No entanto, há relatos na literatura do uso de marcadores com distorção de segregação mendeliana para a construção de mapas de ligação. A partir da frequência de recombinação entre pares de marcadores é possível mensurar a freqüência de gametas recombinantes entre dois locos, possibilitando a construção do mapa de ligação bem como a análise de mapeamento (STAUB; SERQUEN; GUPTA, 1996).

Do ponto de vista biológico, os grupos de ligação são definidos como grupos de genes, cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo. Estatisticamente o grupo de ligação é definido pelo conjunto de locos que são herdados conjuntamente (LIU, 1998).

A localização e o mapeamento de QTL's (*Quantitative Trait Loci*), estudos de sintenia e clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a apresentar importância para programas de melhoramento das mais variadas espécies vegetais (LEE, 1995). Uma das aplicações mais importantes dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos, altura da planta, teor de proteína, resistência a doenças, que resultam da ação cumulativa de um conjunto de genes (CARNEIRO; VIEIRA, 2002). Essas

características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTLs (TANKSLEY, 1993).

O mapeamento de QTLs possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como sua localização cromossômica, modo de ação gênica (aditividade, dominância, heterose e epistasia), além de possibilitar a decomposição da interação genótipo por ambiente para cada QTL (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; AUSTIN; LEE, 1998). A partir da detecção de marcadores ligados a características de interesse agronômico, é possível selecionar os indivíduos com base no fenótipo do marcador, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo, evitando desta forma a influência do ambiente. A seleção assistida por marcadores (SAM) é utilizada com êxito principalmente, nos casos em que a característica de interesse é de avaliação difícil e de baixa herdabilidade, o que pode reduzir o tempo e os custos dos programas de melhoramento (SOUZA, 2001).

Várias metodologias estão disponíveis para o mapeamento de QTLs como os modelos lineares (ANOVA e regressão linear), mapeamento por intervalo (“interval mapping” ou “flanking-marker analysis”), mapeamento por intervalo composto (“composite interval mapping”) (ZENG, 1993; 1994; JANSEN, 1993) e mapeamento multiponto (“multipoint mapping”) (KEARSEY; HYNE, 1994).

Os procedimentos mais simples para detecção de QTLs são os modelos lineares que analisam, separadamente, a diferença entre os valores fenotípicos médios para cada marcador (EDWARDS et al., 1987), não sendo necessária a construção de mapas de ligação. A maior limitação desta metodologia está associada à distância do marcador e o QTL. Quanto maior for à distância entre o QTL e o marcador, menor será a probabilidade de detectá-lo em função da possibilidade de recombinação entre o marcador e o QTL. Adicionalmente, a magnitude do QTL, pelo mesmo motivo, é normalmente subestimada. Outro inconveniente é que não é possível determinar a posição do QTL no genoma (LYNCH; WALSH, 1998).

O mapeamento por intervalo (“interval mapping”) foi proposto por Lander e Botstein (1989) e tem sido alternativa para aumentar o poder de detecção das associações, permitindo estimar o efeito e a posição dos QTLs. Esse método tem como base informações de segregação de pares de marcadores adjacentes como unidades de análise, utilizando o método de máxima verossimilhança para estimar a freqüência de recombinantes e a magnitude do efeito do QTL no intervalo entre dois marcadores ligados (LYNCH; WALSH, 1998). Uma desvantagem atribuída ao mapeamento por

intervalo é para outros QTLs fora do intervalo que são ignorados, podendo resultar em duas conseqüências principais. A variação genética devida a esses outros QTLs é residual, o que pode diminuir a precisão das estimativas e o poder dos testes. Além disso, eventuais QTLs que estejam ligados ao intervalo em questão interferem no processo de estimação, levando, em casos extremos, a declarar a existência de um QTL no intervalo quando na realidade não existe (BEARZOTI, 2000).

Para contornar os problemas associados ao mapeamento por intervalo Jansen (1993) e Zeng (1993, 1994) propuseram o mapeamento por intervalo composto, metodologia que leva em consideração QTLs fora do intervalo em questão por meio da regressão linear múltipla. Além de proporcionar maior resolução no mapeamento, permite o uso de dados obtidos em vários ambientes, o que possibilita estudar os efeitos da interação QTLs x ambientes.

Os grupos ou “bulks” segregantes (BSA) podem ser empregados em uma etapa inicial das análises de mapeamento com o intuito de diminuir o número de locos marcadores a serem analisados numa população segregante. A técnica consiste basicamente, na identificação de polimorfismo entre dois "bulks" de DNA constituídos a partir de indivíduos de uma população segregante pertencentes aos extremos do espectro fenotípico da característica em estudo (MICHELMORE; PARAN; KESSELI, 1991). É esperado que indivíduos de um mesmo "bulk" sejam monomórficos para locos marcadores ligados a genes que controlam o fenótipo utilizado para a composição do "bulk", porém polimórficos para aqueles não ligados. Sendo assim, os dois "bulks" resultantes diferem entre si apenas para as regiões associadas a genes, sendo monomórficos para todas as outras regiões genômicas.

A grande vantagem desta metodologia é não precisar analisar toda a população segregante para a identificação de marcadores ligados a genes de interesse. Apenas os marcadores polimórficos entre os "bulks" serão genotipados em toda a população segregante, visando à confirmação da ligação bem como para estimar a distância (cM) do marcador molecular e a região genômica de interesse. Vários estudos demonstraram a utilização eficiente do método BSA, na identificação de genes de resistência a patógenos em culturas agrícolas, como míldio em alface (MICHELMORE; PARAN; KESSELI; 1991), *Pseudomonas syringae* em tomate (MARTIN; WILLIAMS; TANKSLEY, 1991) e *Phaeosphaeria maydis* em milho (LOPES, 2003).

2.7 CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA

Um dos maiores avanços tecnológicos da agricultura é representado pelo emprego da resistência genética no controle de patógenos. A utilização de cultivares resistentes é um método barato e de simples utilização. O controle de doenças em algumas culturas é realizado, quase que exclusivamente, por meio da resistência genética, tais como as ferrugens e carvões dos cereais e da cana-de-açúcar, as murchas vasculares em hortaliças e as viroses na maioria das culturas agrícolas (SILVA, 2006).

O efeito da luz na expressão de sintomas em muitas interações patógeno x hospedeiro tem sido registradas (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977). Alguns relatos indicam que a alta intensidade luminosa causa um decréscimo na severidade de *C. graminicola* em milho, diminuindo as lesões ocasionadas pelo patógeno devido ao acúmulo de antocianina ao redor das lesões (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977; SCHALL; NICHOLSON; WARREN, 1995). As antocianinas são glicosídeos de antocianidinas e representam o produto final do metabolismo fenólico dos flavonóides. Este fato sugere que o metabolismo fenólico (altamente dependente de luz) esteja envolvido na resistência de milho a *C. graminicola* (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977).

A precocidade de híbridos, o aumento da população de plantas e a desfolha durante o florescimento podem influenciar na incidência de podridões do colmo em milho, pois alteram a distribuição dos fotoassimilados entre as diferentes partes da planta (BLUM et al., 2003; SANGOI et al., 2000; BLUM et al., 1999).

Em relação ao controle genético da resistência no patossistema milho x *C. graminicola*, os estudos indicam herança oligogênica com ação gênica aditiva (CARSON; HOOKER, 1981; TOMAN; WHITE, 1993). Embora, em alguns casos genes de resistência com ação de dominância tenham sido identificados (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987a).

Por meio da análise dialélica entre 10 linhagens de milho, Lim e White (1978) verificaram que a resistência à antracnose do colmo é condicionada por genes com efeitos genéticos aditivos e não aditivos. Neste estudo, os efeitos aditivos foram mais importantes para a resistência à antracnose do colmo, embora os efeitos não aditivos também tenham sido estimados.

Carson e Hooker (1981) estudando cinco conjuntos de cruzamentos envolvendo linhagens contrastantes para resistência à *C. graminicola*, através da análise de médias

de gerações, indicaram que os efeitos genéticos aditivos representaram mais de 90% do total da variância fenotípica entre as gerações, embora em alguns cruzamentos os desvios de dominância foram mais importantes.

Pereira, Balmer e Miranda Filho (1989), avaliando o percentual de área infectada por *C. graminicola* de quinze famílias originárias do cruzamento de seis linhagens endogâmicas contrastantes para resistência, demonstraram que os efeitos genéticos aditivos foram significativos na maioria das famílias, sendo que apenas duas famílias não evidenciaram este efeito. Da mesma forma, Matiello et al. (2012) ao estudarem a herança da resistência à antracnose do colmo em milho tropical a partir de duas famílias (Das21 x Das86 e Das64 x Das86) encontraram herança contrastante da resistência entre as famílias. Em Das21 x Das86 houve predomínio da ação gênica de dominância, enquanto que na Das64 x Das86 a maior contribuição foi da ação gênica aditiva.

Callaway, Smith e Coffman (1990) encontraram heterose e capacidade de combinação (específica e geral) significativas, indicando que tanto efeitos aditivos, como não aditivos, contribuíram para o controle genético da resistência à antracnose do colmo em milho, embora os efeitos aditivos tenham sido de maior magnitude.

Máximo (2013) estudando o controle genético da resistência de milho à antracnose do colmo em nove famílias derivadas de cruzamentos entre linhagens resistentes e suscetíveis à *C. graminicola*, demonstrou modo de herança semelhante entre as famílias, com predomínio de efeitos genéticos aditivos explicando em média 81,92%. Predomínio de ação gênica aditiva, associado a alta herdabilidade permitem inferir que os ganhos genéticos com a seleção lograrão êxito em programas de melhoramento, que buscam desenvolver populações de milho resistente à antracnose do colmo.

Na literatura a maioria dos estudos neste patossistema indica herança quantitativa da resistência. Badu-Apraku; Gracen e Bergstrom (1987b) analisando o número de internódios descoloridos relataram pela primeira vez, um único gene de resistência (herança qualitativa) com ação dominante para resistência à podridão do colmo. Posteriormente, Coelho et al. (2001) estudando a herança da resistência à antracnose foliar causada por *C. graminicola*, verificaram a ocorrência de herança monogênica com dominância completa para o alelo que confere resistência à antracnose foliar.

Existem indícios na literatura que a herança da resistência para a fase foliar e para a podridão do colmo manifesta-se independentemente, sugerindo que diferentes mecanismos de resistência estejam envolvidos para as duas fases da doença (LIM; WHITE, 1978; ZUBER et al., 1981; COELHO et al., 2001; REZENDE et al., 2004).

A resistência para cada fase pode ser controlada por vários genes com pequenos efeitos aditivos, ou por um ou poucos genes de grande efeito. Hooker (1976) verificou que os genes que conferem resistência à antracnose foliar em plântulas, plantas adultas e de colmo são diferentes. Nas folhas, o sistema que condiciona resistência na nervura central foi diferente daquele no limbo foliar. Para o autor a expressão da resistência indicou herança quantitativa com efeitos genéticos aditivos e dominantes, com predomínio da ação gênica de dominância para a suscetibilidade à antracnose do colmo. Posteriormente, Silva (1983) estimou o número de genes de resistência à infecção no limbo foliar variando de 1 a 4 genes e de 1 a 2 para infecção na nervura central, sendo que os efeitos aditivos e dominantes foram importantes para os dois tipos de infecção.

Para Pereira, Balmer e Miranda Filho (1989) a herança da resistência a *C. graminicola* não parece ser complexa. Apesar dos efeitos genéticos aditivos serem de maior magnitude, a presença de dominância em alguns locos e a imprevisível direção em alguns cruzamentos específicos, indica que os critérios de seleção artificial sejam adaptados para cada população sob seleção. Predomínio de efeitos genéticos aditivos, associados à alta herdabilidade, e a evidência de um pequeno número de genes controlando a resistência, sugerem que métodos simples de seleção, tais como a seleção recorrente fenotípica e a seleção massal seriam muito eficientes na obtenção de genótipos resistentes a este patógeno (CARSON; HOOKER, 1981; WHITE; YANNEY; NATTI, 1979).

Estudos revelam grande divergência em relação ao número de genes que controlam a resistência à podridão do colmo em milho. Carson e Hooker (1982) estudaram a localização de genes ou blocos gênicos condicionando resistência para a antracnose do colmo num híbrido altamente resistente, por meio da técnica de translocação recíproca. Os autores localizaram genes com maiores efeitos no braço longo dos cromossomos 1, 4 e 8 e nos dois braços do cromossomo 6.

Com o advento das técnicas associadas aos marcadores moleculares, vários genes condicionando resistência a patógenos já foram mapeados (MACMULLEN; SIMCOX, 1995). Jung et al. (1994) através do marcador molecular RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição) observou uma região genômica localizada no

cromossomo 4, fortemente associada a um loco de resistência quantitativa QTL (Quantitative Trait Loci), explicando mais de 50% da variação fenotípica para a resistência. Outras sete regiões genômicas associadas a alelos de resistência nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, foram identificadas por Matiello (2004), as quais explicaram de 2,1 a 14,7% da variação fenotípica para resistência à antracnose do colmo numa população de mapeamento de milho.

Frey et al. (2011) testaram quatro combinações híbridas de milho quase isogênicas (presença ou ausência) para o gene de resistência *Rcg*1. Os resultados demonstraram que os híbridos portadores do gene *Rcg*1, quando inoculados com *C. graminicola*, produziram 1.106 kg ha^{-1} a mais do que os híbridos que não tinham o gene de resistência. Adicionalmente, concluíram que a presença do *Rcg*1 não gerava impacto adaptativo sobre a produção e outras características agronômicas dos híbridos na ausência de *C. graminicola*. No entanto, a presença do gene de resistência *Rcg*1, proporcionou uma vantagem significativa em ambientes onde o patógeno é endêmico. Possivelmente, o *Rcg*1 pode contribuir para a redução do inóculo primário, atrasando o desenvolvimento da doença e possibilitando a redução da quantidade de inóculo para a safra subsequente. Desta forma reduzindo a probabilidade do patógeno se adaptar à presença do gene de resistência, conferindo assim, resistência mais durável a campo.

A antracnose do colmo tornou-se uma importante doença nos últimos anos, sendo reconhecida como um dos principais problemas da cultura do milho em áreas que adotam o sistema plantio direto sem rotação de culturas em áreas de monocultura (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). O manejo inadequado da cultura a campo possivelmente possibilitou um incremento na incidência das podridões do colmo até então de importância secundária. O aumento nas áreas de cultivo de segunda época e o incremento das áreas no sistema de plantio direto, sem rotação de culturas acarretou um incremento na incidência/severidade da doença. Em virtude disso, sabendo que a resistência genética é a principal forma de controle da doença, a utilização de ferramentas da biologia molecular, como o uso de marcadores moleculares associados a genes de resistência e o conhecimento da base genética da interação patógeno x hospedeiro neste patossistema, poderá contribuir de modo significativo para mapear as principais regiões genômicas associadas com locos de resistência à *C. graminicola*, facilitando desta forma a identificação/seleção de progênies resistentes a este patógeno pelos programas de melhoramento da cultura.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Este trabalho visou caracterizar a resistência/suscetibilidade de progênies $F_{2:3}$ de milho tropical bem como mapear posições genômicas associadas a genes de resistência à *C. graminicola* através de marcadores moleculares

3.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar a resistência/suscetibilidade das progênies $F_{2:3}$, das linhagens endogâmicas parentais e da geração F_1 à *C. graminicola*;

Estimar os parâmetros genéticos associados à resistência de progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose do colmo;

Localizar e mapear as posições genômicas associadas à QRLs à antracnose do colmo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Fazenda Escola “Capão da Onça”, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na safra agrícola de 2012/2013. A fazenda está localizada no Segundo Planalto Paranaense na latitude sul de 25º5’49’’ a 26º18’S, longitude de 48º34’ a 52º32’W e altitude média de 950m. O solo é classificado como CAMBISSOLO HÁPLICO Tb Distrófico típico com textura argilosa (EMBRAPA, 2006). Segundo 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 DO COLMO

4.1.1 Material Vegetal

A partir das linhagens endogâmicas L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) previamente caracterizadas por Torrecija (2012), foram obtidas as gerações F_1 e F_2. Os indivíduos da geração F_2 foram autofecundados para gerar as progênies $F_{2:3}$, as quais foram avaliadas fenotipicamente para resistência à antracnose do colmo em três experimentos de campo.

4.1.2 Experimentos de Campo

O sistema de semeadura utilizado foi o plantio direto na palha de aveia. 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 da Semeato, modelo PS-8, as áreas foram riscadas e adubadas com espaçamento entrelinha de 0,90 m e adubação de base ajustada para 300 kg ha^{-1} da fórmula 10-20-20 (NPK), seguido da semeadura manual dos respectivos tratamentos.

A adubação de cobertura foi realizada entre os estádios de desenvolvimento V4 a V6, com aplicação de 200 kg ha^{-1}, da fórmula comercial 36-00-12. O controle de plantas daninhas foi realizado em pós-emergência com aplicação dos herbicidas atrazina

(Primóleo® SC) e tembotriona (Soberan® SC), nas doses de 3,0 e 0,2 L de p.c. ha^{-1}. Para o controle de insetos foram utilizados os inseticidas tiodicarbe (Larvin® WG) e triflumuron (Certero® SC), nas doses de 0,1 kg ha^{-1} e 0,1 L de p.c. ha^{-1}, respectivamente.

As progênies $F_{2:3}$ de milho foram avaliadas em três experimentos, semeados em 28/09/2012, 14/11/2012 e 08/01/2013. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, além dos genitores (L04-2 e L99-4) e da geração F_1, os quais foram utilizados como tratamentos controle. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, 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. As plantas nos três experimentos foram inoculadas no estádio de florescimento pleno da cultura, através da injeção de 1 mL da suspensão de esporos (5×10^5 conídios), no meio do primeiro ou segundo internódio visível acima da superfície do solo, com o auxílio de seringa de uso veterinário (Figura 1 A e B).

Para a avaliação da resistência ou suscetibilidade das progênies de milho à antracnose do colmo, aproximadamente 60 dias após a inoculação, as plantas foram submetidas ao toalete, ou seja, a retirada de folhas, espigas e pendão (Figura 1 C). Os colmos foram cortados na base próximo a superfície do solo, identificados/amarrados (Figura 1D) e levados para galpão onde foram seccionados longitudinalmente com o auxílio de uma máquina serra fita elétrica. As variáveis analisadas foram: o comprimento interno de lesão (CINT), o comprimento externo de lesão (CEXT) em cm e o número de internódios descoloridos (INT) de acordo com a escala adaptada de Keller e Bergstrom (1988). Para a variável INT foram avaliados os seis primeiros internódios do colmo a partir do ponto de inoculação, sendo 1 na escala o indivíduo mais resistente e 6 o mais suscetível à antracnose do colmo.

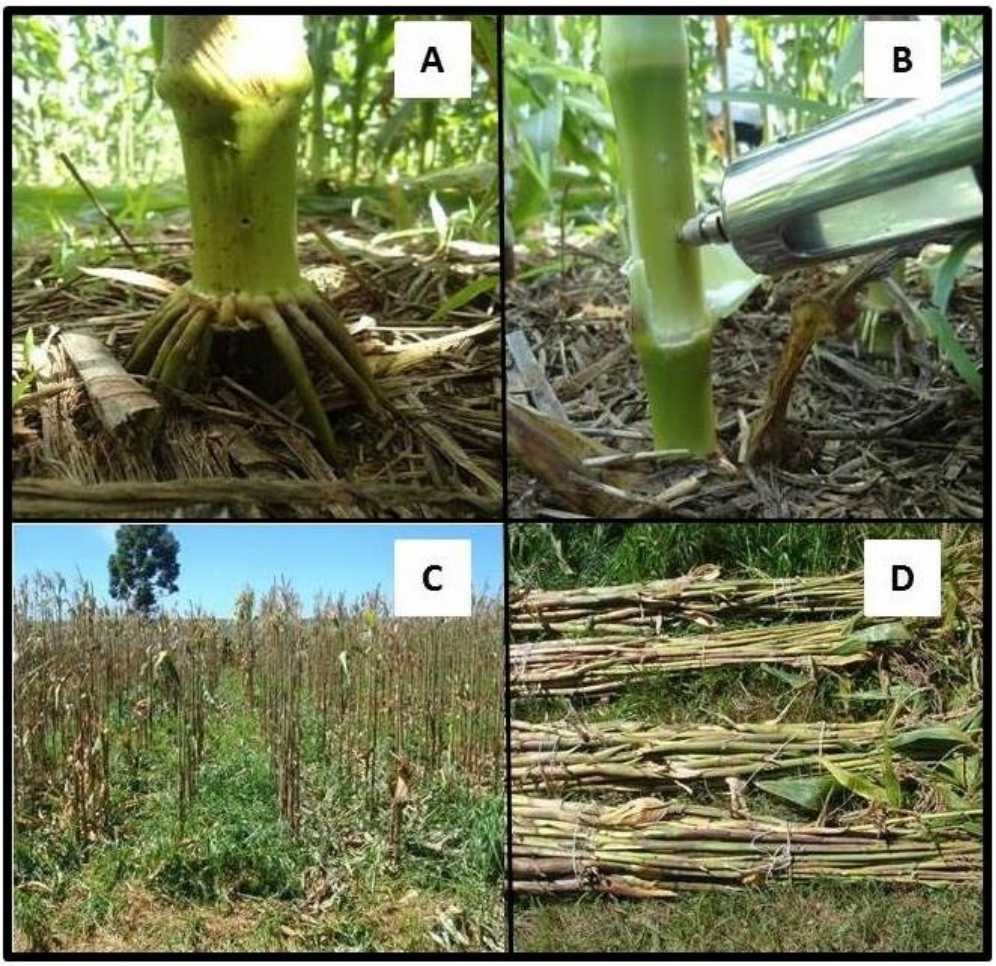

FIGURA 1 − **(**A) Internódio perfurado com o auxílio de um furador, (B) Inoculação dos conídios de *C. graminicola* com seringa, (C) Toalete dos colmos e (D) Colmos amarrados e identificados. Ponta Grossa, 2014.

4.1.3 Multiplicação e Preparo do Inóculo de *C. graminicola*

O isolado de *C. graminicola* foi cedido pela empresa Dow AgroSciences Ltda. (Jardinópolis – SP). Inicialmente, discos de meio de cultura aveia-ágar contendo o isolado do patógeno, foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (40 g de farinha de aveia, 10 g de ágar em 1 L de água destilada). As placas com as colônias foram mantidas na bancada do laboratório com temperatura de 21 ± 4°C, até a esporulação completa das colônias (Figura 2A).

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 completamente esporuladas.

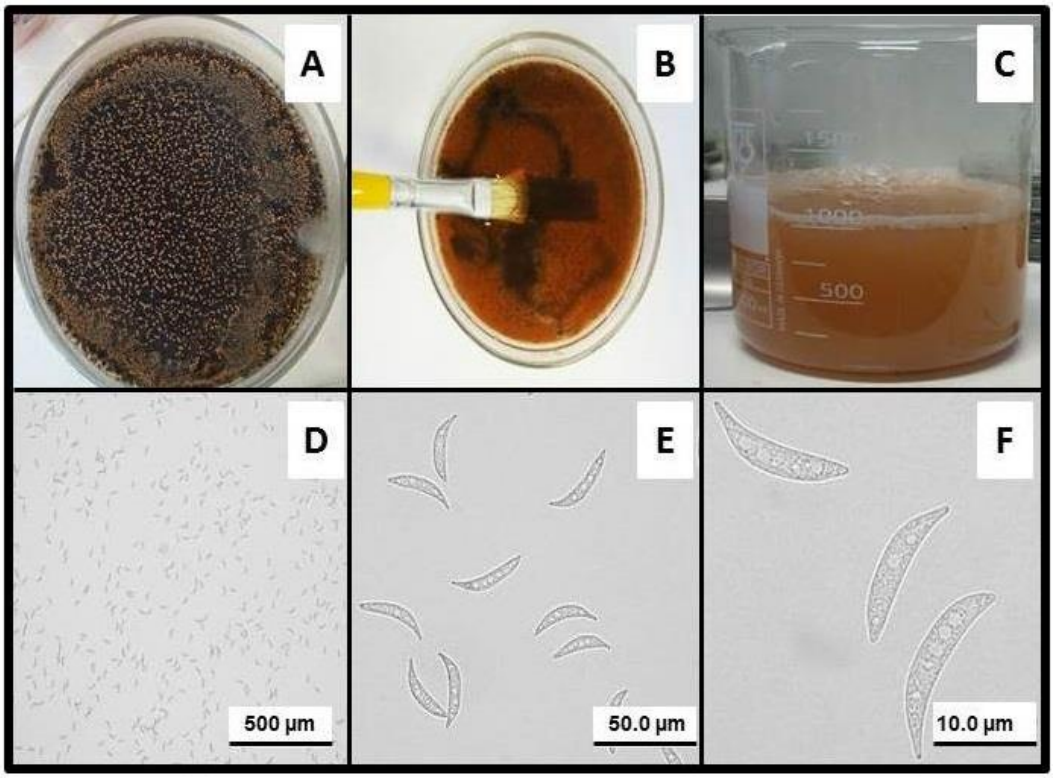

FIGURA 2 − **(**A) Visão de uma placa de Petri contendo colônias esporuladas de *C. graminicola*, (B) Raspagem superficial da colônia para liberação dos conídios, (C) Suspensão concentrada de conídios, (D) Suspensão concentrada de conídios com ampliação de 4x, (E) Ampliação de 40x e (F) Ampliação de 100x. Ponta Grossa, 2014.

O inóculo foi preparado através da adição de 20 mL de água deionizada estéril às placas de Petri contendo as colônias esporuladas do fungo, seguida da raspagem superficial das colônias com o auxílio de um pincel para liberação dos conídios (Figura 2B). A suspensão concentrada de conídios (Figura 2C) foi filtrada através de uma dupla

camada de gaze, e ajustada para a concentração de 5 x 10^5 conídios mL^{-1} através da câmara de Neubauer. A Figura 2 D, E e F, demonstra uma visão geral da suspensão concentrada dos conídios de *C. graminicola* com diferentes ampliações (4, 40 e 100x) em fotomicroscópio Olympus BX41, por captura de imagem digital em tempo real com câmera DP-71 de 12 mega pixels.

4.1.4 Análises Estatísticas e Estimativas de Parâmetros Genéticos da Resistência

Os dados da fenotipagem das progênies $F_{2:3}$ de milho relativos ao comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e o número de internódios descoloridos (INT) foram submetidos à análise de variância individual e conjunta dos experimentos. As médias das variáveis CINT, CEXT e INT foram submetidas ao teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade através do programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999). A análise de correlação de Pearson entre as variáveis CINT, CEXT e INT foram realizadas no programa SAS versão 8.1 (SAS INSTITUTE, 2000).

A partir das médias fenotípicas das 121 progênies $F_{2:3}$ de milho relativos aos três experimentos de campo, procedeu-se a análise de distribuição de frequência para as variáveis CINT, CEXT e INT. A determinação do número de classes fenotípicas (K) para CINT e CEXT foi estimada pela fórmula $k = \sqrt{n}$, onde n refere-se ao número total de progênies (n=121). A amplitude fenotípica de cada classe (AFC) foi determinada por $AFC = \frac{A}{K}$, onde A representa a amplitude fenotípica do CINT ou CEXT observada entre as progênies. Para a variável INT, as classes fenotípicas se basearam na escala de notas da avaliação, com classes variando de 1 a 6.

Para todas as variáveis foram estimados os parâmetros genéticos associados com resistência à antracnose do colmo através da esperança matemática dos quadrados médios da análise de variância de acordo com Vencovsky e Barriga (1992).

A estimativa da variância genética foi obtida por: $\hat{\sigma}^2 g = 1/r\ (QMp - QMe)$, sendo (r) o número de repetições, (QMp) o quadrado médio de progênies e (QMe) o quadrado médio do erro, obtidos da análise de variância individual. A variância ambiental foi estimada por: $\hat{\sigma}^2 e = QMe$. A herdabilidade no sentido amplo foi estimada por: $\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}^2 g}{\left[\hat{\sigma}^2 g + \left(\hat{\sigma}^2 e / r\right)\right]}$. Além disto, foram estimados o coeficiente de variação genética: $CV_g =$

$\frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2 g}}{Y_0} * 100$, o coeficiente de variação do erro experimental: $CV_e = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2 e}}{Y_0} * 100$, sendo Y_0 a média geral das variáveis e o quociente $\hat{b} = \frac{CV_g}{CV_e}$.

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 que originaram por autofecundação as progênies $F_{2:3}$, das linhagens endogâmicas (L04-2 e L99-4) e da geração F_1 (L04-2 x L99-4). O protocolo de extração do DNA seguiu a metodologia proposta por Hoisington et al. (1994), em microtubos de 1,5 mL. Os "pellets" de DNA foram ressuspendidos em 40 µL de água ultrapura estéril e tratados com 2 µL de RNAse (1,0 mg/mL) por 2h à 37°C.

A quantificação do DNA genômico concentrado foi realizada no espectrofotômetro Nanovue GE Healfcare®. As amostras de DNA foram diluídas para concentração de 10 ng μL^{-1} (SSRs) e 50 ng μL^{-1} (AFLPs). A integridade do DNA genômico foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com 6 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol e 0,4% de sacarose), na proporção 1:1. As amostras de DNA concentrado foram submetidas à corrida eletroforética por aproximadamente 4h a 50 V e fotodocumentados sob luz UV no aparelho AlphaImager HP, versão 3400 (Figura 3).

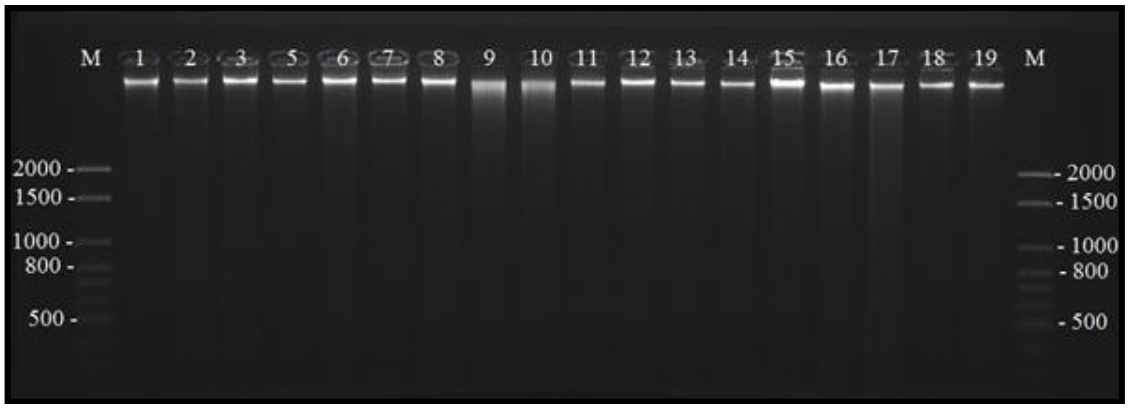

FIGURA 3 − Amostras de DNA genômico de parte dos indivíduos da população de mapeamento. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2014.

4.2.2 Genotipagem com o Marcador SSR

Inicialmente, 79 locos microssatélites (SSR), distribuídos nos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, foram amplificados nas linhagens endogâmicas L04-2 e L99-4 e na geração F_1 a fim de selecionar locos polimórficos entre as linhagens parentais (Tabela 1). Os locos SSR foram escolhidos a partir do banco de dados do *Maize Genetics and Genomics Data Base – Maize GDB* (http://www.maizegdb.org).

TABELA 1 − Relação dos 79 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
Bnlg149	1.00	-	SSR1	Umc1792	5.08	(CGG) 5	SSR1
Bnlg1119	1.01	(AG) 16	SSR2	Umc1829	5.09	(AG) 10	SSR1
Bnlg1007	1.02	(AG) 15	SSR1	p-Bnlg161	6.00	-	SSR2
Phi001	1.03	AG	SSR1	p-Bnlg238	6.00	-	SSR2
Umc1035	1.06	(CT) 19	SSR2	Phi126	6.00	AG	SSR1
Bnlg615	1.07	-	SSR2	Bnlg249a	6.01	-	SSR
Bnlg131	1.11	-	SSR1	Phi007	6.01	AG	SSR
Bnlg125	2.02	-	SSR1	Umc1887	6.04	(CGA) 4	SSR1
Umc1884	2.05	(TC) 8	SSR1	Phi452693	6.04	(AGCC)	SSR1
p-nc003	2.06	AG	SSR1	p-nc013	6.05	AG	SSR1
Bnlg1045	2.07	(AG) 17	SSR1	Mmc0241	6.05	-	SSR1
Phi101049	2.10	AGAT	SSR1	Umc1463	6.06	(ACA) 6	SSR1
Umc2118	3.00	(CTTT) 4	SSR1	Bnlg1292	7.01	(AG) 14	SSR
Umc1394	3.01	(AT) 10	SSR1	Phi034	7.02	CCT	SSR1
Bnlg1325	3.02	(AG)18	SSR1	Bnlg434	7.03	-	SSR
Umc0312	3.04	(CT) 23	SSR1	Phi082	7.05	AG	SSR
Umc1025	3.04	(CT) 11	SSR1	Umc1799	7.06	(TG) 12	SSR
Umc1742	3.04	(CGC) 4	SSR1	Umc1592	8.01	CA	SSR
Umc1223	3.04	(AG) 7	SSR2	Phi115	8.03	(AT/ATAC)	SSR1
Bnlg197	3.06	-	SSR1	Bnlg2046	8.04	(AG)15	SSR1
Umc1659	3.07	(GA) 6	SSR2	Umc1202	8.05	(GGC) 7	SSR1
Umc1136	3.10	(GCA) 5	SSR1	Bnlg1176	8.05	(AG) 37	SSR1
Umc1759	4.01	(CGG) 4	SSR1	Umc1460	8.05	(GCA) 4	SSR1
Umc2176	4.03	(TGC) 4	SSR1	Bnlg1031	8.06	(AG) 25	SSR1
Umc1550	4.03	(CT) 6	SSR2	Bnlg240	8.06	-	SSR1
Bnlg490	4.04	-	SSR1	Umc2014	8.07	-	SSR1
Umc1511	4.05	(CGA)4	SSR1	Phi015	8.08	AAAC	SSR1
Bnlg2291	4.06	(AG) 17	SSR1	Phi233376	8.09	CCG	SSR1
Bnlg1621	4.06	(AG) 18	SSR	Umc2084	9.01	(CTAG) 4	SSR1
Bnlg1937	4.06	(AG)21	SSR2	Phi065	9.03	CACTT	SSR1
Bnlg1784	4.07	(AG) 13	SSR1	Phi027	9.03	GCGCT	SSR1
Bnlg1565	4.09	(AG) 27	SSR1	Umc1519	9.04	(TC) 8	SSR1
Bnlg1337	4.11	(AG) 21	SSR1	Umc1060	9.12	(CGG) 5	SSR1
Umc2036	5.01	(GTC) 4	SSR1	Umc1318	10.01	(GTC) 5	SSR1
Bnlg557	5.03	-	SSR	Umc1319	10.01	(ACC) 5	SSR1
Umc1056	5.03	(AGCA) 4	SSR1	Bnlg640	10.03	-	SSR1
Umc1935	5.03	(CA) 8	SSR1	Bnlg1250	10.05	(AG) 30	SSR2
Phi008	5.03	GGC	SSR1	Umc2021	10.07	(TGG) 4	SSR
Bnlg2323	5.04	(AG) 25	SSR1	Umc1996	10.07	-	SSR1
Umc1348	5.05	(CA)7	SSR1				

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, contendo: 1X tampão Green GoTaq®Flexi; 2,0 mM $MgCl_2$; 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, Promega) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 20 µL.

Os locos microssatélites foram amplificados no programa de PCR denominado de SSR1 (OGLIARI et al., 2000). A reação de PCR 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, 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 não foi adequada foi testado um segundo programa de PCR designado de SSR2 (OGLIARI et al., 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 composto por: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto, 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 adequadas tanto para o programa SSR1 quanto para o SSR2 foram testados num terceiro programa designado de SSR (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 5 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1X por aproximadamente 3h a 80V. Em cada gel foi adicionado à extremidade esquerda uma amostra de 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 pb (NORGEN),

visando determinar o tamanho dos fragmentos gerados na amplificação. Os géis foram fotodocumentados sob luz UV no aparelho AlphaImager HP, versão 3400.

As reações de amplificação dos *primers* SSR polimórficos entre as linhagens parentais foram realizadas em microplacas de PCR. Os 121 indivíduos da população de mapeamento (geração F_2) foram genotipados para cada loco microssatélite 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 L99-4 e (0) presença dos dois fragmentos correspondentes aos alelos das linhagens parentais L04-2 e L99-4.

4.2.3 Genotipagem com o Marcador AFLP

Inicialmente, foram testados 25 combinações de *primers Eco*RI e *Mse*I (Tabela 2), visando selecionar aquelas combinações com melhor padrão de amplificação e maior polimorfismo entre as linhagens parentais e entre os bulks de DNA, constituídos pela mistura equitativa de dez indivíduos mais resistentes e pelos dez mais suscetíveis à antracnose do colmo da população de mapeamento de acordo com a metodologia de análise de bulks segregantes (BSA) proposto por Michelmore, Paran e Kesseli (1991). Nesta primeira etapa foram constituídos os bulks de DNA (resistente e suscetível) para o primeiro experimento, e bulks de DNA representativos do segundo e terceiro experimento a partir dos resultados da avaliação da resistência/suscetibilidade das progênies $F_{2:3}$ a campo. Das 25 combinações testadas foram escolhidas 12 para genotipar a população de mapeamento (Tabela 2).

TABELA 2 − Relação das 25 combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I testadas nas gerações parentais (L04-2, L99-4 e F_1) e nos bulks de DNA do BSA. Ponta Grossa, 2014.

Primers	**1. M – CAC**	**2. M – CCA**	**3. M – CGC**	**4. M – CTC**	**5. M – CAT**
1. E – AGT	AGT/CAC *	AGT/CCA *	AGT/CGC	AGT/CTC *	AGT/CAT *
2. E – ATC	ATC/CAC *	ATC/CCA *	ATC/CGC	ATC/CTC	ATC/CAT
3. E – AGC	AGC/CAC *	AGC/CCA	AGC/CGC	AGC/CTC	AGC/CAT*
4. E – ACA	ACA/CAC	ACA/CCA*	ACA/CGC	ACA/CTC	ACA/CAT
5. E – AAC	AAC/CAC*	AAC/CCA	AAC/CGC	AAC/CTC*	AAC/CAT*

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

A metodologia de amplificação do marcador AFLP foi de acordo com Vos et al. (1995). A metodologia para o marcador AFLP foi composta de quatro etapas: 1°) A dupla digestão enzimática do DNA genômico com as enzimas de restrição *Eco*RI +

*Mse*I para um volume final de 50 µL [1X Albumina de Soro Bovino (BSA), 1X tampão "One Phor All" (OPA), 5,04 U da *EcoR*I(12 U/µL, Promega); 5 U da *Mse*I (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. 2°) A ligação dos adaptadores *EcoR*I e *Mse*I 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 *EcoR*I, 50 pmol do adaptador *Mse*I, 1X tampão T_4 DNA ligase e 1,5 U da enzima T_4 DNA ligase (400.000 U/mL, New England Biolabs®). A reação de ligação dos adaptadores *EcoR*I e *Mse*I foi realizada a 23°C por 3 horas em termociclador, com suaves inversões a cada hora. 3°) 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 Green GoTaq®Flexi, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,4 mM de solução de dNTP (100 mM, Amresco®), 25 ng de *primer EcoR*I + A e *Mse*I + C, 3 U de *Taq* DNA *polimerase*(5 U/µL, Biotools) 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 etapa de pré-amplificação foram acrescentadas em cada amostra 80 µL de água estéril, seguido da estocagem a - 20°C.

A quarta etapa denominada de amplificação seletiva foi realizada através da combinação de *primer EcoR*I e *Mse*I com 3 bases seletivas na posição 3' de acordo com a Tabela 2. As reações de amplificação seletiva foram preparadas para um volume final de 20 µL contendo: 1X tampão Green GoTaq®Flexi, 50mM $MgCl_2$, 0,2 mM de solução dNTP (100 mM, Amresco®), 25 ng do *primer EcoR*I+3, 25 ng do *primer Mse*I+3, 1 U de *Taq* DNA *polimerase* (5 U/µL, Biotools) e 1,5 µL do DNA pré-amplificado.

A reação de amplificação seletiva foi composta por 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 80W (±1500V) com o objetivo de organizar a matriz 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 80W de potência por aproximadamente 3 horas e 30 minutos. Para determinar o tamanho dos fragmentos foi adicionado às extremidades do gel 10 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 Eco*RI + *Mse*I na população de mapeamento foram genotipados na presença (1) ou ausência (0). A denominação de cada loco polimórfico amplificado seguiu a descrição de Castiglioni et al. (1999). Por exemplo, o loco E22138, corresponde ao fragmento AFLP amplificado pela combinação de primers *Eco*RI-2/*MseI*-2, com tamanho aproximado de 138pb.

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; STUBER; WENDEL, 1987). As médias do comprimento interno (CINT), externo de lesão (CEXT) e o número de internódios descoloridos (INT) de cada progênie $F_{2:3}$ para os três experimentos de campo, bem como as da análise conjunta 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 com resistência à antracnose do colmo nos experimentos individuais e na análise conjunta dos experimentos.

Na 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 a entrada e saída das marcas do modelo.

4.2.5 Construção do Mapa de Ligação

Os locos microssatélites e AFLPs que apresentaram segregação mendeliana 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-se um "lod score" (LOD) de 4,0 (método da máxima verossimilhança), freqüência máxima de recombinação $\theta = 0,40$ e função de mapeamento de Haldane. Após a obtenção 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 dentro do grupo, utilizou-se o comando "ripple", confirmando a ordem dos marcadores.

4.2.6 Localização dos QRLs através do Mapeamento por intervalo Composto

As análises de mapeamento dos QRLs foram realizadas utilizando-se as médias das características: comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descolorido (INT) das 121 progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 avaliadas para resistência/suscetibilidade à antracnose do colmo em três experimentos. Para o mapeamento dos QRLs foi utilizada a análise de mapeamento por intervalo composto (MIC) através do 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 estimação da posição, efeito genético e porcentagem da variação fenotípica (dada pelo coeficiente de correlação parcial, R^2) dos QRLs foi estabelecida nos picos de LOD acima do nível de significância considerado (2,5), de acordo com o programa *QTLCartographer*®.

5 CAPÍTULO I

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I

Resistência de progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose do colmo

Manuscrito em preparo a ser submetido ao periódico Crop Breeding and Applied Biotechnology.

Capítulo II

Mapeamento de locos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho

Manuscrito em preparo a ser submetido ao periódico Theoretical and Applied Genetics.

5.1 Resistência de progênies $F_{2:3}$ de milho à antracnose do colmo

Resumo

O trabalho objetivou caracterizar a resistência de progênies $F_{2:3}$ de milho inoculados com *Colletotrichum graminicola* e estimar os parâmetros genéticos associados a resistência de milho à antracnose do colmo. As linhagens L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) foram cruzadas entre si a fim de obter uma população da geração F_2. Os indivíduos desta população foram autofecundados para gerar as progênies $F_{2:3,}$ que foram avaliadas para resistência em três experimentos de campo. Os tratamentos foram constituídos por 121 progênies $F_{2:3}$, linhagens endogâmicas e geração F_1. O delineamento foi em blocos aleatorizados, com três repetições. A parcela foi constituída de 3 m de comprimento e 0,90 m na entrelinha, com aproximadamente 15 plantas por parcela. As plantas dos experimentos foram inoculadas no estádio de florescimento pleno, através da injeção de 1 mL da suspensão de esporos, no meio do primeiro internódio visível acima do solo. Os colmos inoculados foram avaliados para: comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) em cm e número de internódios descoloridos (INT). As condições ambientais dos três experimentos foram satisfatórias para o desenvolvimento da doença, permitindo confirmar a elevada patogenicidade do isolado de *C. graminicola.* As médias das variáveis CINT, CEXT e INT referentes ao segundo e terceiro experimentos refletiram normalmente em lesões maiores possivelmente pelas elevadas temperaturas e médias pluviométricas ocorridas no período safrinha. A geração F_1 nos três experimentos independente da forma de avaliação ranqueou muito próximo da linhagem fonte de resistência (L04-2). Esses resultados confirmam o potencial genético da linhagem L04-2 em transmitir os genes de resistência à geração filial do cruzamento que participou como parental. Nos três experimentos, os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo para o CINT, CEXT e INT foram de elevada magnitude, com variação de 96 a 98%, indicando grande facilidade no processo de seleção artificial uma vez que a maior parte da variação da resistência/suscetibilidade foi explicada pelos efeitos genéticos. As elevadas magnitudes dos parâmetros genéticos: variância genética, herdabilidade no sentido amplo e quociente $\hat{b}$ para as três formas de avaliação da doença nos três experimentos, indicam que o controle genético da resistência de milho à *C. graminicola* neste cruzamento (L04-2 x L99-4) possivelmente esteja associado à expressão de genes de grande efeito fenotípico. A seleção artificial de progênies $F_{2:3}$ com menor CINT, CEXT e INT possibilitará incrementar o número de genótipos de milho com maior freqüência de alelos favoráveis para a resistência. Adicionalmente, pode-se inferir que os ganhos esperados com a seleção artificial de progênies resistentes à *C. graminicola* podem ser facilmente alcançados.

Palavras-chave: Seleção. Parâmetros genéticos. *C. graminicola*.

Introdução

As podridões da base do colmo em milho (PBC) são causadas por um complexo de patógenos, que variam na incidência/severidade de acordo com as condições ambientais, e tem se tornado limitantes ao potencial de rendimento da cultura no país (COSTA et al., 2010). Deste complexo de podridões, destaca-se à antracnose do colmo causada por *Colletotrichum graminicola* a qual pode infectar qualquer parte da planta independente do estádio de desenvolvimento da cultura. Diversos trabalhos internacionais têm demonstrado o potencial da antracnose do colmo em causar danos no rendimento da cultura (PERKINS; HOOKER, 1979; WHITE; YANNEY; NATTI, 1979; CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1992; CARSON; HOOKER, 1981; SMITH, 1976). No Brasil, Nazareno (1989) estimou danos na produção de grãos variando de 12 a 40% no estado do Paraná, os quais foram dependentes do ano, do local e do híbrido utilizado. Cota et al. (2009) relataram queda no rendimento de grãos de híbridos resistentes e suscetíveis em duas safras agrícolas, com redução média de 27,5% no rendimento de grãos. Matiello et al. (2013) indicaram reduções significativas no rendimento de grãos de um híbrido suscetível quando inoculado com *C. graminicola*, com estimativas de danos variando de 16,1 à 20,2%.

O aumento das áreas cultivadas em sistema plantio direto sem rotação de culturas e a utilização de híbridos comerciais não caracterizados para a resistência contribuíram para o incremento na incidência de *C. graminicola* nas principais regiões produtoras de milho no Brasil (CRUZ et al., 1996). Estimativas da incidência das PBC em diferentes regiões de cultivo no país tem indicado *C. graminicola* como o patógeno mais frequente em colmos com sintomas da podridão, com incidência superior a 60% na maioria dos estudos (COSTA et al., 2008; DENTI; REIS, 2003; RIBEIRO et al., 2005; COSTA et al., 2010).

Em relação ao controle genético da resistência de milho à antracnose do colmo a literatura indica desde herança oligogênica a poligênica, com predomínio da ação gênica aditiva (CARSON; HOOKER, 1981; MATIELLO et al., 2012; MÁXIMO, 2013; TOMAN; WHITE, 1993). Embora, em alguns cruzamentos a ação gênica de dominância tenha sido relatada para a resistência (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987a; CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1990; MATIELLO et al., 2012; PEREIRA; BALMER; MIRANDA FILHO, 1989). Em menor frequência, a literatura indica em alguns cruzamentos herança monogênica com ação gênica de

dominância para a antracnose do colmo (BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987b) e para a antracnose foliar em milho (COELHO et al., 2001).

O trabalho objetivou caracterizar a resistência/suscetibilidade de progênies $F_{2:3}$ de milho a partir da inoculação de colmos com *C. graminicola* e estimar os parâmetros genéticos associados a resistência destas progênies à antracnose do colmo.

Material e Métodos

Material Vegetal

As linhagens tropicais endogâmicas L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) previamente caracterizadas por Torrecija (2012) foram cruzadas entre si a fim de obter uma população segregante da geração F_2. Os indivíduos desta população foram autofecundados para gerar as progênies $F_{2:3,}$ que foram avaliadas para resistência em experimentos de campo.

Experimentos de Campo

As progênies $F_{2:3}$ foram avaliadas em três experimentos, semeados em 28/09/2012, 14/11/2012 e 08/01/2013. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, genitores (L04-2 e L99-4) e geração F_1, os quais foram utilizados como tratamentos controle. O delineamento foi em blocos aleatorizados 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. As plantas dos experimentos foram inoculadas no estádio de florescimento pleno da cultura, através da injeção de 1mL da suspensão de esporos (5×10^5 conídios), no meio do primeiro internódio visível acima da superfície do solo, com seringa de uso veterinário.

O isolado de *C. graminicola* foi cedido pela empresa Dow AgroSciences Ltda. (Jardinópolis – SP). Inicialmente, discos de meio de cultura com o isolado do patógeno, foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (40 g de farinha de aveia e 10 g de ágar em 1 L de água destilada). As placas repicadas foram mantidas na bancada do laboratório com temperatura de 21 ± 4°C, até a esporulação completa das colônias. O inóculo foi preparado através da adição de 20 mL de água deionizada estéril às placas contendo as colônias esporuladas do fungo, seguida da

raspagem superficial com pincel para liberação dos conídios. A suspensão concentrada de conídios foi filtrada através de uma dupla camada de gaze, e ajustada para a concentração de 5 x 10^5 conídios mL^{-1} através da câmara de Neubauer.

Para a avaliação da resistência das progênies de milho à antracnose do colmo, aproximadamente 60 dias após a inoculação, as plantas foram submetidas ao toalete, ou seja, a retirada de folhas, espigas e pendão. Os colmos foram seccionados longitudinalmente com uma máquina serra fita elétrica. Foram determinados o comprimento interno de lesão (CINT), o comprimento externo de lesão (CEXT) em cm e o número de internódios descoloridos (INT) a partir da escala adaptada de Keller e Bergstrom (1988). Para o INT foram avaliados os seis primeiros internódios do ponto de inoculação, sendo 1 na escala o indivíduo mais resistente e 6 o mais suscetível a doença.

Análises Estatísticas e Estimativas dos Parâmetros Genéticos

Os dados da fenotipagem das progênies $F_{2:3}$ de milho para o CINT, CEXT e INT foram submetidos à análise de variância individual e conjunta dos experimentos. O teste de homocedasticidade das variâncias residuais foi verificada a partir da razão entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo para cada variável. Atendida a pressuposição, procedeu-se a análise conjunta dos experimentos. As médias do CINT, CEXT e INT foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999). A análise de correlação de Pearson entre as variáveis CINT, CEXT e INT foi realizada no programa SAS versão 8.1 (SAS INSTITUTE, 2000).

A partir das médias fenotípicas das 121 progênies $F_{2:3}$ dos três experimentos de campo, procedeu-se a análise de distribuição de frequência para o CINT, CEXT e INT. A determinação do número de classes fenotípicas (K) para CINT e CEXT foi estimada pela fórmula $k = \sqrt{n}$, onde n refere-se ao número total de progênies (n=121). A amplitude fenotípica de cada classe (AFC) foi determinada por $AFC = \frac{A}{K}$, onde A representa a amplitude fenotípica do CINT ou CEXT entre as progênies. As classes fenotípicas para o INT foram representadas pela escala de notas, variando de 1 a 6.

Foram estimados os parâmetros genéticos para o CINT, CEXT e INT através da esperança matemática dos quadrados médios da análise de variância dos experimentos

de acordo com Vencovsky e Barriga (1992). A estimativa da variância genética foi obtida por: $\hat{\sigma}^2$g = 1/r (QM_P – QM_E), sendo (r) o número de repetições, (QM_P) o quadrado médio de progênies e (QM_E) o quadrado médio do erro, obtidos da análise de variância individual. A variância ambiental equivaleu a $\hat{\sigma}^2$e = QM_E. A herdabilidade no sentido amplo foi estimada por: $\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}^2 g}{\left[\hat{\sigma}^2 g + \left(\hat{\sigma}^2 e / r\right)\right]}$. Além disto, foram estimados o coeficiente de variação genética: $CV_g = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2 g}}{Y_0} * 100$, o coeficiente de variação do erro experimental: $CV_e = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2 e}}{Y_0} * 100$ (Y_0 a média geral) e o quociente $\hat{b} = \frac{CV_g}{CV_e}$.

Resultados

Os resultados experimentais indicaram que as variáveis CINT, CEXT e INT foram eficientes para discriminar as progênies $F_{2:3}$ de milho e gerações parentais com relação a resistência ou suscetibilidade à antracnose do colmo. Os resultados da análise de variância conjunta demonstraram efeito altamente significativo (Pr < 0,01) da interação experimento x tratamento. Assim, os resultados serão apresentados a partir das análises de variância individuais.

As análises de variância dos três experimentos revelaram diferenças altamente significativas (Pr < 0,01) entre os tratamentos (progênies $F_{2:3}$, linhagens parentais e geração F_1) para o comprimento interno (CINT) e externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) (Tabela 3). As médias gerais do CINT, CEXT e INT referentes ao segundo e terceiro experimentos refletiram normalmente em lesões maiores. Os coeficientes de variação evidenciaram amplitude de 8,2 (INT) a no máximo 21,67% (CEXT) (Tabela 3).

Nos três experimentos, a linhagem endogâmica utilizada como fonte de resistência (L04-2) apresentou comprimento interno de lesão variando de 9,1 a 20,64 cm, comprimento externo de 4,4 a 17,31 cm e no máximo 2,14 internódios descoloridos (Tabela 3 e Figura 4). Por outro lado, a linhagem suscetível L99-4, demonstrou amplitude de 78,83 a 117,63 cm para o CINT, 77,14 a 118,03 cm para o CEXT e 5,63 a 6,0 para o INT (Tabela 3).

Os coeficientes de correlação foram elevados e altamente significativos para as três variáveis. A avaliação direta da antracnose do colmo através do CINT e CEXT revelaram índices mais elevados entre si, variando de 0,95 a 0,99. Da mesma forma, os

coeficientes de correlação do CINT e CEXT com o INT foram elevados, com amplitudes de 0,89 a 0,99 (CINT x INT) e de 0,89 a 0,95 (CEXT x INT) nos respectivos experimentos (Tabela 3).

A distribuição das progênies $F_{2:3}$ de milho para o comprimento interno de lesão (CINT) nos três experimentos é visualizada na Figura 5. Nos três experimentos evidencia-se contraste fenotípico para resistência à antracnose do colmo entre as linhagens parentais L04-2 (LR) e L99-4 (LS) a partir da inoculação do patógeno. A linhagem resistente L04-2 permaneceu nas classes fenotípicas de menor CINT, com lesão interna variando de 9,1 a 20,64 cm. Ao passo que a linhagem suscetível L99-4 sempre esteve nas classes fenotípicas de maior lesão, com CINT de 78,8 a 117,63 cm. A geração F_1 nos três experimentos se posicionou muito próximo da linhagem resistente L04-2, com CINT não superior a terceira classe fenotípica (Figura 5 A, B e C).

A distribuição das médias do CINT entre as progênies $F_{2:3}$ evidenciou desempenho diferenciado do primeiro experimento em relação ao segundo e terceiro experimentos. No primeiro, a grande maioria (83,5%) das progênies demonstrou menor CINT variando de 8,25 a 30,84 cm (Figura 5 A). Por outro lado, no segundo e terceiro experimentos houve uma distribuição mais uniforme das progênies $F_{2:3}$ nas respectivas classes fenotípicas, com predomínio de progênies entre a 5ª até a 8ª classe fenotípica (Figura 5 B e C). Nos três experimentos foram observados progênies $F_{2:3}$ mais resistentes que a própria fonte de resistência L04-2 utilizada para gerar a população segregante (Figura 5).

A distribuição de frequência do CEXT confirmou o desempenho fenotípico diferenciado para a resistência entre as linhagens parentais L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível). A linhagem L04-2 permaneceu nas classes fenotípicas de menor CEXT, com lesão externa variando de apenas 4,43 a 17,31 cm. Por outro lado, a linhagem L99-4 sempre esteve presente nas classes fenotípicas de maior lesão, com CEXT variando de 77,14 a 118,03 cm. Semelhante ao CINT, a geração F_1 ranqueou muito próximo da linhagem resistente L04-2, com CEXT não superior a terceira classe fenotípica (Figura 6 A, B e C).

Para CEXT os resultados da distribuição de frequência também evidenciaram desempenho diferenciado do primeiro em relação ao segundo e terceiro experimentos, assim como relatado para o CINT. No primeiro, a maioria das progênies $F_{2:3}$ (83,5%) evidenciou menor CEXT, desde 2,96 à 26,79 cm (Figura 6 A). Para o segundo e terceiro houve distribuição mais uniforme das progênies nas respectivas classes fenotípicas, com

predomínio de progênies entre a 5ª e a 8ª classe (Figura 6 B e C). Nos três experimentos foram observadas progênies $F_{2:3}$ com resistência superior a linhagem resistente (L04-2) bem como progênies mais suscetíveis à antracnose do colmo do que a própria linhagem suscetível L99-4 (Figura 6).

Nos três experimentos de fenotipagem a linhagem L04-2 evidenciou elevado padrão de resistência ao patógeno, uma vez que a descoloração dos internódios dos colmos ficou restrita a 1,1 a 2,14 internódios descoloridos (Figura 7). Por outro lado, a linhagem L99-4 ranqueou na classe mais suscetível com INT na classe de 5,1 a 6,0. A geração F_1 apresentou desempenho fenotípico muito similar à fonte de resistência L04-2, com posicionamento na 2ª (primeiro e segundo experimento) ou 3ª classe (terceiro experimento) (Figura 7). Novamente a distribuição das médias do INT entre as progênies de milho evidenciou desempenho diferenciado do primeiro em relação ao segundo e terceiro experimentos. No primeiro, a grande maioria das progênies (83,5%) ranqueou nas classes fenotípicas de menor INT, variando de 1,0 a 3,0 (Figura 7 A). Para o segundo e terceiro experimento houve predomínio de progênies $F_{2:3}$ na última classe fenotípica, com INT de 5,1 a 6,0 (Figura 7 B e C). Nos três experimentos foram observadas progênies $F_{2:3}$ mais resistentes que a própria fonte de resistência bem como progênies mais suscetíveis à antracnose do colmo do que a linhagem L99-4 (Figura 7).

A estimativa dos parâmetros genéticos, para os três experimentos evidenciou a maior contribuição do componente genético para a variação fenotípica do comprimento interno e externo de lesão e do número de internódios descoloridos (Tabela 4). Em contrapartida, os efeitos ambientais associados à expressão da resistência foram de baixa magnitude para as três variáveis analisadas nos ensaios de fenotipagem (Tabela 4). Os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo foram de grande magnitude para as três formas de avaliação da doença (CINT, CEXT e INT). Os coeficientes de herdabilidade evidenciaram amplitude de 0,96 (primeiro experimento) a 0,98 (segundo e terceiro experimento). Independente da forma de avaliação da doença e do experimento, os quocientes $\hat{b}$ sempre foram de grande magnitude, com amplitude mínima de 2,82 (INT – 1° experimento) a no máximo 4,90 (CINT – 3° experimento) (Tabela 4).

Discussão

A escolha das linhagens parentais (L04-2 e L99-4) para gerar a população de mapeamento (progênies $F_{2:3}$) foi baseada inicialmente na caracterização da

resistência/suscetibilidade de linhagens endogâmicas de milho a *C. graminicola* realizada por Torrecija (2012) e posteriormente confirmada através dos resultados do controle genético da resistência de milho à antracnose do colmo por Máximo (2013).

A avaliação da antracnose do colmo foi baseada na medida do comprimento interno (CINT) e externo de lesão (CEXT), bem como pelo número de internódios descoloridos (INT) através da escala de notas (KELLER; BERGSTROM, 1988). As condições ambientais dos experimentos foram satisfatórias para o desenvolvimento da doença, permitindo confirmar a elevada patogenecidade do isolado de *C. graminicola*, pois conferiu na linhagem suscetível L99-4 e em algumas progênies $F_{2:3}$ independentemente do experimento e da forma de avaliação da doença elevado comprimento médio das lesões.

As médias das variáveis CINT, CEXT e INT referentes ao segundo e terceiro experimentos refletiram normalmente em lesões maiores provavelmente pelas elevadas temperaturas e médias pluviométricas ocorridas no período safrinha, propiciando a melhor condição ambiental para a colonização do patógeno nos colmos inoculados (Anexo 1). Além disso, foi necessária a perfuração dos colmos para inoculação do patógeno a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo na unidade experimental. O ferimento ocasionado por este processo pode expor os colmos a infecção por patógenos secundários. A combinação destas fontes de variação poderiam ajudar a explicar a maior amplitude das médias das variáveis CINT, CEXT e INT no segundo e terceiro experimentos em relação ao primeiro. Vários trabalhos na literatura especializada indicam o efeito das condições ambientais sobre a colonização/desenvolvimento de *C. graminicola* em colmos de milho (KELLER; BERGSTROM; CARRUTHERS, 1986; KELLER; BERGSTROM, 1988; PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006; COSTA et al., 2010).

A geração F_1 nos três experimentos independente da forma de avaliação (CINT, CEXT e INT) se posicionou muito próximo da linhagem resistente L04-2. Esses resultados confirmam o potencial genético da fonte L04-2 em transmitir os genes de resistência à geração filial do cruzamento que participou como parental. Esta hipótese foi inicialmente levantada por Torrecija (2012) e confirmada por Máximo (2013) a partir da avaliação de três famílias segregantes da geração F_2 oriundas da mesma fonte de resistência (L04-2). A partir dos resultados obtidos com a análise de distribuição de freqüências das progênies $F_{2:3}$, evidencia-se que o padrão de distribuição das progênies independente da forma de avaliação (CINT, CEXT e INT) no segundo e terceiro

experimentos se aproxima de uma distribuição normal, característica de herança complexa ou seja presença de muitos alelos condicionando resistência à antracnose do colmo na população segregante do cruzamento (L04-2 x L99-4).

Para entender o controle genético da resistência de milho à podridão do colmo alguns autores têm avaliado a doença com base na área lesionada dos colmos (CHAMBERS, 1987; PEREIRA; BALMER; MIRANDA FILHO, 1989). No entanto, a grande limitação desta forma de avaliação diz respeito aos possíveis erros associados à determinação da área lesionada, uma vez que a colonização do patógeno não é uniforme no interior do colmo, além da variação existente no diâmetro dos entrenós em função da posição no colmo. De maneira geral, pela dificuldade para avaliar os sintomas interno e externo da lesão nos colmos, a grande maioria dos trabalhos utiliza uma escala de notas relativas ao número de internódios descoloridos (BLUM et al., 2003; CARSON; HOOKER, 1981; DENTI; REIS, 2001; FREY et al., 2011; HOLLEY, 1988; HOOKER, 1976; JUNG et al., 1994; MÁXIMO, 2013; KELLER; BERGSTROM, 1988; TOMAN; WHITE, 1993; YANG et al., 2005). Neste trabalho, além da avaliação direta da severidade da doença (CINT e CEXT) optou-se também por avaliar a resistência/suscetibilidade à antracnose do colmo nas progênies de milho através do número de internódios descoloridos (INT).

A linhagem resistente L04-2 evidenciou elevado padrão de resistência à *C. graminicola*, uma vez que a descoloração dos internódios ficou restrito em média a 1,68 internódios. Carson e Hooker (1981) verificaram que a linhagem resistente A556 apresentou INT variando de 1,04 a 1,34. Da mesma forma, Badu-Apraku, Gracen e Bergstrom (1987b) relataram que a linhagem resistente LB31 não ultrapassou a 1,0 internódio descolorido. Frey et al. (2011) encontraram em média 1,6 internódios descoloridos para as linhagens que continham o gene de resistência *Rcg*1. Recentemente, Máximo (2013) demonstrou que as linhagens utilizadas como fonte de resistência L_R04-2, L_R03-2 e L_R23-1, apresentaram em média apenas 1,49 internódios descoloridos.

Neste trabalho foram utilizadas três formas para avaliar a resistência à antracnose do colmo (CINT, CEXT e INT). Independentemente da forma de avaliação da doença, os resultados demonstraram a mesma tendência, ou seja, padrão resistente (L04-2 e F_1) e altamente suscetível (L99-4). Esta constatação também pode ser confirmada através dos elevados coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas. Estes resultados são condizentes com aqueles encontrados por Máximo

(2013) que estimou coeficiente de correlação do CEXT e CINT variando de 0,92 a 0,94 e de menor magnitude para a correlação CEXT/CINT com o INT. Os resultados permitem inferir que a avaliação da doença poderia ser realizada apenas pelo comprimento externo de lesão, o que facilitaria a fenotipagem da resistência pelos programas de melhoramento de milho pela economia no tempo e no número de avaliadores necessários para esta atividade a campo.

As estimativas dos parâmetros genéticos associados com a resistência das progênies de milho à antracnose do colmo confirmam a maior contribuição do componente genético para a variação fenotípica do comprimento interno e externo de lesão e do número de internódios descoloridos, evidenciando presença de variabilidade genética neste conjunto de progênies para resistência/suscetibilidade à antracnose do colmo, uma vez que foram obtidas a partir do cruzamento entre linhagens endogâmicas (L04-2 x L99-4) altamente contrastantes para a resistência à *C. graminicola*.

A herdabilidade no sentido amplo reflete a proporção da variação fenotípica que pode ser herdada, ou seja, quantifica a confiabilidade do valor fenotípico correlacionada ao valor genotípico total (ROSSMAN, 2001). Nos três experimentos, os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo (CINT, CEXT e INT) foram de elevada magnitude indicando grande facilidade no processo de seleção artificial uma vez que a maior parte da variação fenotípica da resistência/suscetibilidade foi explicada pelos efeitos genéticos. Os coeficientes de herdabilidade foram muito similares aos encontrados por Torrecija (2012) e por Máximo (2013). Importante destacar que embora a composição dos tratamentos (geração, linhagem e ou cruzamento) e os períodos de avaliação sejam diferentes nos três trabalhos, as linhagens L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) sempre estiveram presentes entre os diferentes tratamentos, confirmando o potencial genético da fonte L04-2 na transmissão dos alelos de resistência para as respectivas progênies $F_{2:3}$. Os elevados coeficientes de herdabilidade no sentido amplo estimados merecem destaque, uma vez que indicam facilidade no processo de seleção artificial pelos programas de melhoramento que buscam à resistência genética neste patossistema.

O quociente $\hat{b}$ é um parâmetro genético importante para os programas de seleção, pois quantifica a proporção da variabilidade genética disponível, através da relação entre o coeficiente de variação genético CV_g e o coeficiente de variação ambiental CV_e. Para as três formas de avaliação da antracnose do colmo neste conjunto de 121 progênies $F_{2:3}$, o quociente $\hat{b}$ foi bastante elevado, o que pressupõe uma

condição muito favorável para a seleção de progênies de milho resistentes à antracnose do colmo.

As elevadas magnitudes dos parâmetros genéticos: variância genética, herdabilidade no sentido amplo e quociente $\hat{b}$ para as três formas de avaliação da doença nos três experimentos, confirmam que o controle genético da resistência de milho à *C. graminicola* neste cruzamento (L04-2 x L99-4) possivelmente esteja associado à expressão de genes de grande efeito fenotípico. Estes resultados corroboram aqueles encontrados por Máximo (2013) que demonstrou a prevalência da ação gênica aditiva, e herança oligogênica da resistência à antracnose do colmo. A seleção artificial de progênies $F_{2:3}$ com menor CINT, CEXT e INT possibilitará incrementar o número de genótipos de milho com maior freqüência de alelos favoráveis para a resistência. Adicionalmente, pode-se inferir que os ganhos genéticos esperados com a seleção artificial de progênies de milho resistentes à *C. graminicola* podem ser facilmente alcançados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro para a realização do presente trabalho.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da Dissertação em um único tópico.

TABELA 3 − Resumo da análise de variância e dos coeficientes de correlação de Pearson do primeiro, segundo e terceiro experimento para as variáveis comprimento interno (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT). Ponta Grossa, 2014.

Fontes de Variação	**Quadrado Médio – QM**									
	1° Experimento			**2° Experimento**			**3°Experimento**			
	GL	**CINT**	**CEXT**	**INT**	**CINT**	**CEXT**	**INT**	**CINT**	**CEXT**	**INT**
Blocos	2	167,73**	1021,54**	1,68**	39,86	16,07	0,23	181,29**	744,89**	0,27
Tratamentos	123	448,06**	500,45**	2,94**	2514,19**	2612,78**	8,65**	2302,10**	2453,88**	8,21**
Resíduo	246	16,76	19,57	0,12	43,25	44,56	0,20	31,57	39,49	0,14
CV%		17,04	21,67	14,27	11,83	12,05	10,03	10,17	11,42	8,20
Média Geral		24,04	20,41	2,48	55,61	55,41	4,48	55,24	55,03	4,57
Média Progênies		23,78	20,14	2,47	55,70	55,51	4,51	55,42	55,25	4,59
L04-2 (LR)		12,43	6,87	1,59	20,64	17,31	2,14	9,10	4,44	1,30
L99-4 (LS)		78,83	77,14	5,63	117,63	118,03	6,00	102,48	102,48	6,00

Correlação	**1° Experimento**		**2° Experimento**		**3° Experimento**	
	CEXT	**INT**	**CEXT**	**INT**	**CEXT**	**INT**
CINT	0,95**	0,99**	0,99**	0,89**	0,98**	0,91**
CEXT		0,95**		0,89**		0,90**

** significativo a 1% de probabilidade.

TABELA 4 − Estimativa dos parâmetros genéticos associados à resistência à antracnose do colmo a partir das variáveis comprimento interno (CINT), externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT). Ponta Grossa, 2014.

Parâmetros	**1º Experimento**		
	CINT	**CEXT**	**INT**
$\hat{\sigma}^2_g$	143,76	160,29	0,94
$\hat{\sigma}^2_e$	16,76	19,57	0,12
$\hat{h}^2_a$	0,96	0,96	0,96
CVg (%)	50,37	62,85	38,86
CVe (%)	17,19	21,94	13,76
Quociente $\hat{b}$	2,93	2,86	2,82
Parâmetros	**2º Experimento**		
	CINT	**CEXT**	**INT**
$\hat{\sigma}^2_g$	823,64	856,07	2,81
$\hat{\sigma}^2_e$	43,25	44,56	0,20
$\hat{h}^2_a$	0,98	0,98	0,98
CVg (%)	51,50	52,68	37,02
CVe (%)	11,79	12,01	9,91
Quociente $\hat{b}$	4,40	4,39	3,73
Parâmetros	**3º Experimento**		
	CINT	**CEXT**	**INT**
$\hat{\sigma}^2_g$	756,84	804,79	2,69
$\hat{\sigma}^2_e$	31,57	39,49	0,14
$\hat{h}^2_a$	0,98	0,98	0,98
CVg (%)	49,62	51,33	35,72
CVe (%)	10,12	11,36	8,06
Quociente $\hat{b}$	4,90	4,51	4,42

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

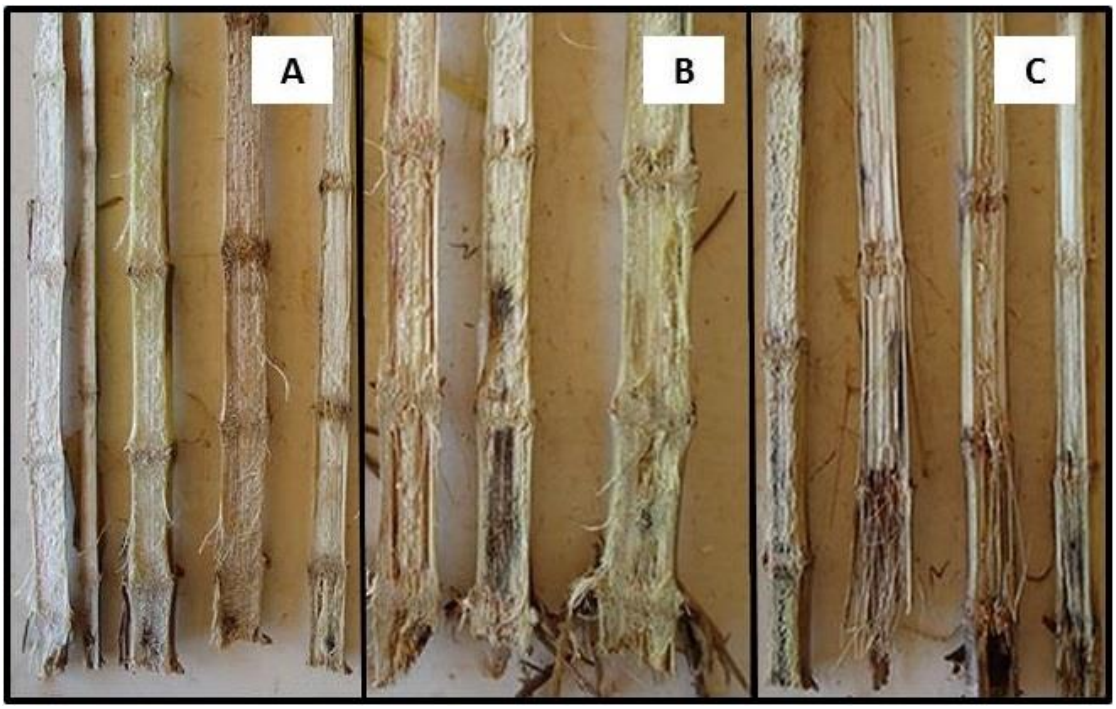

FIGURA 4 − Lesão interna da antracnose do colmo na linhagem resistente L04-2 (A), na geração F_1 (B) e na linhagem suscetível L99-4 (C). Ponta Grossa, 2014.

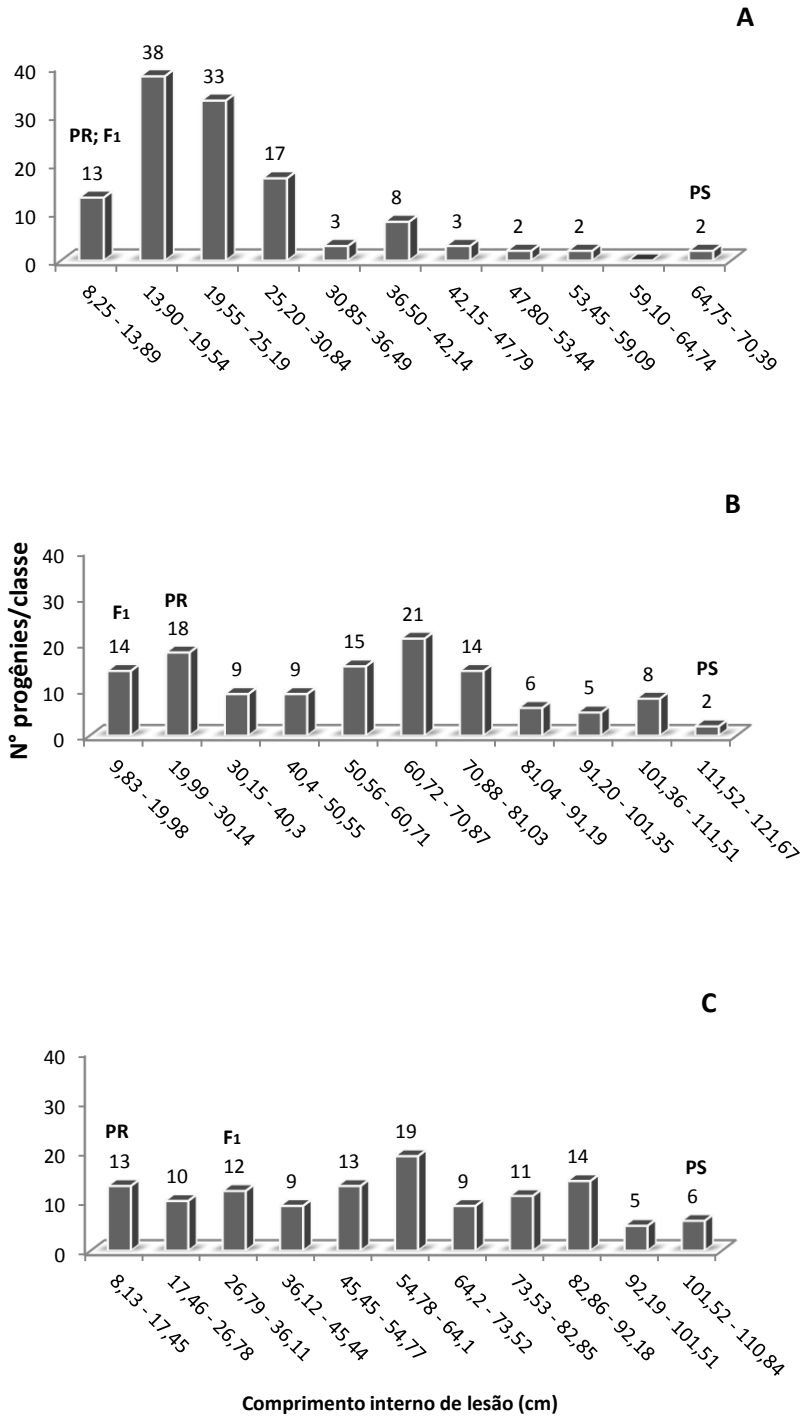

FIGURA 5 − Distribuição das médias do comprimento interno de lesão (CINT) entre as progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). PR = parental resistente, PS = parental suscetível e F_1= geração F_1. Ponta Grossa, 2014.

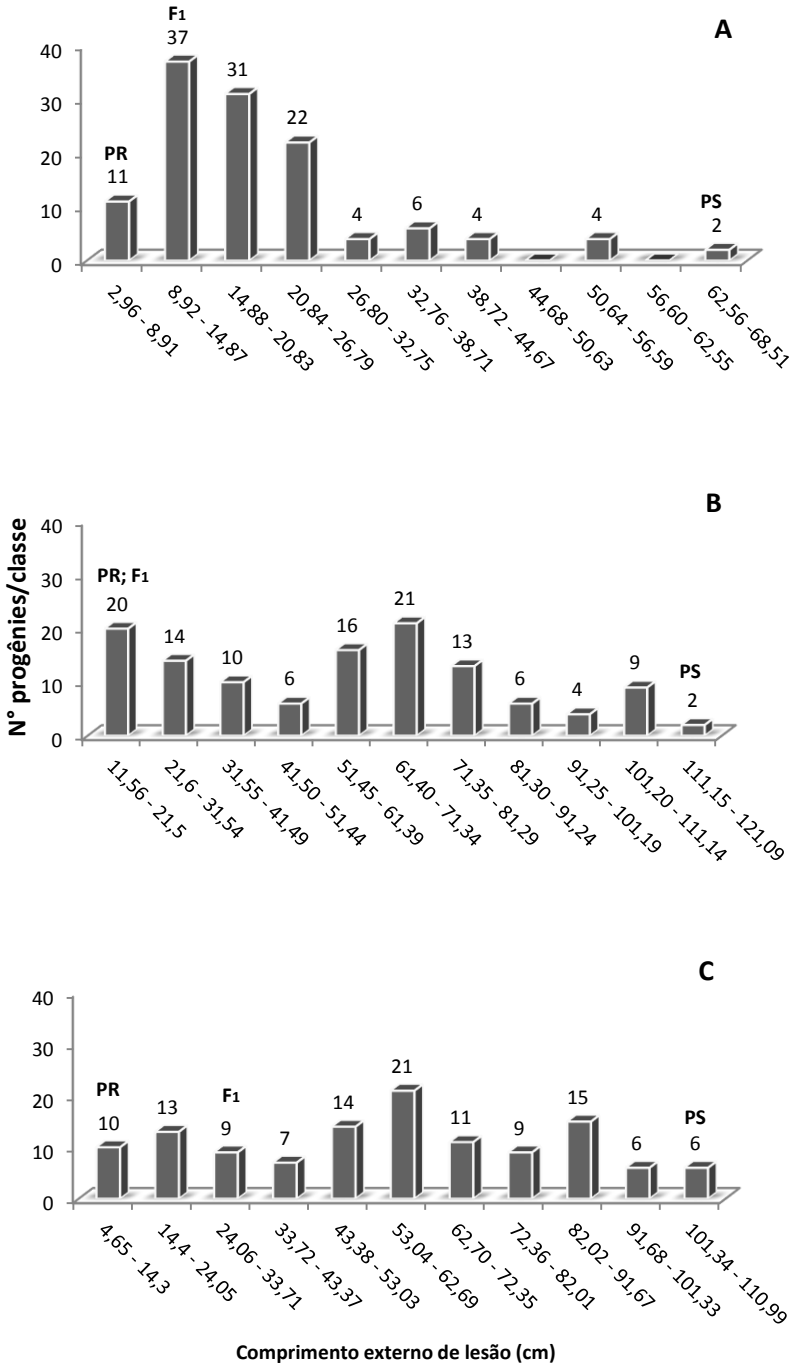

FIGURA 6 − Distribuição das médias do comprimento externo de lesão (CEXT) entre as progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). PR = parental resistente, PS = parental suscetível e F_1 = geração F_1. Ponta Grossa, 2014.

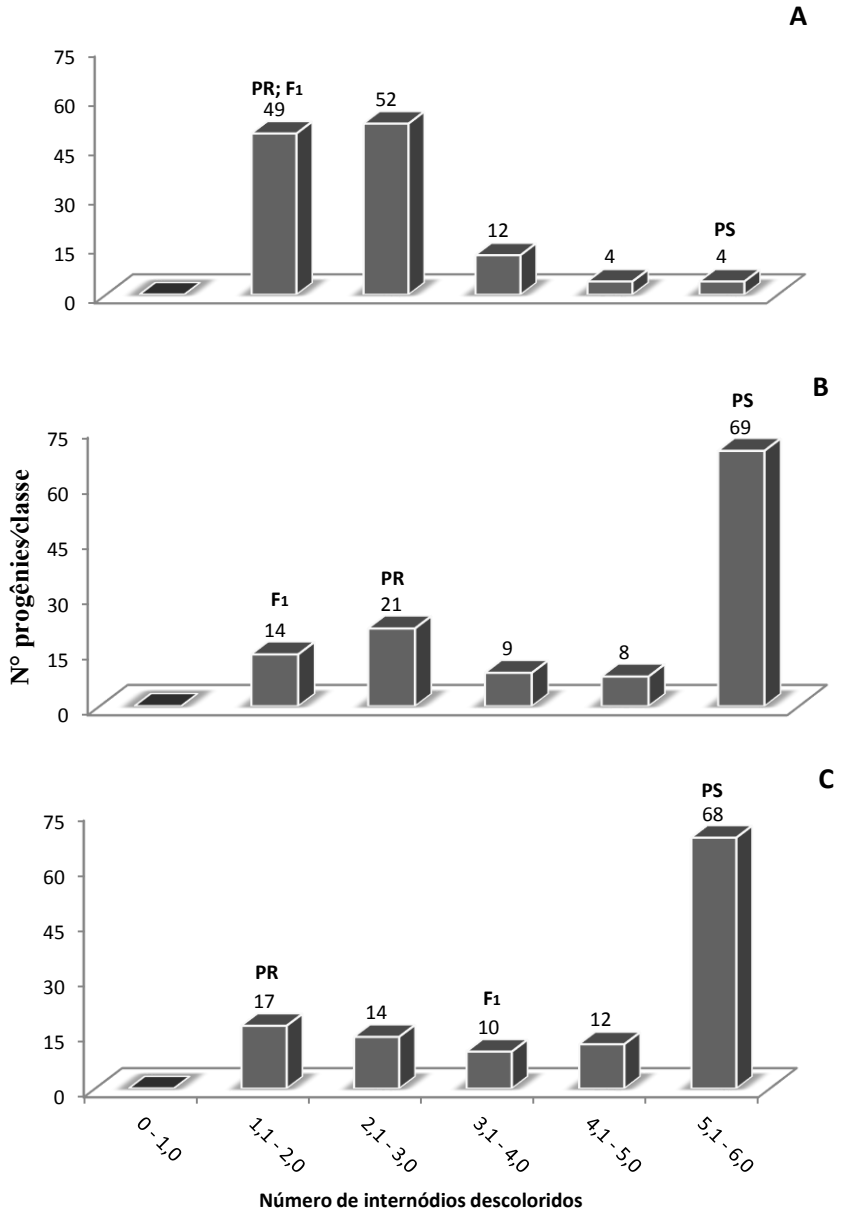

FIGURA 7 − Distribuição das médias do número de internódios descoloridos (INT) entre as progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L04-2 x L99-4 para o primeiro (A), segundo (B) e terceiro experimento (C). PR = parental resistente, PS = parental suscetível e F_1 = geração F_1. Ponta Grossa, 2014.

6 CAPÍTULO II

Mapeamento de locos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho

Manuscrito em preparo a ser submetido ao periódico Theoretical and Applied Genetics.

6.1 Mapeamento de locos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho.

Resumo

Os objetivos do trabalho foram mapear regiões genômicas associadas à alelos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho tropical e determinar os efeitos de cada loco sobre a resistência/suscetibilidade à *Colletotrichum graminicola.* Os indivíduos da geração F_2 foram autofecundados para gerar as progênies $F_{2:3}$, que foram avaliadas para resistência à antracnose do colmo em três experimentos de campo. Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, linhagens parentais (L04-2 e L99-4) e geração F_1, os quais foram utilizados como tratamentos controle. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados 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. As plantas dos experimentos foram inoculadas no estádio de florescimento pleno, através da injeção de 1 mL da suspensão de conídios, no meio do primeiro internódio do colmo. As avaliações dos sintomas foram realizadas 60 dias após a inoculação, através da determinação do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) em cm e do número de internódios descoloridos (INT). A associação dos marcadores microssatélites e AFLPs aos alelos de resistência foi realizada através da regressão linear múltipla. Locos microssatélites e AFLPs foram utilizados para a construção do mapa de ligação através do programa MAPMAKER versão 3.0. A detecção dos QTLs foi realizada pelo método de mapeamento por intervalo composto utilizando o programa *QTLCartographer*. Os resultados experimentais evidenciaram existência de grande variabilidade genética entre as progênies $F_{2:3}$ de milho para resistência/suscetibilidade à antracnose do colmo. As formas de avaliação da antracnose do colmo (CINT, CEXT e INT), foram igualmente eficientes em discriminar indivíduos resistentes dos suscetíveis. Os elevados coeficientes de herdabilidade no sentido amplo confirmam a grande contribuição da variância genética para resistência, o que assegura ganhos genéticos com a seleção artificial neste patossistema. A regressão linear múltipla possibilitou identificar marcadores microssatélites e AFLPs altamente associados a alelos de resistência. Os fragmentos AFLPs E55534, E4264 e E5172 evidenciaram a maior associação a QRLs para antracnose do colmo independente do experimento e da forma de avaliação da doença. O marcador AFLP E55534 explicou individualmente a maior proporção da variação fenotípica para resistência a partir do CINT (- 28,43%), do CEXT (- 27,70%) e do INT (- 27,45%). O mapeamento por intervalo composto identificou 31 QRLs à antracnose do colmo segregando na população de mapeamento, os quais foram mapeados entre os 10 grupos de ligação. Este é o primeiro relato de QRLs à antracnose do colmo mapeados nos cromossomos 2, 3 e 10. Pelo grande número de QRLs mapeados sugere-se que a herança da resistência neste germoplasma tropical seja mais complexa, condicionada por um grande número de genes, sendo alguns de grande efeito fenotípico e a grande maioria com pequenos efeitos para a resistência neste patossistema.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. QRLs. *Colletotrichum graminicola*. Resistência genética.

Introdução

A antracnose do colmo, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* é considerada uma doença de importância mundial para a cultura do milho. A antracnose do colmo promove danos diretos à planta pela colonização dos tecidos vasculares, levando ao acamamento e por consequência, a redução do enchimento de grãos e em algumas situações a morte prematura de plântulas (DENTI; REIS, 2001). Perkins e Hooker (1979) relataram redução superior a 17,2% no rendimento de grãos de híbridos em condição de infecção natural. A partir da inoculação de híbridos suscetíveis com *C. graminicola* White, Yanney e Natti (1979) estimaram reduções superiores a 40% no rendimento de grãos quando comparado com plantas não inoculadas. Estimativas de danos na produção, causados por *C. graminicola*, têm sido relatado em diversos países. Nos EUA, os danos na produção de grãos variaram de 10 a 20% em híbridos suscetíveis. Por outro lado, em países como a Índia, França e as Filipinas as estimativas chegam até 50% (CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1992; CARSON; HOOKER, 1981; PERKINS; HOOKER, 1979; SHURTLEEF, 1992; SMITH, 1976; WHITE; YANNEY; NATTI, 1979).

Silveira, Figueiredo e Cruz (1965) relataram pela primeira vez a presença da antracnose do milho no Brasil, no município de Campinas, Estado de São Paulo, em área de produção de sementes híbridas, com redução estimada de 30% na produção de grãos. Nazareno (1989) relatou danos na produção de grãos variando de 12 a 40% no estado do Paraná, os quais foram dependentes do ano, do local e do híbrido utilizado. Recentemente Matiello et al. (2013), estimaram danos na produção de grãos de um híbrido suscetível inoculado com *C. graminicola* variando de 16,1 à 20,2%.

Em relação ao controle genético, os estudos indicam que é condicionada por poucos genes, com predomínio da interação alélica aditiva (CARSON; HOOKER, 1981; LIM; WHITE, 1978; MATIELLO et al., 2012; WELDEKIDAN; HAWK, 1993). Há inúmeros trabalhos sobre a herança e o tipo de ação gênica envolvida na resistência de milho à *C. graminicola*, no entanto, estudos sobre localização/mapeamento de QRLs à antracnose do colmo são mais escassos e não conclusivos.

Carson e Hooker (1982) localizaram genes de resistência com maiores efeitos no braço longo dos cromossomos 1, 4 e 8 e nos dois braços do cromossomo 6. Jung et al. (1994) através do marcador molecular RFLP mapearam uma região genômica

localizada no cromossomo 4, fortemente associada a um loco de resistência quantitativa, explicando mais de 50% da variação fenotípica para a resistência. Matiello (2004) localizou sete regiões genômicas associadas a QRLs nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, as quais explicaram de 2,1 a 14,7% da variação fenotípica para resistência à antracnose do colmo. Parece existir um consenso nos trabalhos de mapeamento em relação à QRLs localizados no cromossomo 4, os quais normalmente explicam grande parte da variação fenotípica para resistência à antracnose do colmo.

Para Frey et al. (2011) o gene de resistência a antracnose do colmo *Rcg1*, pode contribuir para a redução do inóculo primário de *C. graminicola*, atrasando o desenvolvimento da doença e possibilitando a redução da quantidade de inóculo para a safra subsequente. Desta forma, reduzindo a probabilidade do patógeno se adaptar ao loco Rcg1, tornando a resistência genética mais durável a campo.

A localização de genes que controlam a resistência à antracnose do colmo em milho tanto em germoplasma temperado quanto em tropical é pouco relatado na literatura especializada. A determinação do número de QRLs, da ação gênica envolvida e o posicionamento destes QRLs no mapa consenso de milho podem contribuir para elucidar a base genética da resistência de milho a *C. graminicola*, o patógeno extremamente limitante à produtividade nas lavouras da cultura. Neste sentido, este estudo permitirá mapear as posições genômicas responsáveis por QRLs a *C. graminicola*, quantificar os efeitos dos QRLs para a resistência e inferir sobre o potencial genético dos QRLs mapeados frente aos diferentes ambientes de avaliação.

Material e Métodos

Material Vegetal

As linhagens tropicais endogâmicas de milho L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) foram cruzadas para obter a população segregante da geração F_2. Os indivíduos foram autofecundados para gerar as progênies $F_{2:3,}$ que foram avaliadas para resistência à antracnose do colmo em três experimentos de campo.

Avaliação da Resistência de Milho à Antracnose do Colmo

As progênies $F_{2:3}$ foram avaliadas nos experimentos, semeados em 28/09/2012, 14/11/2012 e 08/01/2013 na Fazenda Escola "Capão da Onça", da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, PR).

Os tratamentos foram constituídos de 121 progênies $F_{2:3}$, linhagens endogâmicas (L04-2 e L99-4) e a geração F_1, os quais foram utilizados como tratamentos controle. Os experimentos foram instalados no delineamento de blocos aleatorizados 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 foram realizados conforme descrito no item 3.1.3. As plantas dos experimentos foram inoculadas no estádio de florescimento pleno da cultura, através da injeção de 1mL da suspensão de esporos (5×10^5 conídios), no meio do primeiro internódio visível acima da superfície do solo, com seringa de uso veterinário.

Para a avaliação da resistência das progênies de milho à antracnose, os colmos inoculados foram seccionados longitudinalmente com uma serra fita elétrica. Foram determinados o comprimento interno de lesão (CINT), o comprimento externo de lesão (CEXT) em cm e o número de internódios descoloridos (INT) a partir da escala adaptada de Keller e Bergstrom (1988). Para o INT foram avaliados os seis primeiros internódios a partir do ponto de inoculação, sendo 1 na escala o indivíduo mais resistente e 6 o mais suscetível à doença. As médias das progênies $F_{2:3}$ para o CINT, CEXT e INT nos respectivos experimentos foram utilizadas para as análises de regressão linear múltipla e para o mapeamento por intervalo composto dos QRLs à antracnose do colmo.

Marcador SSR

79 locos microssatélites (SSR), distribuídos nos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, foram amplificados nas linhagens endogâmicas L04-2 e L99-4 e na geração F_1 a fim de selecionar locos polimórficos. Os locos SSR foram escolhidos a partir do *Maize Genetics and Genomics Data Base – Maize GDB* (http://www.maizegdb.org).

Nesta etapa foram utilizados DNA apenas das linhagens parentais (L04-2 e L99-4) e da geração F_1 com o intuito de otimizar a reação de amplificação dos locos SSR e selecionar aqueles polimórficos entre as linhagens endogâmicas. A reação de

polimerização em cadeia (PCR) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, contendo: 1X tampão Green GoTaq® Flexi; 2,0 mM $MgCl_2$; 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, Promega) e 40 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 et al., 2000) e um de ciclagem normal (YAO et al., 2007).

Os fragmentos amplificados foram corados com 5 µL de Gel Red 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TBE 1X por aproximadamente 3h a 80V. Em cada gel foi adicionado à extremidade esquerda uma amostra de 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 pb (NORGEN), para estabelecer o tamanho dos fragmentos gerados na amplificação.

Os 121 indivíduos da população de mapeamento (geração F_2) 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 L99-4 e (0) presença dos dois fragmentos correspondentes aos alelos das linhagens parentais L04-2 e L99-4.

Marcador AFLP

A metodologia de amplificação do marcador molecular AFLP foi de acordo com Vos et al. (1995). Inicialmente, foram testados 25 combinações de *primers Eco*RI e *Mse*I visando selecionar combinações de *primers* com melhor padrão de amplificação e maior polimorfismo entre as linhagens parentais e entre os bulks de DNA, constituídos pela mistura equitativa de dez indivíduos mais resistentes e pelos dez mais suscetíveis à antracnose do colmo a partir da fenotipagem da população de mapeamento de acordo com a metodologia de análise de bulks segregantes (BSA) proposto por Michelmore, Paran e Kesseli (1991). Das 25 combinações de *primers* testadas foram escolhidas 12 para genotipar todos os indivíduos que constituíam a população de mapeamento. Apenas os fragmentos polimórficos de cada combinação de *primers Eco*RI + *Mse*I foram genotipados em (1) presença e (0) ausência do fragmento. A denominação dos locos polimórficos genotipados seguiu a descrição de Castiglioni et al. (1999).

Associação dos Marcadores a QRLs pela Regressão Linear Múltipla

Os locos microssatélites e AFLPs genotipados na população de mapeamento foram submetidos à análise de regressão linear múltipla (EDWARDS; STUBER; WENDEL, 1987). As médias do CINT, CEXT e INT das progênies $F_{2:3}$ em cada experimento, bem como as médias oriundas da análise de variância conjunta dos 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 resistência nas análises individuais bem como na análise conjunta dos experimentos.

Na análise de regressão foram construídos modelos com os marcadores moleculares que permaneceram na análise de regressão linear múltipla pelo processo "stepwise" de seleção de variáveis regressoras utilizando-se um $\alpha = 5\%$ para a entrada e saída das marcas do modelo (DRAPER; SMITH, 1981).

Na genotipagem da população F_2 os locos microssatélites foram codificados em (1) para homozigotos para o alelo do genitor resistente (L04-2), (-1) para indivíduos homozigotos para o alelo marcador do genitor suscetível (L99-4) e (0) para indivíduos heterozigotos. Desta forma, a origem parental do alelo de resistência no QRL foi determinada pelo sinal do coeficiente de regressão: se negativo (decréscimo no comprimento das lesões), infere-se que o alelo de resistência descende do genitor resistente (L04-2) e, se positivo (acréscimo no comprimento das lesões), descende do genitor suscetível (L99-4). Por outro lado, os fragmentos AFLPs foram codificados com (1) para a presença e (0) para ausência do fragmento no indivíduo da população segregante. Se o coeficiente de regressão apresentar sinal negativo, indica que a presença do marcador AFLP está associada com a redução das lesões (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). Nestes casos, a origem parental do alelo marcador AFLP foi realizada através da leitura direta dos géis de poliacrilamida (Figura 10).

Análise de Ligação e Mapeamento de QRLs por Intervalo Composto (MIC)

Para a análise de ligação dos marcadores moleculares foram utilizados todos os locos SSR polimórficos bem como os locos AFLPs (não distorcidos e distorcidos

associados à QRLs pela regressão linear múltipla. A construção do mapa de ligação foi realizada pelo programa MAPMAKER versão 3.0 (LANDER et al., 1987). A definição dos grupos de ligação baseou-se no comando "group" utilizando-se um LOD de 4,0 (método da máxima verossimilhança), freqüência máxima de recombinação $\theta = 0,40$ e função de mapeamento de Haldane. Após a obtenção dos grupos, os marcadores dentro de cada grupo foram ordenados pelo comando "order" com LOD > 3,0. Foi utilizado o comando "ripple" para garantir a correta ordenação das marcas dentro do grupo de ligação.

Para o mapeamento dos QRLs foram utilizadas as médias das variáveis: comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) das 121 progênies $F_{2:3}$. A localização dos QRLs foi pelo mapeamento por intervalo composto (MIC) através do 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 estimação da posição, o efeito genético e a porcentagem da variação fenotípica (coeficiente de correlação parcial, R^2) dos QRLs foi estabelecida nos picos de LOD acima do nível de significância considerado (2,5) para o programa.

Resultados

Genotipagem com o marcador SSR

Dos 79 locos SSR, 45 (57%) foram monomórficos, ou seja, não informativos (alelos distintos) entre as linhagens parentais e 34 (43%) foram polimórficos entre as linhagens (Tabela 5). O maior número de locos polimórficos foram observados nos grupos 1, 4, 5 e 8, com no mínimo 4 e no máximo 7 locos por grupo de ligação (Tabela 5). O grupo 8 apresentou o maior polimorfismo (7 = 63,6%), especialmente na região compreendida entre os *bins* 8,04 a 8,08 (Tabela 6).

A genotipagem dos 121 indivíduos da população de mapeamento (L04-2 x L99-4) com os 34 locos SSR evidenciou um elevado índice de locos com distorção de segregação mendeliana (21/34), equivalendo a 61,8%. Segregação mendeliana esperada para marcador com expressão codominante (1:2:1) foi observado em 13 locos SSR (38,2%) (Tabela 5). Destes, 2 do grupo de ligação 1 (Bnlg149 e Bnlg615), 1 no grupo 3 (Bnlg197), 2 locos no grupo 4 (Bnlg2291 e Bnlg1337), 3 no grupo 5 (Umc2036,

Bnlg557 e Umc1348), 1 no grupo 7 (Bnlg434), 3 no grupo 8 (Bnlg2046, Bnlg1176 e Bnlg240) e 1 no grupo 9 (Umc2084) (Tabela 6).

Genotipagem com o marcador AFLP

Os padrões de amplificação dos fragmentos (polimórficos ou monomórficos) para o marcador AFLP podem ser visualizados a partir da combinação de primers *Eco*RI + *Mse*I (E31 = E-AGC/M-CAC) em parte dos indivíduos da população de mapeamento (Figura 9). Das 25 combinações de *primers* testadas na fase inicial, foram escolhidas doze combinações para genotipar os 121 indivíduos da população de mapeamento.

A genotipagem da população de mapeamento com as 12 combinações de primers *Eco*RI + *Mse*I amplificou um total de 695 fragmentos, com tamanho variando de 70 a 2000 pb. As diferentes combinações de *primers* amplificaram um número uniforme de fragmentos na população de mapeamento, com amplitude de 48 até 69 fragmentos. Dos fragmentos amplificados, 270 (38,8%) foram monomórficos e 425 (61,2%) polimórficos entre as linhagens parentais (L04-2 e L99-4), os quais foram utilizados para a construção do mapa de ligação (Tabela 7). A porcentagem de polimorfismo variou em função da combinação. Por exemplo, a E11 (E-AGT/M-CAC), revelou o menor polimorfismo (41,2%), ao passo que a E42 (E-ACA/M-CCA) a maior porcentagem, com 79,4% de fragmentos polimórficos (Tabela 7). Em média foram amplificados 35,4 fragmentos polimórficos/combinação de *primers*.

Os resultados da análise de bulks segregantes (BSA) para o marcador AFLP possibilitaram associar fragmentos AFLPs com polimorfismo entre os bulks de DNA (BR e BS) equivalendo aqueles amplificados na linhagem parental resistente L04-2 (associação com resistência) ou fragmentos oriundos da linhagem parental suscetível L99-4 (associação com suscetibilidade), para as médias fenotípicas do primeiro bem como para os do segundo/terceiro experimentos (Tabela 8 e Figura 10).

Das 25 combinações de *primers* AFLP testadas para a metodologia BSA foi possível encontrar associações favoráveis em 12 combinações (Tabela 8). O número de fragmentos amplificados associados com a análise BSA variou de 1 (E21, E22, E51, E54 e E55) a no máximo 4 (E31). Das 12 combinações genotipadas na população de mapeamento foram encontrados 23 fragmentos AFLPs associados com polimorfismo entre os bulks extremos (resistência ou suscetibilidade), com tamanho variando de 98

(E11) a 843pb (E31). A grande maioria dos fragmentos associados na análise BSA (85,7%) é oriundo do parental resistente (L04-2), exceto os fragmentos E1199, E1198, E12641, E14152 e E15133 que apresentaram polimorfismo de bulk associado com suscetibilidade à antracnose do colmo e oriundos da linhagem suscetível L99-4 (Tabela 8). As combinações E11, E15, E21, E22, E31, E35 e E42, evidenciaram pelo menos um dos fragmentos amplificados, associados com resistência (L04-2) para os três experimentos de campo (Tabela 8).

Mapa de ligação dos marcadores

Dos 459 fragmentos polimórficos (SSR e AFLP), somente 315 (68,6%) foram utilizadas para a análise de ligação. Das 315 marcas utilizadas, 304 foram agrupadas em 10 grupos de ligação utilizando como critério de agrupamento LOD score de 4,0 e freqüência máxima de recombinação $\theta = 0,40$. Foi possível estabelecer correspondência dos grupos de ligação gerados na análise com os 10 cromossomos de milho pela presença dos locos SSR de localização previamente conhecida (Figura 11).

Das marcas agrupadas, 261 (83%) foram ordenadas nos 10 grupos de ligação, utilizando como critério de ordenação LOD > 3,0. O número de marcas ordenadas variou de 20 nos cromossomos 6 e 7 a 34 no cromossomo 8, com média de 26 marcas/cromossomo. O comprimento dos grupos de ligação variou de 97,1 a 164,2 cM com comprimento total do mapa de ligação de 1302,7 cM, e distância média entre as marcas de 5,1 cM (Tabela 9).

Marcadores associados à QRLs pela regressão linear múltipla

A proporção da variação fenotípica explicada pelos modelos de regressão foi obtida pelo coeficiente de determinação R^2 e a proporção da variação fenotípica explicada pelos marcadores individualmente pelo R^2 parcial. Os modelos explicaram de 52,72 (CINT no 1° experimento) a 85,78% (INT no 2° experimento) da variação em resistência à antracnose do colmo (Tabelas 10, 11, 12 e 13). Considerando, os modelos testados, foram identificados 79 marcadores (SSR e AFLP) associados à QRLs para a antracnose do colmo, sendo 20 associados à QRLs no primeiro experimento, 22 no segundo, 15 no terceiro e 22 na análise conjunta dos experimentos. A análise de regressão linear múltipla evidenciou marcadores moleculares associados à QRLs nos 10

grupos de ligação do mapa consenso de milho. Dos marcadores associados à QRLs, independente da forma de avaliação da doença, 14 localizaram-se no cromossomo 1, 5 no cromossomo 2, 3 no cromossomo 3, 1 no cromossomo 4, 16 no cromossomo 5, 4 no cromossomo 6, 2 no cromossomo 7, 4 no cromossomo 8, 4 no cromossomo 9 e 3 no cromossomo 10 (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

No primeiro experimento, a maior porcentagem da variação fenotípica explicada pela associação marcador-QRL (69,79%) foi obtida para a avaliação do comprimento externo de lesão (Tabela 10). O loco AFLP E55534, oriundo da linhagem suscetível L99-4 (fase de repulsão) explicou as maiores proporções da variação fenotípica para a resistência (- 27,45 a - 28,43%) para as três formas de avaliação da doença (Tabela 10). Os locos AFLPs E5172 e E55112, oriundos da linhagem resistente L04-2, evidenciaram coeficientes de regressão parciais superiores a – 9,0% para as avaliações do CEXT e do INT (Tabela 10).

A maior contribuição da associação marcador-QRL para a redução da doença foi através da avaliação do número de internódios descoloridos (INT) no segundo experimento com 85,78% da variação fenotípica explicada pela associação marcadores-QRLs (Tabela 11). Dos marcadores associados à QRLs a antracnose do colmo, E5172, E4264, E11156 e Phi015 foram os que apresentaram os maiores coeficientes de regressão parciais com amplitude de - 12,15 a - 15,56%, em fase de associação dos marcadores-QRLs, pois todos os fragmentos descendem do genitor resistente L04-2 (Tabela 11).

No terceiro experimento, a maior porcentagem da variação fenotípica explicada pela associação marcador-QRL (80,12%), novamente foi obtida para a avaliação do número de internódios descoloridos (Tabela 12). O loco AFLP E35242, em fase de associação (origem L04-2), explicou a maior porcentagem da variação fenotípica em resistência tanto para o CINT (- 11,6%) quanto para o CEXT (- 12,09%). Para o INT, destaque para o loco E11156 em fase de associação, também evidenciou grande contribuição para a redução da antracnose do colmo, explicando – 9,38% da variação fenotípica para a resistência (Tabela 12). Para a análise conjunta, o modelo de regressão linear múltipla pra o INT explicou a maior proporção da variação fenotípica em resistência (79,44%) (Tabela 12). Nesta análise, o marcador AFLP E35242 (fase de associação) apresentou o maior coeficiente de regressão parcial para a redução da doença tanto para o CINT (- 14,02%) quanto para o CEXT (- 14,23%). Adicionalmente para o CEXT, os locos AFLPs E12367 (associação) e E51120 (repulsão) evidenciaram

coeficientes de regressão parciais significativos para a redução da doença, com coeficientes de - 8,82 e - 9,18%, respectivamente (Tabela 13).

Das 12 combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I, genotipadas na população de mapeamento, os resultados das análise de regressão linear múltipla evidenciaram que 76 marcas (AFLP e/ou SSR) foram associados à QRLs a partir das variáveis CINT, CEXT e INT nos três experimentos de campo. A combinação E21 (E-ATC/M-CAC) gerou apenas 1 fragmento (E21608) associado a alelos de resistência. Das combinações testadas, a E51 (E-AAC/M-CAC) evidenciou o maior número de marcadores associados com QRLs à antracnose do colmo, sendo 5 (CINT), 5 (CEXT) e 6 (INT) (Tabela 14). A combinação E55 (E-AAC/M-CAT) amplificou o fragmento AFLP E55534, o qual evidenciou pela análise de regressão linear múltipla do primeiro experimento a maior associação favorável a QRLs à *C. graminicola*, independente da forma de avaliação da doença, com coeficientes de regressão parciais variando de - 28,43 para o CINT, - 27,7 para o CEXT e de - 27,45% para o INT (Tabela 10).

Mapeamento de QRLs

A análise de mapeamento por intervalo composto possibilitou mapear vários QRLs a partir da avaliação do CINT, CEXT e INT da antracnose do colmo, para os três experimentos de fenotipagem da resistência/suscetibilidade de indivíduos da geração F_2 (L04-2 x L99-4). 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 do colmo. O maior número de QRLs foi identificado no primeiro experimento, com 23 QRLs para o CINT, 22 para o CEXT e 20 para o INT, sendo que os QRLs foram mapeados com número variável nos 10 grupos de ligação (cromossomos) do mapa consenso de milho. Para o segundo e terceiro experimentos, o número de QRLs foi muito similar, com 5 e 4 (CINT); 6 e 5 (CEXT) e 16 e 13 QRLs (INT), respectivamente. O menor número de QRLs mapeados foi da análise conjunta dos experimentos com 3 QRLs (CINT e CEXT) e 9 para o INT. As estimativas das posições e dos efeitos aditivos e de dominância de todos os QRLs mapeados são apresentados na Tabela 15. Os gráficos com os valores do LOD score ao longo dos grupos de ligação (cromossomos) são apresentados nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

Comprimento interno de lesão (CINT)

No primeiro experimento foram identificados QRLs significativos em 23 diferentes intervalos para o CINT (Tabela 15 e Figura 12). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 29,5% para o QRL do grupo de ligação (GL) 8 na posição 100,7 cM a 65,1% para o QRL do GL 2, na posição 40,0 cM. O maior valor de LOD *score* foi de 10,8 para o QRL localizado no GL 7 no intervalo Phi034-E22109. Dos QRLs identificados para o CINT, apenas 5 apresentaram efeito aditivo negativo, sendo provenientes da linhagem resistente L04-2. Estes QRLs foram identificados nos respectivos intervalos: E51106-E51163 (GL 1), E35163-E21369 (GL 2), E51120-E51121 (GL 5), Phi034-E22109 (GL 7) e E21155-E22330 (GL 10). Os demais QRLs tem origem na linhagem suscetível L99-4. O QRL localizado no grupo de ligação 5, no intervalo E51120-E51121 também foi identificado na análise de regressão linear múltipla através do marcador AFLP E51120 (R^2 = - 4,8%). Nenhum dos marcadores que flanqueiam os demais QRLs foram identificados pela análise de regressão linear múltipla.

Para o segundo experimento foram mapeados apenas 5 QRLs (Tabela 15 e Figura 13). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 16,8% (GL 10) na posição 41,2 cM a 53,7% para o QTL localizado no GL 1 (126,7 cM). Apenas 2 QRLs apresentaram efeito aditivo negativo neste experimento, mapeados no cromossomo 2, compreendendo os intervalos E21307-E42207 (2,1 cM) e E35163-E21369 (40,0 cM) (Tabela 15).

No terceiro experimento foram mapeados 4 QRLs, sendo que em 3 intervalos foi observado efeito aditivo negativo. Os intervalos mapeados correspondem aos cromossomos: 1 (E22333-E55534), 2 (E21307-E42207) e 7 (Phi034-E22109). O QRL do intervalo E22333-E55534 foi identificado também na análise de regressão linear múltipla por ambos marcadores (E22333 e E55534). Destaque positivo para o marcador AFLP E55534 que evidenciou nas análises de regressão linear múltipla o maior coeficiente de regressão parcial negativo (Tabela 10). O QRL identificado na posição 128,7 cM do cromossomo 1, evidenciou um R^2 de 61,9 % e LOD score de 4,2 (Tabela 15 e Figura 14). Na análise conjunta apenas 3 QRLs foram identificados para a variável CINT, nos cromossomos 1, 2 e 10, sendo responsáveis por 51,7; 18,6 e 16% da variação fenotípica (Tabela 15 e Figura 15).

Os QRLs mapeados a partir da avaliação do comprimento interno de lesão (CINT) evidenciaram para a maioria a interação QRLs x ambientes de avaliação (experimento). Apenas o QRL do cromossomo 1, no intervalo dos marcadores E22333-

E55534 (116,9 à 132,5 cM) foi identificado nos três experimentos de fenotipagem com coeficientes de regressão parcial variando de 51,7% (conjunta) a 62,3% (1° experimento). Adicionalmente, outros QRLs estáveis tenham sido identificados no 1° e 2° experimento e no 2°, 3° e na análise conjunta (Tabela 15).

Comprimento externo de lesão (CEXT)

No primeiro experimento foram identificados QRLs significativos em 22 intervalos para o CEXT (Tabela 15 e Figura 12). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 28,8% para o QRL do grupo de ligação 8 (posição 100,7 cM) a 66,4% do GL 2 (posição 39,9 cM). O maior valor de LOD *score* foi de 14,3 para o QRL localizado no GL 1, no intervalo entre os marcadores E22333-E55534. Dos QRLs mapeados, apenas 4 apresentaram efeito aditivo negativo, sendo os demais QRLs provenientes da linhagem suscetível (L99-4). QRLs oriundos da fonte de resistência L04-2 foram mapeados nos intervalos: E35163-E21369 (GL 2), E51120-E51121 (GL 5), Phi034-E22109 (GL 7) e E21155-E22330 (GL 10). O QRL do cromossomo 5, também foi identificado pela análise de regressão linear múltipla para o marcador E51120, com R^2 de 7,19% (Tabela 11).

Para o 2° experimento foram mapeados apenas 6 QRLs (Tabela 15 e Figura 13). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 16,6 (GL 10) posição 40,6 cM a 61,3% para o QRL localizado no GL 5, posição 139,1 cM. Dois dos seis QRLs apresentaram efeito aditivo negativo, identificados nos intervalos E21307-E42207 (2,0 cM) e E35163-E21369 (39,9 cM) do cromossomo 2 (Tabela 15 e Figura 13). No 3° experimento foram mapeados 5 QRLs, sendo que em três intervalos foi observado efeito aditivo negativos. Os intervalos mapeados foram E22333-E55534 (GL 1), E21307-E42207 (GL 2) e Phi034-E22109 (GL 7). O QRL do intervalo E22333-E55534 também foi identificado na análise de regressão linear múltipla pelos marcadores (E22333 e E55534). Para a análise conjunta, foram mapeados 3 QRLs, nos cromossomos 1, 2 e 10 (Tabela 15 e Figura 15).

Os QRLs mapeados a partir da avaliação do CEXT evidenciaram na grande maioria interação QRLs x ambientes de avaliação (experimento). O QRL presente no cromossomo 1, no intervalo E22333-E55534 (116,9 à 132,5 cM) foi identificado para os três experimentos com coeficientes de regressão parcial numa amplitude de 51,8% (conjunta) a 63,5% (1° experimento). O intervalo E21307-E42207 (GL 2) foi

identificado no segundo, terceiro e na análise conjunta dos experimentos, e o QRL correspondente ao intervalo Phi034-E22109 (GL 7) no segundo e terceiro experimento. Esses QRLs foram os mesmos mapeados na análise do CINT.

Número de internódios descoloridos (INT)

No primeiro experimento foram mapeados QRLs significativos em 20 diferentes intervalos (Tabela 15 e Figura 12). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 34,1% para o QRL do grupo de ligação 3 (posição 74,1 cM) a 58,2% para o QRL localizado no GL 1 (posição 119,3 cM). Destes QRLs, apenas 6 apresentaram efeito aditivo negativo, mapeados nos cromossomos: 1 (E51106-E51163), 4 (E55299-E35176), 5 (E51120-E51121), 7 (E21466-E31715 e Phi034-E22109) e 10 (E21155-E22330). O QRL mapeado no intervalo E51120-E51121 foi identificado pela regressão linear múltipla para o marcador E51120, com coeficiente de regressão de 7,19% (Tabela 11).

O MIC possibilitou a localização de 16 regiões genômicas associadas à QRLs para a avaliação do INT no 2° experimento (Tabela 15 e Figura 13). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QRLs variou de 46,6% (GL 2) na posição 41,0 cM a 82,7% para os QRLs localizados nos cromossomos 4 (114,1 cM) e 5 (136,9 cM). Dos QRLs mapeados, 9 QRLs apresentaram efeito aditivo negativo, nos cromossomos: 1 (E54168-E12260), 2 (E35163-E21369 e E21307-E42207), 4 (E21608-E55198), 6 (E14413-E15236), 7 (E21466-E31715 e Phi034-E22109), 9 (E3586-E14268) e no 10 (E21155-E22230).

No terceiro experimento foram mapeados 13 QRLs, sendo que em 8 intervalos foi observado efeito aditivo negativo. Os intervalos mapeados foram E21307-E42207 (GL 2), E21608-E55198 (GL 4), E5499-E54172 e E54229-E15295 (GL 5) E14413-E15236 (GL 6), Phi034-E22109 (GL 7), E54210-E55111 (GL 8) e E3586-E14268 (GL 9). Os QRLs dos intervalos E5499-E54172 e E54229-E15295 foram identificados também na análise de regressão linear múltipla pelos marcadores E5499 (- 1,73% de variação) e E15295 (- 3,05%). Alguns QRLs apresentaram interação com os ambientes avaliados (experimento). O QRL mapeado no intervalo Phi034-E22109 no cromossomo 7, foi identificado nos três experimentos, assim como na análise conjunta.

Os resultados da análise de mapeamento por intervalo composto possibilitou mapear várias regiões genômicas responsáveis por alelos de resistência à antracnose do colmo em milho a partir de três formas distintas de avaliação da doença nos três

experimentos de fenotipagem. Foram mapeados 31 QRLs distribuídos nos 10 cromossomos de milho, sendo que os cromossomos 1 (5 QRLs), 7, 8 e 10 (4 QRLs), contribuíram com o maior número de alelos de resistência para à antracnose do colmo. Na grande maioria dos QRLs mapeados evidenciou-se interação QRL x ambiente de avaliação (experimento) ou QRL x forma de avaliação da doença. Apenas o QRL localizado no cromossomo 1, no intervalo dos marcadores E22333-E55534 (116,9 a 132,5 cM) foi estável para os três ambientes de avaliação/análise conjunta bem como para as três formas de avaliação da doença. Dos 31 QRLs mapeados, 13 QRLs evidenciaram efeito aditivo negativo, ou seja, alelos de resistência originários da fonte de resistência L04-2 e 18 QRLs (efeito aditivo positivo) representaram alelos de resistência provenientes da linhagem suscetível L99-4 (Tabela 15).

Discussão

O polimorfismo molecular encontrado entre as linhagens L04-2 e L99-4 (43%) pode ser considerado adequado quando comparado a outros trabalhos envolvendo linhagens endogâmicas tropicais de milho: 50% (OGLIARI, 1999), 31% (BRUNELLI; SILVA; CAMARGO, 2002), 45% (LOPES, 2003) e 39,4% (MATIELLO, 2004). A genotipagem da população de mapeamento utilizando combinações de primers *Eco*RI + *Mse*I (AFLP) amplificaram um número uniforme de fragmentos entre as combinações, sendo que 61,2% dos fragmentos (425) foram polimórficos. Legesse et al. (2008) trabalhando 9 combinações de *primers* AFLP (*Eco*RI + *Mse*I) amplificaram 601 fragmentos, dos quais 80,5% foram polimórficos. Da mesma forma, Kiula; Lyimo e Botha (2008) a partir de 5 combinações de *primers* AFLP, amplificaram 278 fragmentos, dos quais 238 foram polimórficos (85,6%).

O polimorfismo molecular estimado neste trabalho foi muito superior aos relatados em outros estudos envolvendo o marcador AFLP. Castiglioni et al. (1999), revelaram polimorfismo de 18,5% a partir de 11 combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I numa população (F_2) oriunda do cruzamento entre linhagens de origem temperada. Possivelmente, a ausência de seleção prévia de combinações de *primers* de alto polimorfismo e baixa dissimilaridade entre os genitores da população de mapeamento poderiam explicar o baixo polimorfismo estimado. Por outro lado, Vuylsteke et al. (1999), estudando os mesmos grupos heteróticos temperados em duas populações (geração F_2 e linhagens puras recombinantes), obtiveram polimorfismo variando de 35,7 a 36,3%, respectivamente, a partir de 41 combinações de *primers Eco*RI + *Mse*I.

Matiello (2004) estimou em 33,7% o índice de polimorfismo molecular a partir da genotipagem de 17 combinações de *primers EcoR*I + *Mse*I numa população da geração F_2 oriunda do cruzamento entre linhagens tropicais.

Pela alta repetibilidade, poder de saturação de genomas e praticidade, o marcador AFLP tem sido considerado um marcador com grande aplicação em análise sistemática, genética populacional e mapeamento de genes de herança quantitativa – QTLs (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999). A comprovada eficácia e confiabilidade do AFLP levaram ao aumento da sua utilização, sobretudo em estudos de diversidade, filogenia, construção de mapas saturados e na identificação de cultivares/híbridos (PAPA; GEPTS, 2003).

Os resultados prévios da associação de fragmentos AFLPs a QRLs à antracnose do colmo a partir da análise de bulks segregantes (BSA) possibilitou encontrar associações favoráveis em 12 combinações de *primers* (*Eco*RI + *Mse*I) das 25 inicialmente testadas pela metodologia BSA. Os grupos ou "bulks" segregantes (BSA) podem ser empregados numa etapa inicial das análises de mapeamento com o intuito de reduzir o número de combinações de *primers* AFLPs genotipados na população de mapeamento (LOPES, 2003).

Na análise de regressão linear múltipla o procedimento "stepwise" seleciona as variáveis regressoras (marcadores) procurando o melhor modelo de regressão através da exclusão de marcas com informação redundante. A princípio cada marca que entra no modelo possivelmente esteja associada a um QRL diferente. Porém, em diferentes avaliações, as variáveis regressoras (marcadores) podem ser alteradas, seja porque existem QRLs com efeito importante apenas em determinados momentos ou porque a associação de um marcador que identificou um determinado QRL numa avaliação pode ser menos significativo do que a associação do mesmo QRL a outro marcador próximo em outra avaliação (LOPES, 2003).

Os resultados das análises de regressão linear múltiplas demonstraram a presença de QRLs associados à antracnose do colmo originários tanto da linhagem resistente L04-2 quanto da suscetível L99-4. De maneira geral, as associações entre os marcadores moleculares e os QRLs pela regressão linear múltipla foram dependentes do ambiente de avaliação (safra ou safrinha), pois na maioria das associações significativas marcadores-QRLs à antracnose do colmo ficou visível a interação dos QRLs com as condições ambientais inerentes dos experimentos. Evidencia-se que o maior número de associações significativas de marcadores-QRLs, para a redução da severidade da

antracnose do colmo, foram encontrados para o primeiro experimento. Estes resultados são condizentes uma vez que a caracterização fenotípica das progênies $F_{2:3}$ no primeiro experimento evidenciou um predomínio de progênies ranqueadas nas classes fenotípicas de maior resistência juntamente com a linhagem endogâmica (L04-2) utilizada no cruzamento como fonte de genes de resistência.

Matiello (2004) estudando o patossistema milho x *C. graminicola*, encontrou vários marcadores ligados a QRLs à antracnose do colmo a partir da análise de regressão linear múltipla e seleção de variáveis regressoras pelo procedimento "stepwise". Os modelos obtidos pela análise de regressão linear múltipla explicaram desde 44 (1º experimento) a 63% (análise conjunta) da variação fenotípica em resistência/suscetibilidade à antracnose do colmo. Estes índices foram muito similares a outros estudos de resistência quantitativa para patógenos na cultura do milho, como em *Cercospora zeae-maydis* (BUBECK et al., 1993; SAGHAI MAROOFF et al., 1996), *Exserohilum turcicum* (FREYMARK et al., 1994), *Gibberella zeae* (PÈ et al., 1993), míldio (GEORGE et al., 2003) e *Puccinia polysora* (HOLLAND et al., 1998). Matiello (2004) identificou sete marcadores ligados a alelos de resistência à antracnose do colmo em regiões genômicas distintas com coeficientes de regressão parciais variando de - 2,1 (cromossomo 6) à - 14,7% (cromossomo 4). O marcador AFLP E4462470 explicou a maior magnitude da variação para resistência à antracnose do colmo, com coeficiente de regressão parcial de - 14,7%. Provavelmente, o QRL identificado por Matiello (2004) no cromossomo 4 (bin 10), seja o mesmo gene de resistência mapeado por Jung et al. (1994), localizado no cromossomo 4 (bin 8), responsável por 73% da variação fenotípica para resistência.

Os marcadores AFLPs E55534, E4264 e E5172 evidenciaram independente do ambiente de avaliação (experimento) e da forma de quantificar a doença elevados coeficientes de regressão parcial, com índices de - 28,43; - 15,56 e - 15,18%, respectivamente. Outro ponto importante a ser destacado, diz respeito à origem dos marcadores associados a alelos de resistência à antracnose do colmo. A grande maioria dos marcadores significativamente associados a alelos de resistência é originário da fonte de resistência L04-2, embora um número considerável de marcadores associados à QRLs tenham origem na linhagem suscetível L99-4. Por outro lado, a regressão linear múltipla possibilitou identificar marcadores moleculares associados a alelos de suscetibilidade a *C. graminicola* com origem na própria fonte de resistência (L04-2).

Para a utilização de marcadores moleculares em larga escala em programas de seleção assistida por marcadores (SAM), é necessário que a análise seja simples, rápida, confiável e de baixo custo. Embora o marcador AFLP seja extremamente eficiente para saturar genomas e possibilitar o mapeamento de características de interesse, a técnica não é prática o suficiente para uso em larga escala pelos programas de melhoramento vegetal. Assim, uma estratégia interessante seria converter marcadores AFLPs associados a genes de interesse em marcadores de expressão codominante baseados na reação de PCR (BRADEEN; SIMON, 1998; PALTRIDGE et al., 1998). Esses marcadores PCR-específicos denominados de SCARs, são mais informativos e adequados para uso em larga escala pelos programas de melhoramento.

O máximo de informação genética é obtido a partir da utilização de marcadores codominantes, entretanto, o custo para saturar genomas com esse marcador é alto para a maioria dos laboratórios. Dessa forma, o uso combinado de marcadores microssatélites em posições estratégicas (âncoras) e marcadores AFLPs (baixo custo por loco e maior número de locos por reação) apresenta-se como uma alternativa muito interessante para a saturação dos genomas.

A genotipagem da população de mapeamento com 17 marcadores microssatélites (SSR) de localização genômica conhecida no mapa consenso de milho, possibilitou através da análise de ligação dos marcadores SSRs e AFLPs, co-localizar os fragmentos AFLPs sem posição genômica previamente conhecida. Os resultados da análise de ligação possibilitaram atribuir referência cromossômica aos 10 grupos de ligação em função da presença de pelo menos um loco microssatélite no respectivo grupo de ligação, sendo condizentes com outros trabalhos que utilizaram a mesma estratégia de ação (LOPES, 2003; MATIELLO; 2004; REZENDE, 2004). A amplitude do comprimento dos grupos de ligação (97,1 a 164,2 cM) bem como o comprimento total do mapa de ligação (1302,7 cM) está de acordo com o mapa de ligação (1482 cM) gerado a partir de uma população da geração F_2 do cruzamento de linhagens endogâmicas tropicais (MATIELLO, 2004). Da mesma forma Vylsteke et al. (1991) trabalhando com duas populações distintas de germoplasma temperado de milho (220 indivíduos F_2 e 208 RILS) a partir da genotipagem com 1402 e 1723 locos marcadores, respectivamente, relataram mapas de ligação com comprimento total de 1375,6 e 1178, 1 cM. O mapa de ligação gerado por Castiglioni et al. (1999) apresentou uma cobertura genômica de 2057 cM, com distância média entre marcadores de 6,6 cM. Possivelmente, a maior cobertura do genoma em relação aos outros trabalhos deve-se ao

tamanho da população segregante utilizada para gerar o mapa de ligação (229 famílias), possibilitando a maior amostragem dos gametas e com isso aumentando a probabilidade de ocorrência de eventos de crossing-over. No presente trabalho, a distância média entre marcas (SSRs e AFLPs) foi de 5,1 cM, o que demonstra uma excelente cobertura do genoma desta população segregante.

A análise de mapeamento por intervalo composto a partir da fenotipagem da população $F_{2:3}$ (L04-2 x L99-4) em três ambientes de avaliação (experimentos) utilizando três formas para quantificar a severidade da antracnose do colmo (CINT, CEXT e INT) e da genotipagem dos indivíduos da geração F_2 com os marcadores SSRs e AFLPs, possibilitou mapear um elevado número de regiões genômicas responsáveis por QRLs. Em alguns intervalos foram mapeados QRLs coincidentes para as diferentes formas de avaliação da doença bem como entre os ambientes de avaliação.

Para Jiang e Zeng (1995) a ocorrência de efeitos genéticos de magnitudes não coincidentes para um QRL mapeado em diferentes ambientes, ou à não expressão do QRL em alguns dos ambientes de avaliação, caracteriza a ocorrência da interação QRLs x ambiente. No milho, o estudo da interação QTLs x ambientes avaliados é de grande importância principalmente em países de clima tropical, em que a diversidade de ambientes é bastante ampla devido às variações edafo-climáticas (BENTO, 2006). O QRL mapeado no cromossomo 1, no intervalo E22333-E55534, demonstrou estabilidade pois foi expresso nos 3 experimentos/análise conjunta e para as três formas de avaliação da antracnose do colmo, evidenciando assim o baixo efeito da interação.

Neste trabalho foram mapeados 31 QRLs à antracnose do colmo em diferentes intervalos (posições) nos 10 grupos de ligação ou cromossomo de milho. Possivelmente, este elevado número de QRLs mapeados sejam em função: do elevado contraste fenotípico da resistência entre as linhagens parentais da população de mapeamento, obtenção do mapa de ligação dos marcadores moleculares bastante saturado com distância média entre marcas de 5,1 cM, caracterização da resistência/suscetibilidade em diferentes ambientes de avaliação e múltiplas formas e avaliação da severidade da doença nas progênies $F_{2:3}$ da população de mapeamento.

Estudos disponíveis na literatura especializada indicam grande divergência de informações em relação ao número de genes que controlam a resistência à podridão do colmo em milho. Carson e Hooker (1982) localizaram genes ou blocos gênicos de resistência à antracnose do colmo num híbrido altamente resistente, por meio de

translocações recíprocas. Os autores localizaram genes de grande efeito no braço longo dos cromossomos 1, 4 e 8 e nos dois braços do cromossomo 6.

Nos últimos anos a utilização de metodologias de análise de dados de genotipagem e dados de genotipagem através de marcadores moleculares tem permitido mapear genes de resistência a inúmeros patógenos em plantas cultivadas (MACMULLEN; SIMCOX, 1995). Jung et al. (1994) mapearam uma região genômica no cromossomo 4, explicando mais de 50% da variação fenotípica para a resistência. Posteriormente, em 2004, Matiello (2004) localizou sete regiões genômicas associadas a QRLs 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.

Os resultados da análise de mapeamento por intervalo composto permitem inferir sobre a existência de um QRL de grande efeito fenotípico no cromossomo 4 (originário da fonte de resistência L04-2). Este QRL mapeado no intervalo E21608-E55198 (113,9 a 114,1 cM), explicou uma grande porcentagem da variação fenotípica em resistência para a variável INT (75,4 a 82,7%) no 2°, 3° e na análise conjunta dos experimentos, com LOD scores variando de 8,6 a 14,7%. Possivelmente esta região genômica possa ser a mesma mapeada por Jung et al. (1994) através do marcador RFLP, a qual explicou mais de 50% da variação fenotípica para a resistência à antracnose do colmo.

Neste trabalho, a localização de alguns QRLs diferiu em relação a outros estudos, como a identificação pela primeira vez de QRLs nos cromossomos 2, 3 e 10. Estas diferenças podem ser atribuídas a questões metodológicas (tipo de população, marcador e metodologia de análise), ou por diferenças relacionadas a origem do germoplasma sob análise (tropical x temperado). A grande maioria dos QRLs mapeados em milho contemplam quase que exclusivamente genótipos originados de populações temperadas. É relativamente recente as pesquisas que visam identificar/mapear genes de resistência a doenças a partir de germoplasma tropical.

Para McMullen e Simcox (1995) os locos que condicionam resistência em milho às diferentes doenças não estão distribuídos ao acaso no genoma, mas agrupados em determinadas regiões cromossômicas. Os autores indicam QTLs de resistência a diversas doenças nos dez cromossomos, mas agrupados em regiões distintas. Por exemplo, os QTLs para resistência às doenças: cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*), vírus da listra do milho (etiologia desconhecida) e podridão por Erwinia (*Erwinia stewartii*) foram mapeados no cromossomo 1, nos bins 1.04, 1.04, 1.05,

respectivamente. Isso sugere que compostos fitoquímicos que desencadeiam resistência a diferentes patógenos podem ser produzidos pelos mesmos QTLs. Segundo McMullen e Simcox (1995), é possível que existam diversos QTLs que conferem resistência/susceptibilidade a diversas doenças, simultaneamente, mas é provável também a existência de QTLs específicos para cada patossistema.

O milho é considerado uma espécie modelo para o desenvolvimento, seleção e avaliação de marcadores moleculares. De acordo com McMullen e Sincox (1995a), os cromossomos de milho estão subdivididos em "bins", ou seja, regiões de cerca de 20 cM delimitadas por marcadores RFLPs de posição conhecida. A posição do QTL/QRL é dada por uma combinação numérica da sua localização, onde o primeiro número se refere ao grupo de ligação e o segundo, à posição relativa do "bin" dentro do grupo de ligação. Neste sentido, é possível comparar nos respectivos bins de uma espécie, quais QTLs/QRLs estão presentes bem como inferir sobre possíveis eventos evolutivos ocorridos durante a clusterizacão de genes de resistência.

Como um bin corresponde a aproximadamente 20 cM (MCMULLEN; SINCOX; 1995) e os microssatélite tem localização conhecida nos grupos de ligação, é possível posicionar os QRLs em relação aos bins. A presença de QRLs de várias doenças em milho já mapeados nos 10 grupos de ligação possibilita estabelecer possíveis relações com os QRLs à antracnose do colmo mapeados no presente trabalho. Desta forma, a posição do QRL identificado no intervalo entre os marcadores E15426-E55119, no cromossomo 1, pode ser inferida tomando a posição deste intervalo em relação ao marcador Phi001, localizado no bin 1.03. Essa distância está entre 14,0 e 21,8 cM, o que representa aproximadamente 1 bin. Assim é possível que o QRL esteja localizado próximo ao bin 1.02 ou do bin 1.04, dependendo da posição em relação ao ponto de referência Phi001. Nestas regiões foram mapeados QRLs ao vírus de listra do milho ("Maize streak virus" - MSV) (KIETERE et al.,1995) e a mancha por *Helminthosporium turcicum* (OGLIARI, 1999).

A posição do QRL identificado no intervalo entre os marcadores E51106-E51163, no cromossomo 1, pode ser inferida tomando a posição deste intervalo em relação ao marcador Phi001, localizado no bin 1.03. Essa distância está entre 58,2 e 73,7 cM, o que representa aproximadamente 3 a 4 bins. É provável que este QRL esteja localizado próximo aos bins 1.06 e 1.07, onde foram identificados QRLs a *Cochliobolus carbonum* (COE et al., 1998), *Cercospora* (LEHMENSIEK et al., 2001) e a *Giberella* (PÈ et al.,1993). Neste mesmo cromossomo, outro QRL à antracnose do colmo foi

mapeado no intervalo entre os marcadores E54168-E12269, seguindo o mesmo raciocínio este QRL encontra-se entre 91,9 e 98,4 cM, o que representaria aproximadamente os bin 1.07 ou 1.08. Particularmente, esta região tem grande importância, pois Pè et al. (1993) mapearam QRLs a podridão do colmo ocasionada por *Giberella*.

A posição do QRL identificado no cromossomo 2, no intervalo entre os marcadores E35163-E21369, pode ser inferida tomando a posição deste intervalo em relação ao marcador Bnlg125, localizado no bin 2.02. Essa distância está entre 39,4 e 42,1 cM, o que representa aproximadamente 2 bins. É possível que este QRL esteja localizado próximo aos bins 2.00 ou 2.04, regiões genômicas que já foram mapeados QRLs a *Cercospora* (LEHMENSIEK et al., 2001). Da mesma foram, o intervalo E54116-E54240 em questão está entre 61,7 a 65,0 cM, que equivale a aproximadamente 3 bins. Sendo assim, é possível que este QRL esteja localizado próximo ao bin 2.05, região onde também foram mapeados QRLs a *Cercospora* (LEHMENSIEK et al., 2001).

No cromossomo 3 para inferir a posição aproximada do QRL localizado no intervalo entre os marcadores E3594-E2286, foi tomada a posição deste intervalo em relação ao marcador Bnlg1325 (bin 3.02). Essa distância está entre 73,0 e 83,4 cM, o que representa aproximadamente 4 bins. Assim este QRL possivelmente esteja localizado no bin 3.06, onde Pè et al. (1993) mapearam QRLs para a podridão do colmo Para o QRL localizado entre os marcadores E21608-E55198 (cromossomo 4), foi tomada a posição deste intervalo em relação ao marcador Bnlg2291, localizado no bin 4.06. A distância do intervalo está entre 110,0 e 116,4 cM, o que representa aproximadamente 5 a 6 bins. Portanto, o QRL estaria localizado próximo aos bins 4.11 e 4.12 ou do bin 4.01. No bin 4.01 foram mapeados QRLs à podridão do colmo por *Giberella* (PÈ et al., 1993) e o bin 4.08 um QRL específico para à antracnose do colmo ocasionada por *Colletotrichum graminicola* (JUNG et al. 1994). Possivelmente este QRL seja o mesmo encontrado por Jung et al., (1994) em função dos elevados coeficientes de regressão (75,4 a 82,7%) encontrados para este QRL mapeado. O QRL localizado no cromossomo 4, possivelmente localizado próximo aos bins 4.04 ou 4.08 apresenta correspondência com QRLs mapeados para Cercosporiose (LEHMENSIEK et al., 2001) e para a antracnose do colmo (JUNG et al., 1994).

A posição do QRL identificado no intervalo entre os marcadores E21466-E31715 (distância 18,5 a 35,7 cM) em relação ao marcador microssatélite Phi034 no bin

7.02, indica que o intervalo esta próximo dos bins 7.00/7.01 ou 7.03/7.04. No bin 7.03 foi mapeado QRL para a mancha de *Helminthosporium turcicum* (OGLIARI, 1999). No cromossomo 8, par o QRL localizado no intervalo E54127-E21529 (32,2 a 57,2 cM) considerou-se a distância desse intervalos em relação ao marcador Bnlg1176 (bin 8.05), equivalendo a aproximadamente 2 a 3 bins. Assim, o QRL estaria localizado ao redor dos bins 8.02/8.04 ou 8.06/8.08. No bins 8.04/8.06 Ogliari (1999) mapeou QRLs para a mancha de *Helminthosporium turcicum*.

Para o QRL localizado entre os marcadores E3586-E14268, no cromossomo 9, considerou-se o marcador Umc2084 (bin 9.01) como referência. A distância deste intervalo corresponde a 96,4 a 102,4 cM, o que representa 4 a 5 bins. Desta forma, o QRL poderia estar localizado próximo aos bins 9.05/9.06, região genômica onde Ogliari (1999) mapeou QRLs a *Helminthosporium turcicum*.

Embora o intervalo médio de um bin seja de aproximadamente 20 cM (MCMULLEN; SINCOX, 1995 a), é sabido que seu tamanho pode variar de acordo com a população de trabalho. Assim, a posição dos QRLs mapeados com base na distância aos locos microssatélites de bins conhecidos no genoma do milho é relativa. Mesmo assim, essa localização é importante, pois é possível saturar estas regiões de interesse com outros locos SSRs, reduzindo as distâncias em relação ao QRL e possibilitando estimativas mais precisas com relação ao efeito fenotípico do QRL em questão, aumentando as chances de utilizar esta região genômica em esquemas de seleção assistida (LOPES, 2003).

Para implementar um programa de seleção assistida por marcadores moleculares deve-se dispor de marcadores fortemente associados com QTLs/QRLs de interesse, efeito pronunciado na expressão fenotípica e principalmente estáveis para os ambientes e épocas de avaliação. Neste trabalho, o QRL localizado no intervalo E21608-E55198 (cromossomo 4) poderia ser um candidato para programas de seleção assistida por marcadores, uma vez que sua expressão foi coincidente em dois ambientes de avaliação e na análise conjunta. Além da grande contribuição desta região para a variação fenotípica em resistência à antracnose do colmo. Possivelmente o QRL mapeado no cromossomo 1, no intervalo E22333-E55534 (116,9 a 132,5 cM), represente o QRL mais estável daqueles identificados neste trabalho, pois esteve presente nos três ambientes de avaliação/análise conjunta e para as três formas de quantificação da doença (CINT, CEXT e INT), qualificando-o como o principal QRL para utilização em programas de seleção assistida. Adicionalmente, os QRLs mapeados no cromossomo 2,

nos intervalos E35163-E21369 e E21307-E42207, também apresentariam potencial para a seleção assistida em função da estabilidade para os ambientes de avaliação e as diferentes formas de quantificação da doença na população de mapeamento.

Este trabalho destaca-se por ser o primeiro a mapear QRLs à antracnose do colmo nos 10 cromossomos de milho. Adicionalmente não tinham sido mapeados QRLs para esta doença nos cromossomos 2, 3 e 10. Estes resultados alcançados com o mapeamento de alelos de resistência à antracnose do colmo são de extrema importância científica para o conhecimento da base genética da resistência de milho de origem tropical para a antracnose do colmo ocasionada pela infecção por *C. graminicola*, uma vez que grande parte dos genes de resistência mapeados neste patossistema correspondem a regiões genômicas de germoplasma de milho temperado.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro para a realização do presente trabalho.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da Dissertação em um único tópico.

TABELA 5 − Distribuição dos locos microssatélites polimórficos e monomórficos entre as linhagens parentais L04-2 e L99-4, bem como o número de locos com segregação esperada nos grupos de ligação do mapa consenso de milho. Ponta Grossa, 2014.

Loco SSR	**Grupos de Ligação**											
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**Total**	**%**
Polimórficos	5	2	3	4	4	3	3	7	1	2	34	43
Monomórficos	2	3	7	7	5	7	2	4	4	4	45	57
Segregação Esperada	2	0	1	2	3	0	1	3	1	0	13	38,2
Total	7	5	10	11	9	10	5	11	5	6	79	100

TABELA 6 − Locos SSR polimórficos genotipados em 121 indivíduos da população de mapeamento L04-2 x L99-4. Ponta Grossa, 2014.

SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin
Bnlg149 *	1,00	Umc1136	3,10	Phi126	6,00	Bnlg240 *	8,06
Bnlg1007	1,02	Bnlg2291 *	4,06	Bnlg249a	6,01	Bnlg1031	8,06
Phi001	1,03	Bnlg1621	4,06	p-nc013	6,05	Umc2014	8,07
Bnlg615 *	1,07	Bnlg1937	4,06	Phi034	7,02	Phi015	8,08
Bnlg131	1,11	Bnlg1337 *	4,11	Bnlg434 *	7,03	Umc2084 *	9,01
Bnlg125	2,02	Umc2036 *	5,01	Umc1799	7,06	Umc1319	10.01
Phi101049	2,10	Bnlg557 *	5,03	Bnlg2046 *	8,04	Umc2021	10.07
Bnlg1325	3,02	Umc1056	5,03	Bnlg1176 *	8,05		
Bnlg197 *	3,06	Umc1348 *	5,05	Umc1460	8,05		

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

TABELA 7 − Número total de fragmentos amplificados (monomórfico e polimórfico) e porcentagem de polimorfismo para 12 combinações de *primers EcoR*I + *Mse*I testados nas linhagens parentais L04-2 e L99-4. Ponta Grossa, 2014.

N°	**Código *Primer***	**Combinação *EcoRI* + *MseI***	**N° fragmentos**	**Monomórfico**	**Polimórfico**	**% Polimorfismo**
1	E11	E-AGT/M-CAC	51	30	21	41,2
2	E12	E-AGC/M-CCA	52	23	29	55,8
3	E14	E-AGT/M-CTC	58	31	27	46,6
4	E15	E-AGT/M-CAT	48	18	30	62,5
5	E21	E-ATC/M-CAC	51	26	25	49,0
6	E22	E-ATC/M-CCA	69	18	51	73,9
7	E31	E-AGC/M-CAC	53	15	38	71,7
8	E35	E-AGC/M-CAT	57	18	39	68,4
9	E42	E-ACA/M-CCA	63	13	50	79,4
10	E51	E-AAC/M-CAC	61	13	48	78,7
11	E54	E-AAC/M-CTC	64	27	37	57,8
12	E55	E-AAC/M-CAT	68	38	30	44,1
Total			695	270	425	61,2

TABELA 8 − Combinações de *primers EcoR*I + *Mse*I selecionadas a partir da presença de polimorfismo entre os bulks de DNA pela estratégia do BSA. Ponta Grossa, 2014.

Combinação de primers *EcoRI + Mse*I	**Fragmento/ Marcador**	**Polimorfismo do Bulk**	**Experimentos**
E11= E-AGT/M-CAC	E11403	Resistência – BR	1, 2 e 3
	E1199	Suscetibilidade – BS	1, 2 e 3
	E1198	Suscetibilidade – BS	1, 2 e 3
E12 = E-AGT/M-CCA	E12668	Resistência – BR	2 e 3
	E12641	Suscetibilidade – BS	2 e 3
E14 = E-AGT/M-CTC	E14268	Resistência – BR	2 e 3
	E14152	Suscetibilidade – BS	1
E15= E-AGT/M-CAT	E15295	Resistência – BR	1, 2 e 3
	E15133	Suscetibilidade – BS	1
E21 = E-ATC/M-CAC	E21242	Resistência – BR	1, 2 e 3
E22 = E-ATC/M-CCA	E22208	Resistência – BR	1, 2 e 3
E31 = E-AGC/M-CAC	E31843	Resistência – BR	1
	E31192	Resistência – BR	1, 2 e 3
	E31142	Resistência – BR	1
	E31122	Resistência – BR	2 e 3
E35 = E-AGC/M-CAT	E35455	Resistência – BR	1
	E35312	Resistência – BR	1
	E35269	Resistência – BR	1, 2 e 3
E42 = E-ACA/M-CCA	E42234	Resistência – BR	1, 2 e 3
	E42207	Resistência – BR	1, 2 e 3
E51 = E-AAC/M-CAC	E51124	Resistência – BR	1
E54 = E-AAC/M-CTC	E54451	Resistência – BR	2 e 3
E55 = E-AAC/M-CAT	E55280	Resistência – BR	1

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

TABELA 9 − Resultados da análise de ligação dos marcadores SSR 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.

Cromossomos	**Agrupadas**	**Ordenadas**	**Comprimento (cM)**	**DM (cM)**
1	32	24	164,2	6,8
2	33	30	102,2	3,4
3	35	32	97,1	3,0
4	28	26	116,4	4,5
5	32	27	158,4	5,8
6	28	20	145,4	7,2
7	23	20	111,4	5,6
8	37	34	163,4	4,8
9	29	25	132,8	5,3
10	27	23	111,4	4,8
Não Agrupadas	11	-	-	-
Não Ordenadas	-	43	-	-
Total	315	261	1302,7	5,1

TABELA 10 – Resumo das análises de regressão linear múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo no primeiro experimento, utilizando o processo "Stepwise" para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F*	R^2 Parcial	Cromossomo	Origem do Marcador AFLP	Fase de Ligação[1]
Comprimento interno de lesão – CINT						
E55534	- 21,23459	16,29 **	0,2843	1	PS	R
E51342	-27,00858	5,58 *	0,0503	5	PR	A
E2279	-9,88624	7,47 **	0,0571	1	PR	A
E31843	- 12,16573	6,29 *	0,0418	7	PR	A
E3194	-7,73405	7,32 *	0,0346	5	PR	A
E12168	-4,96173	9,88 **	0,0366	9	PR	A
E54329	-2,87823	11,77 **	0,0225	2	PS	R
R^2 do modelo = 0,5272						
Comprimento externo de lesão – CEXT						
E55534	- 11,08028	15,70 **	0,2770	1	PS	R
E55112	- 28,79210	6,68 *	0,1035	5	PR	A
E54179	- 20,66276	7,11 *	0,0956	5	PR	A
E5172	- 23,78818	9,71 **	0,1066	6	PR	A
E1285	- 10,31038	8,20 **	0,0338	5	PR	A
E51286	-8,04192	13,06 **	0,0324	10	PS	R
E11137	-5,25038	8,13 **	0,0164	6	PR	A
E51110	-2,34889	15,58 **	0,0212	2	PR	A
E22294	- 16,11221	11,35 **	0,0114	1	PR	A
R^2 do modelo = 0,6979						
Número de internódios descoloridos – INT						
E55534	- 0,77970	15,51 **	0,2745	1	PS	R
E5172	-3,70040	6,44 *	0,1006	6	PR	A
E55112	- 1,70471	7,19 *	0,0973	5	PR	A
E54179	-1,33428	7,39 **	0,0739	5	PR	A
E3129058	-0,78152	8,90 **	0,0621	6	PR	A
E22131	- 0,45960	6,48 *	0,0391	1	PS	R
E5499	-0,30008	7,36 *	0,0173	5	PS	R
E51200	- 0,58921	8,38 **	0,0112	1	PR	A
E5182	- 0,20101	10,22 **	0,0101	2	PS	R
R^2 do modelo = 0,6861						

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

TABELA 11 – Resumo das análises de regressão linear múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo no segundo experimento, utilizando o processo "Stepwise" para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F*	R^2 Parcial	Cromossomo	Origem do Marcador AFLP	Fase de Ligação[1]
Comprimento interno de lesão – CINT						
E14184	30,72003	12,26**	0,2302	-	PS	A
E1271	28,36048	12,41**	0,1823	-	PS	A
E5172	-34,70433	13,59 **	0,1518	6	PR	A
E51120	-12,87949	7,51 **	0,0719	5	PS	R
E54451	-43,31985	6,04 *	0,0405	9	PR	A
E12260	-28,70203	7,61 **	0,0368	1	PR	A
E22333	- 19,75676	8,82 **	0,0347	1	PR	A
E51342	-23,04883	5,16 *	0,0133	5	PR	A
R^2 do modelo = 0,7615						
Comprimento externo de lesão – CEXT						
E54127	48,89095	11,79**	0,2233	8	PR	R
E4264	-69,29609	10,02 **	0,1556	5	PR	A
Phi015	-14,53025	10,76 **	0,1343	8	-	A
E11156	-36,94230	12,70 **	0,1219	1	PR	A
E42114	-25,38707	11,48 **	0,0690	9	PS	R
E42125	-21,47291	7,49 *	0,0144	5	PR	A
R^2 do modelo = 0,7185						
Número de internódios descoloridos – INT						
E14184	2,71861	18,00**	0,3051	-	PS	A
E1469	1,18945	15,84**	0,1971	-	PR	R
Umc1056	1,54060	14,48**	0,1348	5	-	R
E42331	-0,65948	7,91 **	0,0509	3	PS	R
E35242	-2,30426	6,10 *	0,0345	5	PR	A
E51110	-1,61986	16,97 **	0,0630	2	PR	A
E3580	-0,56464	6,43 *	0,0206	3	PS	R
E4264	- 0,57102	7,67 **	0,0206	5	PR	A
E51458	-2,07228	6,62 *	0,0152	5	PR	A
E42426	-0,74686	8,64 **	0,0160	8	PR	A
R^2 do modelo = 0,8578						

*,** significativo a Pr < 0,05 e Pr < 0,01, respectivamente. [1] Fase de ligação entre 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 múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo no terceiro experimento, utilizando o processo "Stepwise" para a seleção dos marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F*	R^2 Parcial	Cromossomo	Origem do Marcador AFLP	Fase de Ligação[1]
Comprimento interno de lesão – CINT						
E1279	34,33435	16,49**	0,2868	5	PR	R
E35258	14,53839	12,14**	0,1174	-	PR	R
E35242	-35,55311	7,77 **	0,1160	5	PR	A
E51228	-23,19974	8,29 **	0,0672	1	PS	R
E12367	-65,37848	14,97 **	0,0707	1	PR	A
E51120	-21,16714	11,18 **	0,0241	5	PS	R
R^2 do modelo = 0,6822						
Comprimento externo de lesão – CEXT						
E1279	29,76936	17,11	0,2944	5	PR	R
E35242	-38,11599	8,27 **	0,1209	5	PR	A
E31214	-76,50324	8,16 **	0,0663	5	PS	R
E51120	-19,22701	11,33 **	0,0720	5	PS	R
E51228	-19,09.386	17,61 **	0,0405	1	PS	R
E22294	-27,91174	11,74 **	0,0204	1	PR	A
R^2 do modelo = 0,6145						
Número de internódios descoloridos – INT						
E15204	1,56779	16,40**	0,2857	3	PR	R
E1469	1,27254	11,60**	0,1606	-	PR	R
E54210	2,08068	15,58**	0,1581	8	PS	A
E11156	-2,08068	12,57 **	0,0983	1	PR	A
E1470	-1,06295	12,96 **	0,0488	2	PR	A
E54168	-0,61894	11,54 **	0,0334	1	PS	R
E15426	-0,76637	9,10 **	0,0163	1	PR	A
R^2 do modelo = 0,8012						

*,** significativo a Pr < 0,05 e Pr < 0,01, respectivamente. [1] Fase de ligação entre 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 múltiplas para os alelos associados à QRLs à antracnose do colmo na análise conjunta, utilizando o processo "Stepwise" para a seleção de marcadores. Ponta Grossa, 2014.

Marcadores	Estimativa dos Parâmetros	F*	R^2 Parcial	Cromossomo	Origem do Marcador AFLP	Fase de Ligação[1]
Comprimento interno de lesão – CINT						
E1279	24,53567	12,72**	0,2367	5	PR	R
E35242	-23,71184	9,00 **	0,1402	5	PR	A
E21608	23,14439	9,96**	0,1268	4	PR	R
E5172	-29,00835	6,42 *	0,0446	6	PR	A
E55187	- 17,31582	9,68 **	0,0411	7	PS	R
E51342	- 29,03257	17,38 **	0,0488	5	PR	A
E31490	- 10,28196	8,46 **	0,0191	10	PR	A
E11403	- 15,66985	8,46 **	0,0102	1	PR	A
R^2 do modelo = 0,6675						
Comprimento externo de lesão – CEXT						
E1279	11,54169	12,70**	0,2365	5	PR	R
E35242	-31,50075	9,16 **	0,1423	5	PR	A
E12367	-41,94045	8,14 **	0,0882	1	PR	A
E51120	-26,04772	10,60 **	0,0918	5	PS	R
E22294	-33,79997	7,03 *	0,0296	1	PR	A
E15295	-13,94131	8,96 **	0,0304	6	PR	A
E4264	-28,76010	11,68 **	0,0297	5	PR	A
Bnlg125	-4,94273	11,46 **	0,0218	2	-	A
E3112149	-6,59878	10,82 **	0,0155	1	PR	A
R^2 do modelo = 0,6858						
Número de internódios descoloridos – INT						
E1469	0,75796	16,08**	0,2817	-	PR	R
E14184	1,81456	7,97**	0,2227	-	PS	A
E54210	0,86373	10,34**	0,1038	8	PS	A
E51116	-0,48605	5,68 *	0,0385	9	PR	A
E54172	-1,11138	6,00 *	0,0357	5	PR	A
E5172	-1,80387	9,39 **	0,0363	6	PR	A
E15295	-0,49695	10,05 **	0,0305	6	PR	A
E42116	- 0,61362	12,21 **	0,0274	10	PR	A
E4283	- 0,60293	10,31 **	0,0178	5	PR	A
R^2 do modelo = 0,7944						

*,** significativo a Pr < 0,05 e Pr < 0,01, respectivamente. [1] Fase de ligação entre 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 do colmo para comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT). Ponta Grossa, 2014.

Combinação de primers *EcoRI* + *Mse*I	**CINT**	**CEXT**	**INT**	**TOTAL**
E11= E-AGT/M-CAC	1	2	1	4
E12 = E-AGT/M-CCA	5	3	0	8
E14 = E-AGT/M-CTC	1	0	3	4
E15= E-AGT/M-CAT	0	1	3	4
E21 = E-ATC/M-CAC	1	0	0	4
E22 = E-ATC/M-CCA	2	1	1	4
E31 = E-AGC/M-CAC	3	2	1	6
E35 = E-AGC/M-CAT	2	1	2	5
E42 = E-ACA/M-CCA	0	3	5	8
E51 = E-AAC/M-CAC	5	5	6	16
E54 = E-AAC/M-CTC	2	2	6	10
E55 = E-AAC/M-CAT	2	2	2	6
TOTAL	24	22	30	76

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

(continua)

GL	Intervalo Marcadores			1° Experimento			2° Experimento			3° Experimento			Conjunta		
				CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT
1	E15426	E55119	LOD	9,6	10,7	7,3									
	14,0	21,8	Pos	15,1	15,1	15,1									
			R^2	53,2	55,4	48,6									
			a	16,2	17,4	1,3									
			d	- 18,9	- 20,1	- 1,6									
1	E51106	E51163	LOD	4,3		3,0									
	58,2	73,7	Pos	70,0		69,9									
			R^2	60,3		35,9									
			a	- 0,7		- 0,07									
			d	25,8		1,4									
1	E54168	E12260	LOD	10,6	11,6	9,1			7,8						
	91,9	98,4	Pos	97,2	97,2	97,2			95,3						
			R^2	51,2	55,3	46,6			82,2						
			a	18,4	19,3	1,5			- 0,05						
			d	- 15,8	- 16,8	- 1,3			3,3						
1	E22333	E55534	LOD	13,5	14,3	11,3	3,5	3,8	14,4	4,2	3,9	12,9	3,3	3,5	8,3
	116,9	132,5	Pos	120,8	120,1	119,3	126,7	128,0	129,2	128,7	128,9	130,1	128,9	128,9	130,6
			R^2	62,3	63,5	58,2	53,7	58,5	82,6	61,9	59,8	81,7	51,7	51,8	74,4
			a	15,5	17,3	1,5	3,5	2,5	0,08	- 1,9	- 1,4	0,1	2,3	2,8	0,1
			d	- 12,1	- 13,0	- 1,3	- 40,9	- 43,5	- 3,3	- 43,5	- 43,9	- 3,4	- 27,6	- 28,4	- 2,2
1	E22131	E51228	LOD						12,8			13,5			8,0
	143,0	164,2	Pos						153,3			153,7			152,5
			R^2						81,8			83,6			74,4
			a						0,07			0,3			0,1
			d						- 3,3			- 3,3			- 2,2
2	E21307	E42207	LOD				3,4	3,6	5,3	3,6	4,0	10,1	3,8	4,0	
	0,0	2,5	Pos				2,1	2,0	1,1	2,1	2,1	1,1	2,0	2,1	
			R^2				16,9	17,7	78,2	19,0	20,6	79,3	18,6	19,4	
			a				- 12,2	- 12,7	- 0,1	- 13,3	- 15,5	- 0,1	- 9,1	- 9,9	
			d				- 13,8	- 14,2	- 3,1	- 13,3	- 13,8	- 3,4	- 9,9	- 10,1	

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

(continuação)

GL	Intervalo Marcadores			1° Experimento			2° Experimento			3° Experimento			Conjunta		
				CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT
2	E35163	E21369	LOD	7,0	7,8	4,7	2,8	2,8	3,2						2,9
	39,4	42,1	Pos	40,0	39,9	39,4	40,0	39,9	41,0						41,1
			R^2	65,1	66,4	48,1	41,7	41,3	46,6						44,0
			a	- 1,0	- 0,3	0,06	- 6,9	- 6,5	- 1,2						- 0,9
			d	26,0	27,9	2,8	38,1	38,2	2,5						1,7
2	E54116	E54240	LOD	9,6	9,6	7,4	2,7	2,6	6,3						
	61,7	65,0	Pos	62,1	62,0	62,1	63,0	63,0	64,0						
			R^2	53,0	53,3	49,3	44,4	44,1	80,7						
			a	16,1	16,8	1,3	13,5	13,1	0,1						
			d	- 22,1	- 23,0	- 1,8	- 35,6	- 36,6	- 3,3						
3	E22285	E55418	LOD	8,0	7,5	7,4									
	11,5	20,1	Pos	18,0	18,2	18,0									
			R^2	42,0	42,0	42,3									
			a	20,0	20,8	1,6									
			d	- 17,2	- 17,1	- 1,3									
3	E3594	E2286	LOD	5,2	5,2	3,5									
	73,0	83,4	Pos	74,1	74,2	74,1									
			R^2	36,1	36,3	34,1									
			a	21,5	22,7	1,7									
			d	- 19,0	- 18,9	- 1,5									
4	E55299	E35176	LOD	7,0	7,2	5,4									
	40,8	41,6	Pos	41,0	41,0	41,0									
			R^2	45,7	48,0	44,9									
			a	- 0,1	- 0,06	-0,04									
			d	36,8	38,7	3,0									
4	E21608	E55198	LOD						14,7			13,4			8,6
	110,0	116,4	Pos						114,1			114,1			113,9
			R^2						82,7			81,8			75,4
			a						- 0,02			- 0,1			- 0,1
			d						- 3,3			- 3,5			- 2,3

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

(continuação)

GL	Intervalo Marcadores			1° Experimento			2° Experimento			3° Experimento			Conjunta		
				CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT
5	E51120	E51121	LOD	4,1	3,4	2,7									
	79,3	87,7	Pos	80,1	80,1	80,1									
			R^2	59,7	55,7	43,0									
			a	- 1,4	- 0,6	- 0,06									
			d	26,7	26,2	1,7									
5	E5499	E54172	LOD	6,7	7,9	6,3		2,6	14,5		2,6	14,2			7,8
	128,2	158,4	Pos	147,1	148,1	150,0		139,1	136,9		138,3	136,4			135,5
			R^2	62,2	62,9	50,7		61,3	82,7		58,6	81,4			73,6
			a	13,2	15,2	1,3		7,1	0,07		2,5	0,002			0,03
			d	- 14,1	- 13,9	- 1,2		- 42,1	- 3,3		- 42,7	- 3,5			- 2,3
6	E54229	E15295	LOD									8,2			
	0,0	40,2	Pos									11,7			
			R^2									80,1			
			a									- 1,9			
			d									- 1,4			
6	E1482	E3174	LOD	4,1	4,0	3,1			9,6			8,4			9,1
	43,0	46,4	Pos	45,0	45,0	45,0			44,0			44,1			44,1
			R^2	36,3	35,4	35,6			80,5			79,3			75,8
			a	15,3	16,4	1,2			0,2			0,1			0,2
			d	- 19,3	- 20,3	- 1,7			- 3,3			- 3,5			- 2,3
6	E14413	E15236	LOD						6,8			4,2			3,2
	84,9	110,6	Pos						100,1			100,1			98,1
			R^2						82,5			79,9			53,5
			a						- 0,3			- 0,4			- 0,8
			d						3,3			3,3			1,6
7	E21466	E31715	LOD	7,3	7,5	4,0			6,0			9,1			
	18,5	35,7	Pos	33,1	33,8	34,0			20,0			20,2			
			R^2	64,7	64,3	55,1			78,8			81,2			
			a	0,3	0,05	- 0,006			- 0,02			0,1			
			d	26,2	29,0	2,4			- 3,3			- 3,4			

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

(continuação)

GL	Intervalo Marcador			1° Experimento			2° Experimento			3° Experimento			Conjunta		
				CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT
7	Phi034	E22109	LOD	10,8	10,7	8,0			12,2	2,9	3,3	13,1			6,8
	53,1	62,3	Pos	55,1	56,0	56,0			57,1	56,6	56,5	56,8			57,0
			R^2	59,7	62,5	55,8			81,0	57,4	57,0	82,0			73,5
			a	- 15,1	- 16,1	- 1,3			- 0,03	- 2,8	- 4,2	- 0,4			- 0,01
			a	- 14,5	- 13,5	- 1,2			3,3	40,7	41,2	3,4			2,2
7	E51145	E22468	LOD	8,0	8,1	6,5									
	71,5	83,3	Pos	72,1	72,1	72,1									
			R^2	44,3	45,6	38,6									
			a	18,7	19,7	1,6									
			d	- 20,6	- 20,7	- 1,6									
7	E55401	E14461	LOD	7,5	8,0	5,6									
	98,8	111,4	Pos	101,8	101,1	101,1									
			R^2	56,3	55,3	54,4									
			a	15,6	17,3	1,4									
			d	- 14,6	- 16,7	- 1,1									
8	E54127	E21529	LOD	10,2	11,0				7,1						
	32,2	57,2	Pos	39,0	38,7				50,3						
			R^2	60,5	61,3				81,3						
			a	14,6	16,5				0,08						
			d	- 14,9	- 14,6				- 3,3						
8	E54210	E55111	LOD	3,9	3,0							6,6			
	69,1	85,3	Pos	71,3	72,2							74,4			
			R^2	48,7	54,2							78,9			
			a	15,2	16,6							- 0,3			
			d	- 16,5	- 15,9							3,3			
8	E14106	E4295	LOD	3,2	3,1										
	98,3	104,8	Pos	100,7	100,7										
			R^2	29,5	28,8										
			a	23,2	24,5										
			d	- 21,8	- 22,1										

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

(continuação)

GL	Intervalo Marcadores			1° Experimento			2° Experimento			3° Experimento			Conjunta		
				CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT
8	E42183	E21291	LOD	4,2	4,6	2,6									
	121,0	133,4	Pos	129,0	129,8	128,5									
			R^2	37,7	42,0	38,0									
			a	22,7	23,9	1,7									
			d	- 16,9	- 15,7	- 1,4									
9	E42107	E51268	LOD	10,2	11,4	8,2									
	0,0	33,1	Pos	27,1	26,3	25,6									
			R^2	51,1	55,7	51,4									
			a	17,0	17,2	1,4									
			d	- 18,5	- 19,7	- 1,3									
9	E3586	E14268	LOD						4,4			5,3			
	96,4	102,4	Pos						101,3			101,1			
			R^2						80,0			78,4			
			a						- 0,03			- 0,02			
			d						- 3,3			- 3,5			
10	E21155	E22230	LOD	7,7	7,4	7,1			12,5						7,2
	0,0	19,8	Pos	1,2	0,7	0,9			4,1						5,6
			R^2	50,3	49,8	51,4			82,5						74,6
			a	- 16,4	- 17,2	- 1,3			- 0,08						- 0,1
			d	- 19,6	- 20,1	- 1,7			- 3,3						- 2,4
10	Umc1319	E51119	LOD				2,8	3,0		2,8	2,6		3,0	3,2	
	37,7	51,5	Pos				41,2	40,6		40,3	40,5		40,2	40,4	
			R^2				16,8	16,6		16,6	15,4		16,0	17,3	
			a				15,7	15,1		16,4	14,3		11,4	11,1	
			d				-7,1	- 8,2		- 5,2	- 7,5		- 4,0	- 5,6	
10	E1485	E2284	LOD	7,7	8,1	6,8									
	55,5	61,5	Pos	60,1	60,1	60,0									
			R^2	47,4	48,5	49,8									
			a	18,6	19,5	1,6									
			d	- 15,5	- 17,3	- 1,2									

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

(conclusão)

GL	Intervalo Marcadores			1° Experimento			2° Experimento			3° Experimento			Conjunta		
				CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT	CINT	CEXT	INT
10	E54112	E35132	LOD						4,6			6,1			
	101,6	110,7	Pos						105,9			106,1			
			R^2						79,3			79,2			
			a						0,1			0,05			
			d						- 3,3			- 3,4			

GL: grupo de ligação = cromossomo.
Pos.: posição em centimorgans (Haldane) do QRL a partir do início do grupo de ligação.
LOD: LOD score que sustenta a posição do QRL.
R^2: proporção da variação fenotípica explicada pelo QRL na posição considerando H3 ($a \neq 0$, $d \neq 0$) 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.

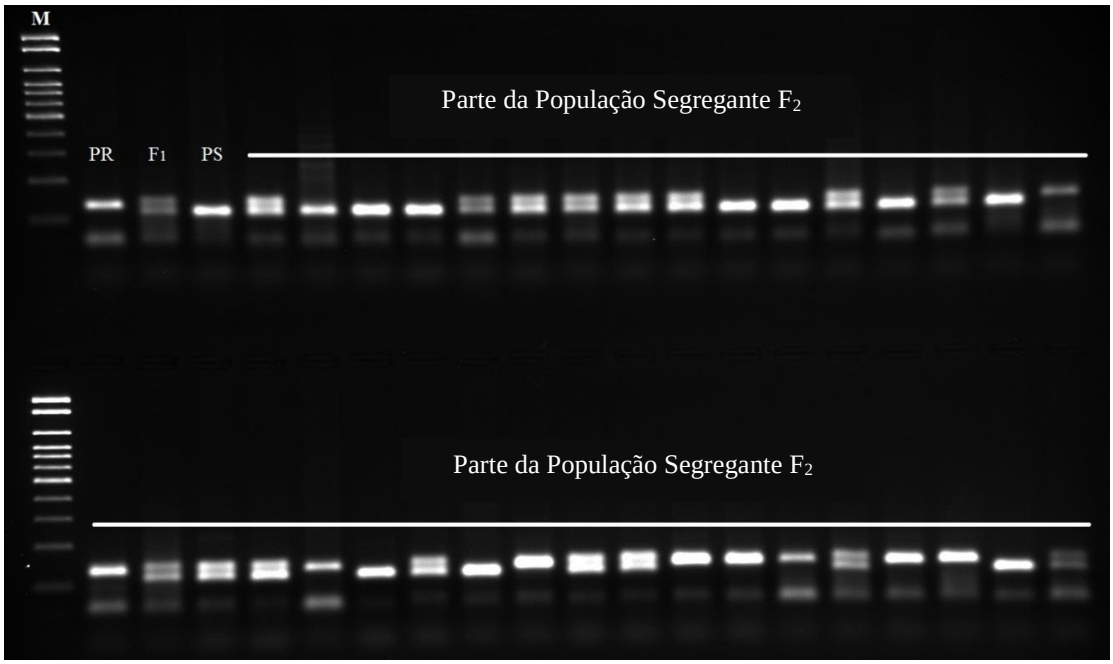

FIGURA 8 − Gel de agarose 3,0%. Visualização da genotipagem de parte dos indivíduos da população segregante F_2 com o *primer* SSR Umc2084. M= marcador de peso molecular 100pb, PR= parental resistente, PS= parental suscetível, F_1= geração filial. Ponta Grossa, 2014.

FIGURA 9 − Padrão de amplificação da combinação de *primers* E31 (E-ACG/M-CAC). 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, F_1= geração filial e PS= parental suscetível. Ponta Grossa, 2014.

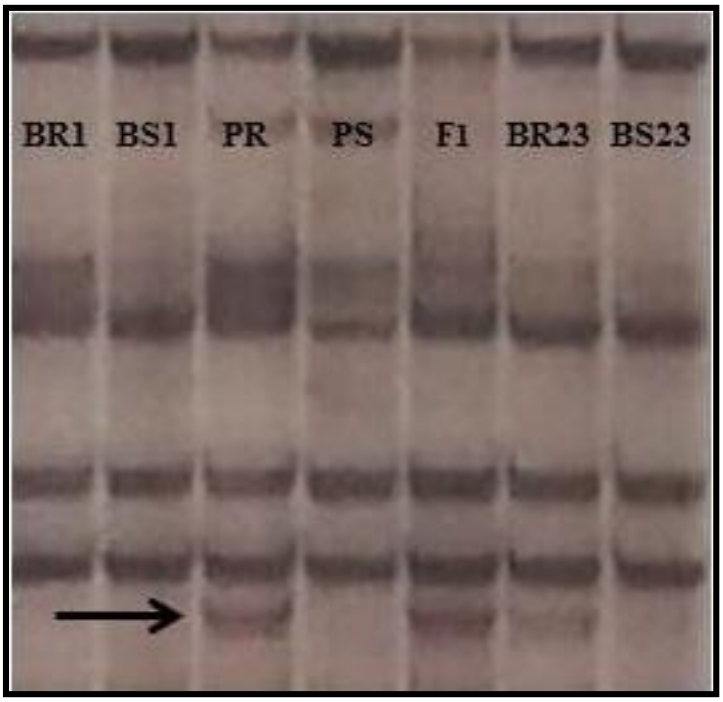

FIGURA 10 − Visualização de parte de um gel de poliacrilamida (6%) para a combinação de *primers* *Eco*RI + *Mse*I (E14= E-AGT/M-CTC). A seta indica o fragmento AFLP E14268 (268pb) possivelmente associado a QRL pela metodologia BSA. BR1/BS1= bulks de DNA (resistente e suscetível) do primeiro experimento, PR= parental resistente, PS= parental suscetível, F_1= geração filial e BR23/BS23= bulks de DNA (resistente e suscetível) do segundo/terceiro experimento. Ponta Grossa, 2014.

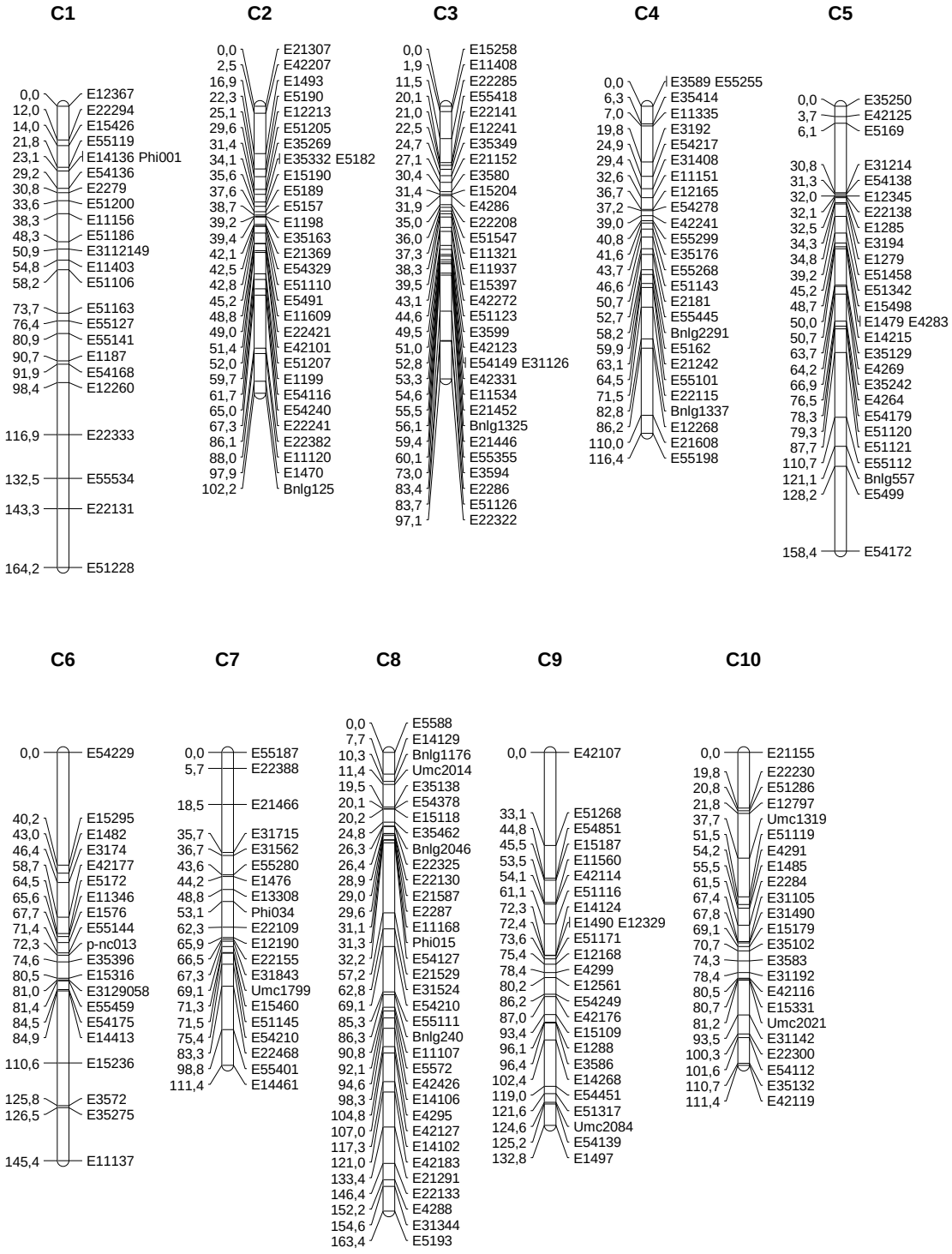

FIGURA 11 − Mapa genético gerado pelos marcadores SSRs e AFLPs. À direita estão os locos marcadores (SSR e/ou AFLP) e a esquerda as distâncias em cM obtidos pela função de mapeamento de Haldane. Ponta grossa, 2014.

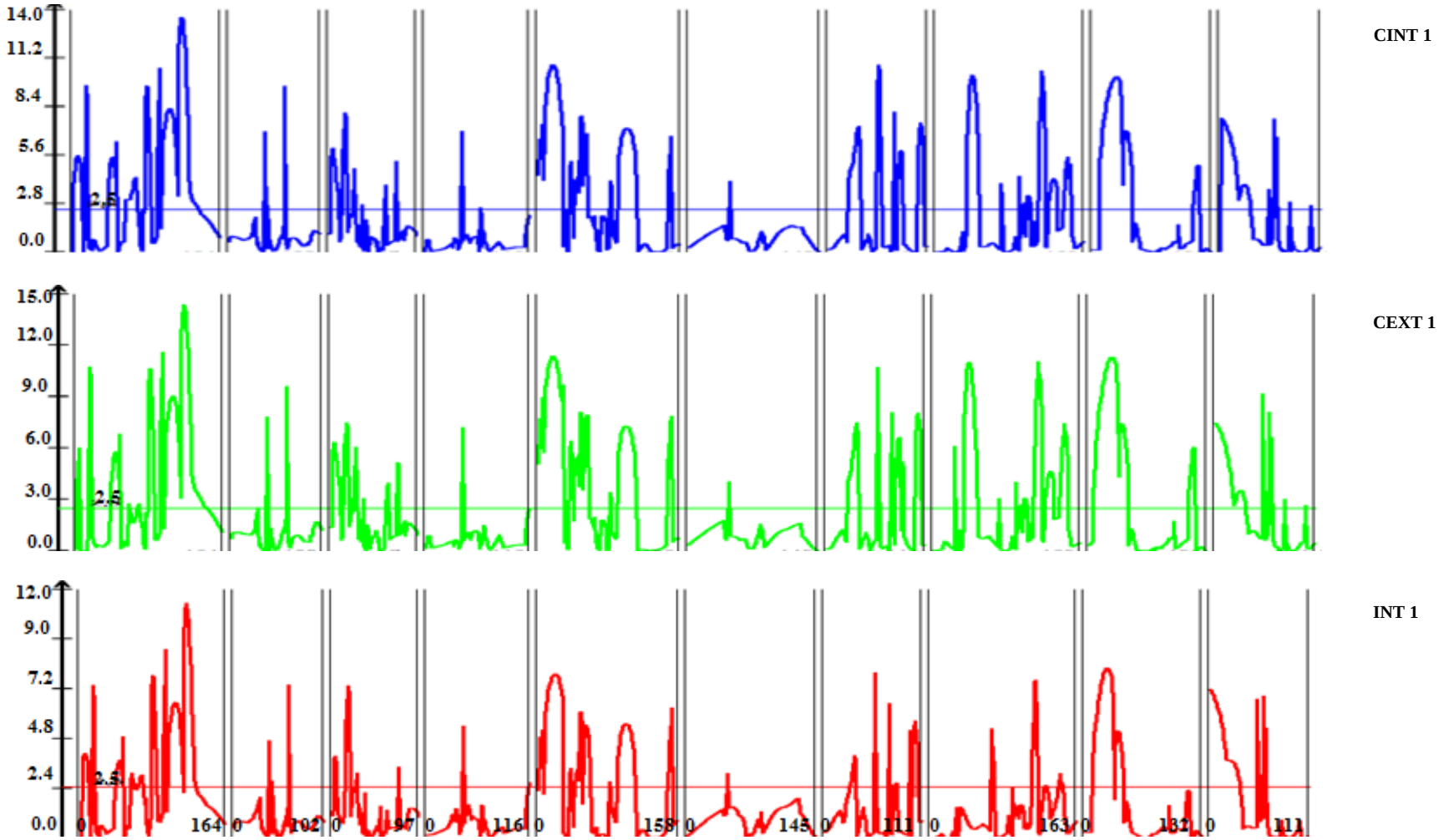

Figura 12 - Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) no primeiro experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

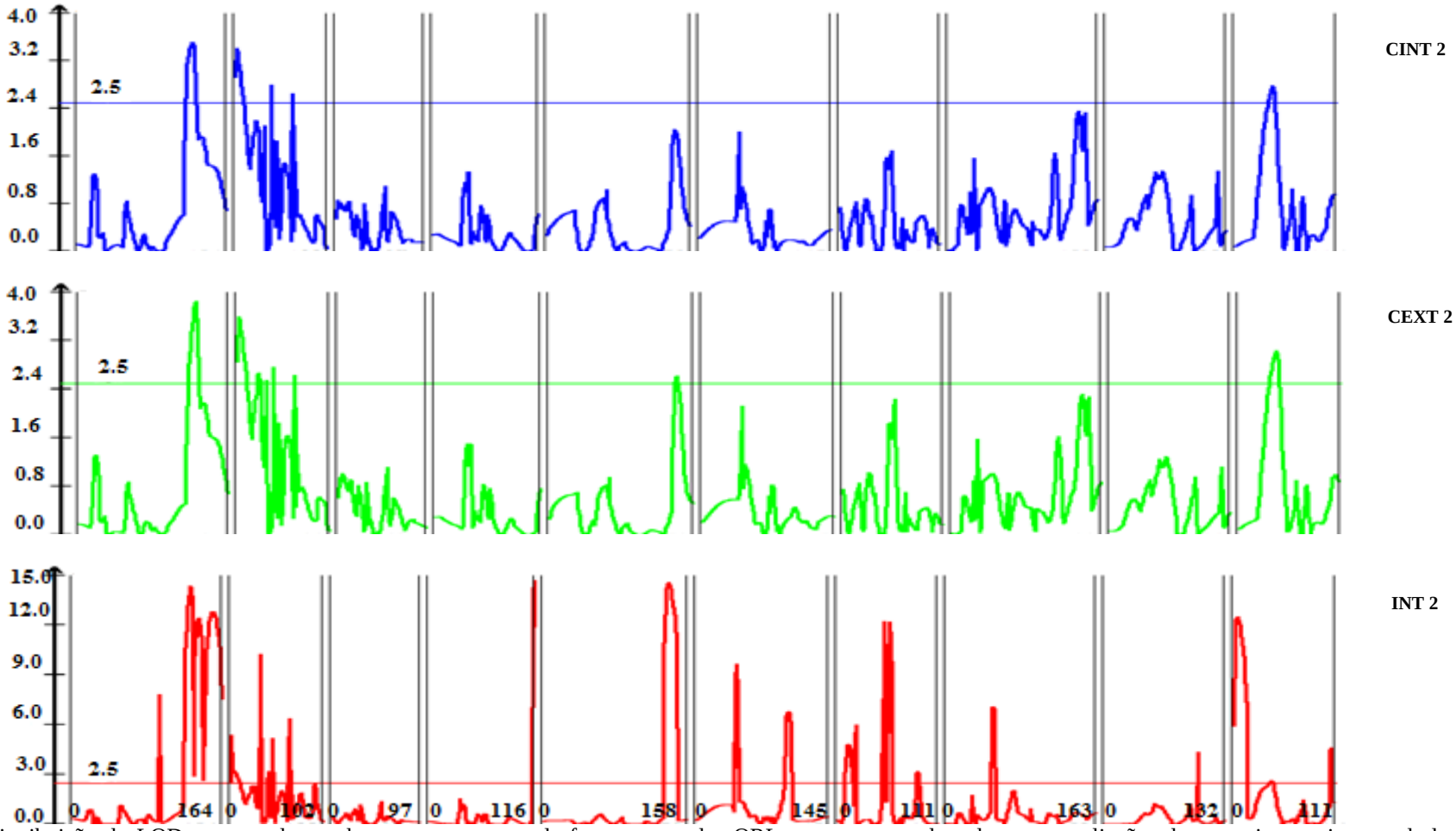

Figura 13 - Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) no segundo experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

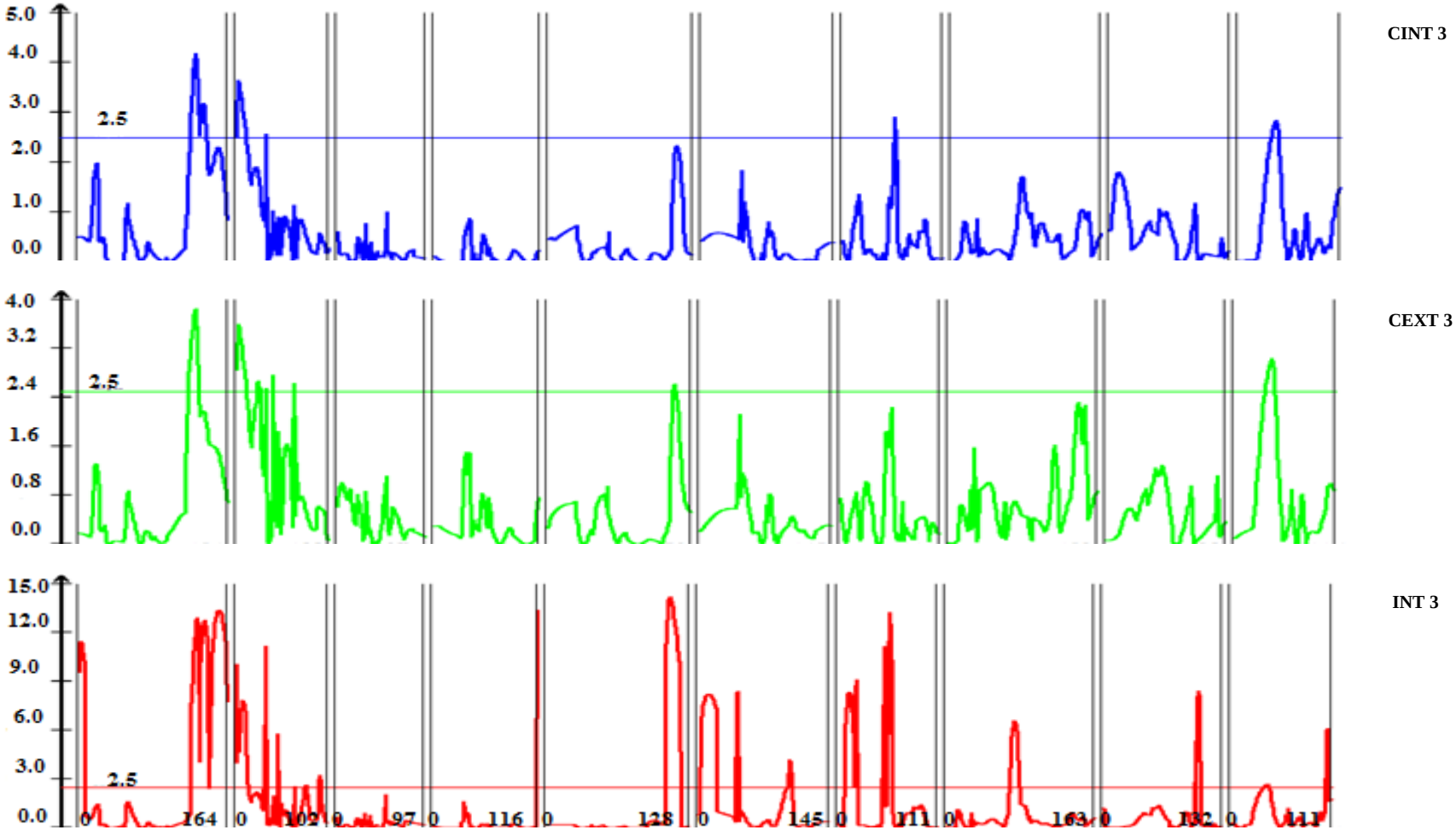

Figura 14 - Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) no terceiro experimento. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

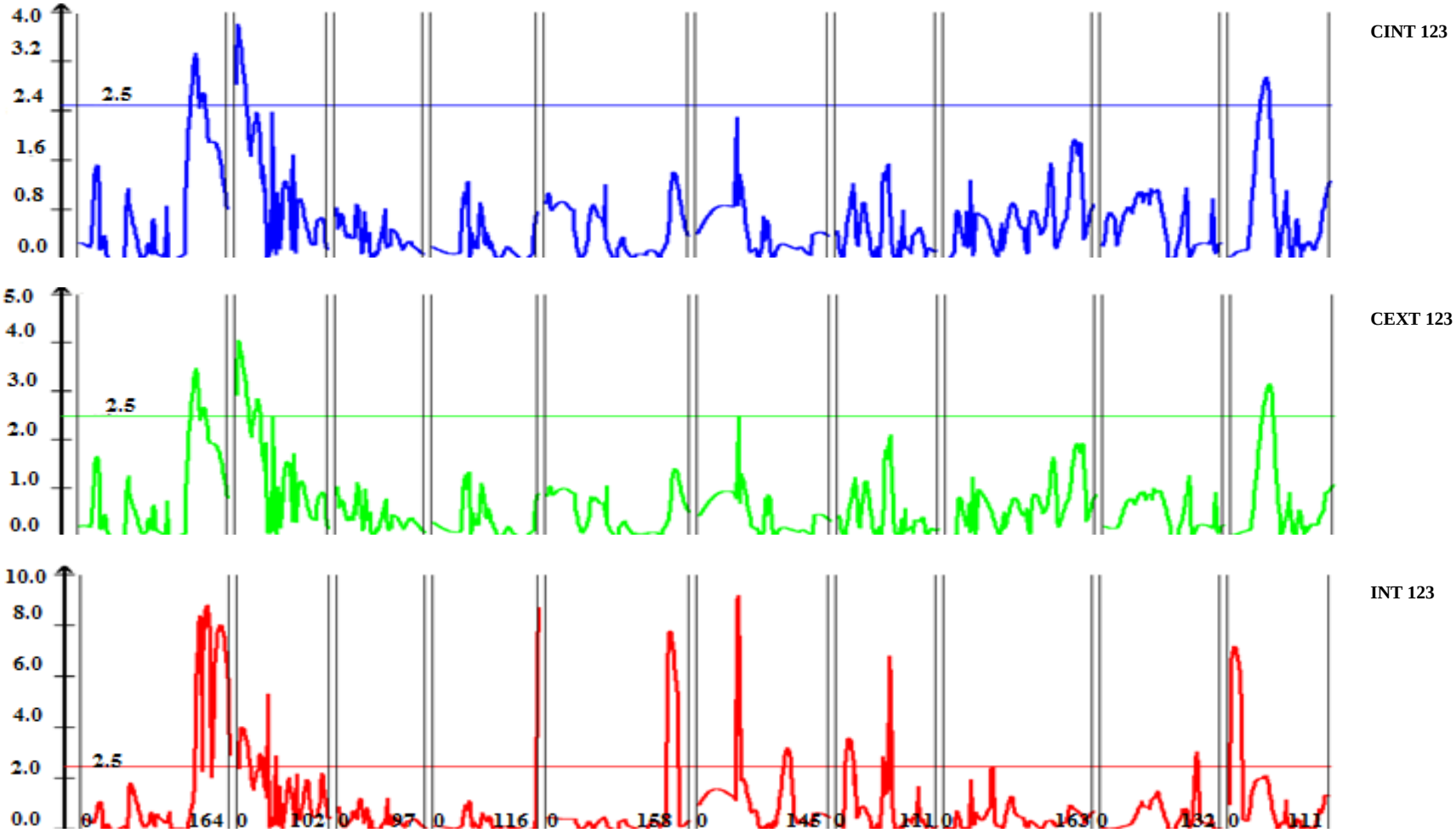

Figura 15 - Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QRLs a antracnose do colmo nas avaliações do comprimento interno de lesão (CINT), comprimento externo de lesão (CEXT) e número de internódios descoloridos (INT) na análise conjunta dos experimentos. No eixo das ordenadas é representado o grupo de ligação e no eixo das abcissas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2014.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados experimentais evidenciaram existência de grande variabilidade genética entre as progênies $F_{2:3}$ de milho para resistência/suscetibilidade à *C. graminicola*.

As formas de avaliação da antracnose do colmo em milho (comprimento externo e interno de lesão, e o número de internódios descoloridos), foram igualmente eficientes em discriminar indivíduos resistentes dos suscetíveis.

Os elevados coeficientes de herdabilidade no sentido amplo confirmaram a grande contribuição da variância genética para resistência, o que pode assegurar ganhos genéticos com a seleção artificial neste patossistema.

Os marcadores moleculares microssatélites e AFLPs permitiram a partir das análises de regressão linear múltipla identificar regiões genômicas fortemente associadas à QRLs à antracnose do colmo.

O marcador AFLP E55534 explicou individualmente a maior proporção da variação fenotípica para o comprimento interno (- 28,43%), comprimento externo de lesão (- 27,70%) e para o número de internódios descoloridos (- 27,45%) nas progênies $F_{2:3}$ da população de mapeamento.

Foram mapeados 31 QRLs à antracnose do colmo em diferentes regiões genômicas dos 10 cromossomos de milho. Neste trabalho a fonte L04-2 contribuiu com 13 alelos e a L99-4 com 18 alelos de resistência a doença.

A maioria dos QRLs mapeados foram dependentes do ambiente de avaliação (experimento) e ou da forma de quantificação da doença evidenciando a forte interação QRL x ambiente.

O QRL mapeado no cromossomo 1 no intervalo entre os marcadores E22333-E55534 foi altamente estável entre os ambientes e formas de avaliação da doença podendo ser indicado para a seleção assistida por marcadores.

Este é o primeiro relato na literatura especializada onde os 10 cromossomos de milho contribuem com alelos de resistência para à antracnose do colmo. Adicionalmente, é a primeira vez que são mapeados QRLs a esta doença nos cromossomos 2, 3 e 10 de milho.

Pelo grande número de marcadores moleculares associados a alelos de resistência neste germoplasma tropical sugere-se que a herança da resistência seja complexa, ou seja, condicionada por um grande número de genes, sendo alguns de

grande efeito fenotípico e a grande maioria com pequenos efeitos fenotípicos para a resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJMONE-MARSAN, P. et al. AFLP™ markers for DNA fingerprinting in cattle. **Animal Genetics**, v. 28, p. 418-426, 1997.

AJMONE-MARSAN, P. et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.219-227, 1998.

AJMONE-MARSAN, P. et al. Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using AFLP map, different testers, and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.230-243, 2001.

ALZATE-MARIN, A. L. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v 30, p. 333-342, 2005.

ARENS, P. et al. Molecular genetic analysis of Black poplar (*Populusnigra* L.) along Dutch rivers. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 11-18, 1998.

AUSTIN, D.F.; LEE, M. Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and non stress environments. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1296-1308, 1998.

BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V.E.; BERGSTROM, G.C.A major gene for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Plant Breeding**, v. 98, p. 194-199,1987a.

BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V.E.; BERGSTROM, G.C. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot and leaf blight in a maize inbred derived from a temperate by tropical germplasm combination. **Maydica**, v. 32, p. 221-237, 1987b.

BALMER, E.; PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. (Eds.) **Melhoramento e produção do milho**. 2 ed. Campinas, Fundação Cargill, p. 595-634, 1987.

BARBOSA, C.A. **Manual da cultura do milho**, Viçosa: Agro Juris, 574p. 2010.

BASF. Estação experimental de Ponta Grossa. **Dados Meteorológicos**. Ponta Grossa, 2013.

BASTEN, C. J.; WEIR, B. S.; ZENG, Z-B. **QTL Cartographer**, Version 1.17. Department of Statistics, Noth Carolina State University, Raleigh, NC, 2003.

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.

BENTO, D. A. V.; RAMALHO, M. A. P.; SOUZA, J. C. Seleção massal para prolificidade em milho na época normal e na "safrinha". **Revista Brasileira de Milho e Sorgo,** Sete Lagoas, v. 2, n.3, p. 78-87, Set./Dez. 2003.

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, p. 596-608, 1999.

BLUM, L.E.B. et al. Efeito do nitrogênio e de híbridos de milho na severidade da ferrugem comum (*Puccinia sorghi*) e na incidência de podridão do colmo (*Giberella zea* ou *Phytium sp*.). In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, 2.,1999, Lages - SC. **Anais...**Lages: UDESC/EPAGRI. p.78-82, 1999.

BLUM, L.E.B. et al. Desfolha, população de plantas e precocidade do milho afetam a incidência e a severidade de podridões do colmo. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 33, n. 5, p. 805-811, 2003.

BORÉM. A. **Melhoramento de Plantas**. 5 ed. Viçosa: UFV, 2009, 529 p.

BOSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, Chicago, v.32, n.3, p.314-331,1980.

BRADEEN, J.M.; SIMON, P.W. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y_2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.960-967, 1998.

BRASIL, E.M.; CARVALHO, Y. Comportamento de híbridos de milho em relação à *Phaeosphaeria maydis* em diferentes épocas de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 12, p. 1977-1981, 1998.

BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.2, 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.

BYRNES, K.J.; CARROL, R.B. Fungi causing stalk rot of conventional-tillage and no-tillage corn in Delaware. **Plant Disease**, v. 70, p. 238-239, 1986.

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.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Artigo de revisão: mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v 61, p. 89-100, 2002.

CARSON, M.L. Anthracnose leaf blight. **Compendium of Corn Diseases**, 3ed. American Phytopathological Society, p. 21-22, 1999.

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

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.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **Antracnose do sorgo** (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1998. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 28).

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).

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 distribuition. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.425-431, 1999

CHAMBERS, K.R. Stalk rot of maize: host-pathogen interaction. **Journal of Phytopathology**, v. 118, p. 103-108, 1987.

CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SMITH, J. S. C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**,v.39, p.866-873, 1996.

CHRISTENSEN, J.J.; WILCOXSON, R.D. Stalk rot of corn. **American Phytopathological Society**, St. Paul, M.N. 59p., 1966.

COE, E.H.; HOISINGTON, D.A.; NEUFFER, M.G. Linkage map of corn (maize) (*zea mays* L.). **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.61, p.116-147, 1987.

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.

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

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra Brasileira: grãos, nono levantamento.** Publicação Mensal, 34p. Junho, 2013.

COSTA, R.V. et al. **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 7p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 100).

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.

COTA, L.V. et al. **Efeito da podridão de colmo, causada por *Collletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 120).

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. et al. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho.** Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Serviço de produção de informação. 2ª edição. 1996

DEL RIO, L.; ZÚNGIA, T. Efecto de algunas practicas culturales u fechas de recoleccion em la incidência de *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton em maiz sembrada em dos sistemas de lanbranza. **Ceiba**, v. 32, p. 141-149, 1991.

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência das podridões da base do colmo e no rendimento de grãos do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 635-639, 2001.

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do planalto médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 585-590, 2003.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenyl propanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

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

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and typs 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, 2006.

FANCELLI, A. L. Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento. In: **Simpósio sobre rotação soja/milho no plantio direto**. Piracicaba, SP, 2000, CD-Rom.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 360p. 2000.

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: MILACH, S. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 1998. P.3-15.

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

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, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995. 220p.

FREY, T.J. et al. Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. Wils using near-isogenic maize hybrids. **Crop Science**, v. 51, p. 1551-1563, 2011.

FREYMARK, P.J. et al. Molecular-marker-facilited investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.).**Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.305-313, 1994.

GARCIA, A.A.F. et al. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 579-588, 2004.

GATCH, E.W.; MUNKVOLD, G.P. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. **Plant Disease**, v. 86, p. 1156-1162, 2002.

GEORGE, M.L.C. et al. Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia. **Theoretical and Applied Genetics**, v.107, p.544-551, 2003.

GERBER, A.C. et al. Comparasion of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p.1037-1048, 2000.

GILBERTSON, R. L., BROWN, W.M., RUPPEL, E. G. Prevalence and virulence of *Fusarium* spp. Associated with stalk rot of corn in Colorado. **Plant Disease**, v.69, p.1065-1068, 1985.

GUPTA, P. K. et al. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant Breeding**, v.118, p.369-390, 1999.

HAMMERSCHIMIDT, R.; NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose: Changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, v. 67, p. 251-258, 1977.

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

HOLLAND, J.B. et al. Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical-by-corn-belt maize populations. **Theoretical and Applieds Genetics**, v.96, p.232-241, 1998.

HOLLEY, R.N. Stalk quality and stalk rot resistance of tropical hybrid maize derevatives. **Plant Disease**, v. 72, p. 321-324, 1988.

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.

HOPKINS, M.S. et al. Discovery and chacacterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L). **Crop Science**, v.39, p.1243-1247, 1999.

HYNE, V.; KEARSEY, M.J. QTL analysis: further uses of 'marker regression'. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.471-476, 1995.

IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná. Cartas climáticas do Paraná. Disponível em:<http://www.iapar.br>. Acesso em 22 de Outubro de 2012.

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

JENNS, A.E.; LEONARD, K.J. Effects of illuminance on the resistance of inbred lines of corn to isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 75, p. 281-286, 1985.

JIANG, C.; ZENG, Z. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 140, n. 3, p. 1111-1127, Jul. 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, p. 601-610, 2011.

JONES, C. J. at el. Reproducubility testing of RAPD, AFLP, and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

JOSHI, S.P.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, Bangarole, v.77, n.2, 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.

KAO, C. H.;ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.152, p.1203-1216, 1999.

KEARSEY, M.J.; HYNE, V. QTL analysis: a simple marker regression approach. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.3 ,n.6, p.698-702, 1994.

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.

KYETERE, D.; MING, R.; McMULLEN, M.; PRATT, R.; BREWBAKER, J.; MUSKET, T.; PIXLEY, K.; MOON, H. Monogenic resistance to maize streak virus maps to the short arm of cromosome 1. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v.69, p.136-137, 1995.

KIULA, B.A.; LYIMO, N.G.; BOTHA, A.M. Association between AFLP-based genetic distance and hybrid performance in tropical maize. **Plant Breeding**, v.127, p.140-144, 2008.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW,A.; DALY, M.J.; LINCOLN, E.E.; NEWBURG, L. 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 factor sunder lying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v.121, n.1, p.185-199, 1989.

LE BEAU, F.J.; STOKES, I.E.; COLEMAN, O.H. **Anthracnose and red rot of sorghum.** U.S. Dept. Agric. Bull, p. 1035, 1951.

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

LEGESSE, B.W. et al. Relationship between hybrid performance and AFLP based genetic distance. **Euphytica**, v.162, p.313-323, 2008.

LEHMENSIEK, A.; ESTERHUIZEN, A.M.; VAN STADEN, D.; NELSON, S.W.; RETIEF, A.E. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.797-803, 2001.

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.

LIPPS, P.E. Influence of inoculum from buried and surface corn residues on the incidence of corn anthracnose. **Phytopathology**, v. 75, p. 1212-1216, 1985.

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.

LIU, B.H.; KNAPP, S.J. GMENDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, Cary, v.81,n.5, p.407-418, 1992.

LIU, B.H. *Statistical genomics*. New York: CRC, 1998. 610p.

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

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

MACKILL, D. J. et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, v. 39, p. 969-977, 1996.

MACMULLEN, 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.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; van OOIJEN, J. W. Linkages analysis in a full-sibs family of a nout breeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetics Research**, New York, v.70, p.237-250, 1997.

MARTIN, G.B.; WILLIAMS, C.G.K., TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.2336-2340, 1991

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

MATIELLO, R.R. et al. Inheritance of resistance to athracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize inbred lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, 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. Ponta Grossa, 2013. 74p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

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.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 187p.

McMULLEN, M.D.; JONES, M.W.; SIMCOX, K.D.; LOUIE, R. Three genetic loci control resistance to wheat streak mosaic virus in the maize imbred Pa405. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.708-712, 1994.

McMULLEN, M.D.; SIMCOX, K.D. Clustering of disease resistance loci in the maize genome. **Newsletter**, n.69, p.52-53, 1995b.

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, 1995a. 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, 1995a.

MOLIN, D. et al. Genetic diversity in the germoplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.99-114, 2013.

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

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M.PCR-amplifield microssatellites 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.

NAYLOR, V.D.; LEONARD, K.J. Survival of *Colletotrichum graminicola* in infected corn stalks in North Carolina. **Plant Disease**, v. 61, p. 383-383, 1977.

NAZARENO, N.R.X. Avaliação de perdas por podridão do colmo em milho (*Zea mays*) no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p .82-84, 1989.

NICHOLSON, R.L.; MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 3, p. 255-261, 1980.

NIKAIDO, A.M.; UJINO, T.; IWATA, H.; YOSHIMURA,K.; YOSHIMURA, H.; SUYAMA, Y.; MURAI, M.;NAGASAKA, K.; TSUMURA, Y. AFLP and CAPS: linkage maps of *Cryptomeria japonica*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.100, n.6, p.825-831,2000.

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 microssatálites.** 1999. 114p. 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 microssatélites loci. **Genetic and Molecular Biology**, v.23, p.395-398, 2000.

OESTREICH, D. Biotechnology: Where is it coming from and where is it going. Proc. 60th Annual Corn and Sorghum Res. Conf. American Seed Trade Association, Washington, DC. 2005.

PALTRIDGE, N.G. et al. Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the *Yd2* gene for resistance to barley Yellow dwarf disease. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1170-1177, 1998.

PAPA, R.; GEPTS, P. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 239-250, 2003.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z. et al. Diallel crosses among maize lines with emphasis on resistance to foliar diseases. **Genetic and Molecular Biology**, v. 23, p. 381-385, 2000.

PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.46, p.39-89, 1991.

PÈ, 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.; 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.

PEREIRA, O.A.P.; PEREIRA, W.S.P. Estudo de *Diplodia zeae* (Shw.) Lev. e *Fusarium moniliforme* Sheld. em colmo de milho. **Summa Phytopathologica**, v. 2, p. 165-171, 1976.

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.

PINTO, N.F.S.A; SANTOS, M.A.; WRUCK, D.S.M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte – MG, v. 27, n. 233, p. 82-94, 2006.

PRASANA, B.M. et al. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. **Molecular Breeding**, v. 26, p.339-356, 2010.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 80p. 1996.

REZENDE, V.F. **Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho.** 2004. 103p. Tese (Doutorado) - 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.

RIBEIRO, N. A. et al. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, n. 5, p. 1003-1009, 2005.

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

ROSSMAN, H. **Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos.** 2001. 91p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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.

SANGOI, L. et al. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivado com diferentes densidades de plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 17-21, 2000.

SEAB, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: www.seab.pr.gov.br. Acesso em: 24 abr. 2013.

SCHALL, R.A.; NICHOLSON, R.L.; WARREN, H.L. Influence of light on maize anthracnose in the green house. **Phytopathology**, v. 70, p. 1023-1026, 1995.

SHURTLEEF, M.C. **Compendium of Corn Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 105p. 1992.

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

SILVA, L.L. **Heterose e capacidade de combinação em cruzamentos dialélicos parciais de pimentão.** 2002. 100p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

SILVA, H.D.; VENCOVSKY, R. Testes múltiplos e associação de marcas associadas a 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.

SKOROPAD, W.P. Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form apressoria and penetrate barley leave. **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.

SNYMAN, A.J.; WEHNER, F.C. Effect of environmental factors on inoculum production by *Stenocarpella maydis*. **Phytopathology**, v. 20, p. 106, 1988. (Abstract).

SOLLER, M., BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism invarietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**, 67:25-33. 1983.

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.

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.

SUITER, K.A.; WENDELL, J.F.; CASE, J.S. Linkage 1: a pascal computer-program for the detection and analysis of genetic-linkage. *Journal of Heredity*, Cary,v.74, n.3, p.203-204, 1983.

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

TANKSLEY, S.D.; MILLER, J.; PATERSON, A.;BERNATSKY, R. *Molecular mapping of plant chromossomes*. In: GUSTAFSON, J.P.; APPELS, R.(Eds.). New York: Plenum Press, 1988. p.157-173.

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

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Ottawa, v. 39, p.277-287,1996.

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

TOMAZELA, A.L. et al. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 2, p. 192-201, 2006.

TORRECIJA, M. **Resistência de linhagens endogâmicas de milho tropical à inoculação por *Colletotrichum graminicola***. Ponta Grossa, 2012. 35p. Monografia – UEPG, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

USDA, United States Departament of Agriculture. **World Corn Production, Consumption, and Stocks**.2013.Disponível em:<http://www.fas.usda.gov>. Acesso em 29 de outubro de 2013.

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

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

VIEIRA, J. et al. Incidência de podridões da base do colmo em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante submetidas à desfolha em diferentes estádios fenológicos. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Águas de Lindóia, 2012.

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

VOS, P; KUIPER, M. AFLP analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M., ends. **DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews**. Wiley, 1997, p. 115-131.

VUYLSTEKE, M. et al. AFLP: two hight-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribuition of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.6, p.921-935, 1999.

WARREN, H.L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in corn kernels. **Phytopathology**, v. 67, n. 2, p. 160-162, 1977.

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

WHEELER, H.; POLITIS, D.J.; PONELEIT, C. G. Pathogenicity, host hange, and distribution of Colletotrichum graminicola on corn. **Phytopathology**, v. 64, p. 293-296, 1973

WHITE, D.G.; HUMY, C. Methods for inoculation of corns stalks with *Colletotrichum graminicola* on corn. **Plant Disease**, v. 60, p. 898-899, 1976.

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

WILLIAMS, L.E.; WILLIS, G.M. Disease of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 53, p. 364-365, 1963.

YANG et al. Characterization and mapping of *Rpi1*, a gene that confers dominant resistance to stalk rot in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 274, p. 229-234, 2005.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Steviare baudiana*. **Genome**, Ottawa, v.42, n.4, p.657-661,1999.

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.

YUAN, L. et al. Clustering of QTL conferring SCMV resistance in maize. **Maydica**, v.48, p.55-62, 2003.

ZANOLLA, C.A.; GALANTE, V. A. OCULTIVO DO MILHO NA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ: viabilidade e alternativas. In: XLII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, 2004, Cuiabá. Cuiabá, Dinâmicas Setoriais e Desenvolvimento Regional, 2004.

ZENG, Z.B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping of quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v.90, n.23,p.10972-10976, 1993.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.136, n.4, p.492-496, 1994.

ZHAO, X.P.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC) (n) microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, v.21, p.607-614, 1993.

ZUBER et al. Effect of anthracnose leaf blight on stalk rind strength and yield in F_1 single crosses in maize. **Plant Disease**, v. 65, p. 719-722, 1981.

ANEXO 1 – Distribuição mensal da precipitação (mm) e da temperatura (°C)

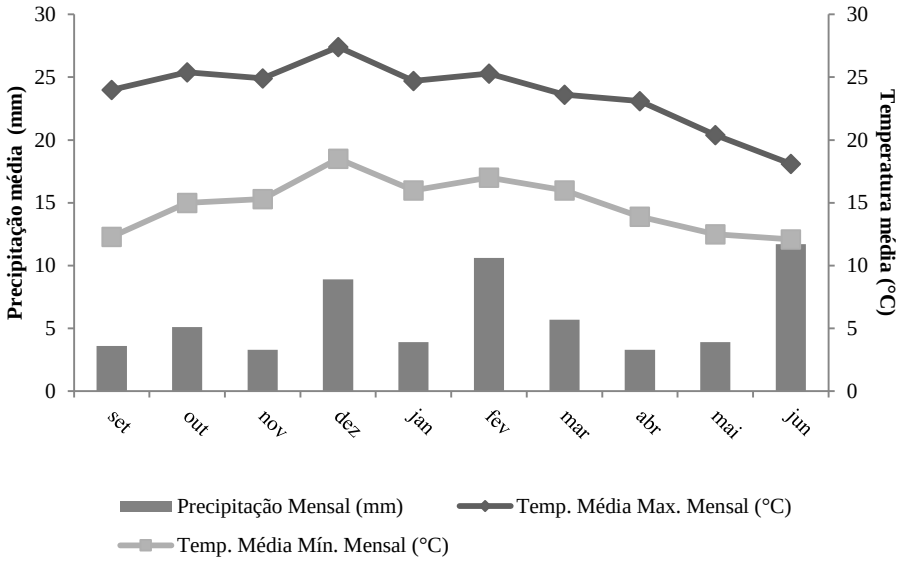

FIGURA 1− Distribuição mensal da precipitação (mm) e da temperatura (°C) ocorrida durante a condução dos experimentos de campo. As barras representam a precipitação mensal e as linhas a temperatura. Fonte: BASF, 2013.