



ADRIANO DELLY VEIGA

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA A CERCOSPORIOSE E
PRODUÇÃO DE GRÃOS EM MILHO**

**LAVRAS-MG
2011**

ADRIANO DELLY VEIGA

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A
CERCOSPORIOSE E PRODUÇÃO DE GRÃOS EM MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Dr. Renzo Garcia Von Pinho

**LAVRAS-MG
2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Veiga, Adriano Delly.

Identificação de QTLs associados à resistência a cercosporiose e
produção de grãos em milho / Adriano Delly Veiga. – Lavras:
UFLA, 2011.

90 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Renzo Garcia Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Cercospora zea maydis*. 2. Microsatélites. 3. Marcadores
moleculares. 4. Controle genético. 5. Máxima verossimilhança. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.1523

ADRIANO DELLY VEIGA

**IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A
CERCOSPORIOSE E PRODUÇÃO DE GRÃOS EM MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 03 de Novembro de 2011

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	DAG/UFLA
Dr. Adriano Teodoro Bruzi	DAG/UFLA
Dr. José Airton Rodrigues Nunes	DBI/UFLA
Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu	EMBRAPA

Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Orientador

**LAVRAS – MG
2011**

*Aos meus pais, Ruben e Elizabete,
Ao meu irmão André
E todos os familiares.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades que surgem em nosso caminho, pela proteção e sabedoria que nos guiam para que estas sejam aproveitadas da melhor maneira possível.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

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

Ao Prof. Renzo Garcia Von Pinho, pela orientação e confiança durante a realização do trabalho.

Às Profas.Dras. Luciane Vilela Resende e Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelas contribuições e coorientação.

Aos Profs. Drs. Adriano Teodoro Bruzi e José Airtton Rodrigues Nunes e à pesquisadora Dra. Ângela de Fátima Barbosa Abreu, pelas contribuições e participação na banca de defesa.

Aos professores dos Departamentos de Agricultura e Biologia por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos bolsistas envolvidos no projeto de pesquisa, em especial à Laís Andrade Pereira, por todas as contribuições e acompanhamento do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes da UFLA, pela disponibilidade e atenção durante a realização do trabalho.

A todos os amigos do Departamento de Agricultura, em especial a todos os integrantes do Grupo do Milho, pelas contribuições e companheirismo durante todo o tempo de convivência.

RESUMO

A cercosporiose é considerada uma das principais doenças da cultura do milho. A incorporação de resistência genética está entre os principais objetivos dos programas de desenvolvimento de híbridos para as regiões em que a doença é prevalente. A identificação de locos de caracteres quantitativos (QTL) por meio de marcadores moleculares possibilita a rápida obtenção de cultivares resistentes e produtivas, via seleção assistida. O objetivo do autor com a pesquisa foi a identificação de QTLs associados com a resistência à cercosporiose e com a produção de grãos em germoplasma de milho tropical. Foram utilizadas duas linhagens contrastantes em níveis de reação à doença, a linhagem L30 (resistente) e a linhagem L31 (suscetível), seu híbrido F_1 e a população segregante F_2 , obtida pela autofecundação do híbrido. Esses indivíduos foram fenotipados quanto à resistência à doença e quanto a produção de grãos e genotipados por meio de 94 marcadores de microssatélites. Alguns parâmetros genéticos foram estimados e a associação dos marcadores moleculares ao QTL foi realizada por meio de análises de marca individuais utilizando os métodos de regressão linear simples, regressão linear múltipla com seleção das variáveis regressoras pelo processo de stepwise e análise da máxima verossimilhança. Foi observada a possibilidade de identificar marcadores moleculares ligados a QTL associados ao controle da resistência a cercosporiose e com a produção de grãos em milho. Houve uma concordância entre os resultados encontrados pelos diferentes métodos principalmente para resistência a doença. Observou-se que o tipo de efeito predominante para o controle da resistência a cercosporiose foi o aditivo e para o controle genético da produção de grãos foi o de dominância. Os marcadores mais promissores para serem usados em estudos de seleção assistida são umc2082 e umc1117 para resistência a cercosporiose e umc1042 e umc1058 para a produção de grãos.

Palavras-chave: Resistência. Microssatélites. *Cercospora Zea Maydis*. Máxima verossimilhança.

ABSTRACT

Gray leaf spot is one of the most significant diseases in corn plants. Genetic resistance incorporation is one of main purposes in maize breeding programs. The identification of quantitative traits loci linked to molecular markers may provide advantage in selection efficiency and save time as well. The objective of this research was to identify QTL associated with Gray leaf spot resistance and grain yield in a tropical maize germplasm. Two inbred lines with different resistance degrees (L30 and L31), the hybrid (L30 x L31) and F₂ plants derived by selfing this hybrid were phenotyped for disease resistance and grain yield and genotyped for microsatellite markers. Genetic population parameters were estimated and markers linked to QTL detected through single point analysis using simple regression, multiple regression, with selection of regression variables by stepwise procedure and maximum likelihood analysis. Results indicated that there is the possibility of identifying molecular markers related to Gray leaf spot resistance and grain yield utilizing these techniques. There is an agreement in the results found through methods, mainly for the disease resistance. It was found the genetic control of resistance to Gray leaf spot is oligogenic with the predominance of the additive effects, and the dominance effect had predominance for grain yield. The most promising markers to be used in marker assisted selection researches are umc2082 and umc1117 for Gray leaf spot and umc1042 and umc1058 for grain yield.

Keywords: Resistance. Microsatellite. *Cercospora Zea Maydis*. Maximum likelihood analysis.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1	Sintomas em folha, causados por <i>Cercospora zea-maydis</i> , agente causal da cercosporiose do milho	17
Figura 2	Escala diagramática para a avaliação das doenças foliares do milho proposta pela Agroceres (1996)	34
Figura 3	Distribuição da população F ₂ oriunda da combinação híbrida 30/31. Valores de média, desvio padrão e número de plantas (N)	45
Figura 4	Distribuição da população F ₂ oriunda da combinação híbrida 30/31. Valores de média, desvio padrão e número de plantas.....	46
Figura 5	Porcentagem de pares de primer não informativos (NI), informativos ou polimórficos (I) e sem definição (S).	49
Figura 6	Eletroforese dos produtos da reação para os genitores (P ₁ – resistente e P ₂ – suscetível) e F ₁ , utilizando padrão de 1000 pb....	51
Figura 7	Genotipagem de indivíduos F ₂ utilizando primer bnlg1265 e padrão de 1000 pb.	52
Figura 8	Distribuição empírica de H ₀ , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc1117 ...	61
Figura 9	Estacionaridade do algoritmo EM considerando efeito aditivo (a) no controle da severidade da doença utilizando o marcador umc1117.....	62
Figura 10	Distribuição empírica de H ₀ , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc1042 ...	64
Figura 11	Estacionaridade do algoritmo EM considerando efeito de dominância (d) no controle da produção de grãos utilizando o marcador umc1058.....	65

Figura 12	Estacionaridade do algoritmo EM considerando frequência de recombinação no controle da produção de grãos utilizando o marcador umc1058.....	67
Quadro 1	Relação dos pares primer utilizados para seleção de polimorfismo entre genitores	37
Quadro 2	Pares de primers polimórficos entre os parentais L30 e L31	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo da análise de variância para severidade da cercosporiose e produção de grãos. UFLA, Lavras, MG, 2011	47
Tabela 2	Resumo do desdobramento do tratamento dentro de cada geração para severidade da cercosporiose e produção de grãos. UFLA, Lavras, MG, 2011	47
Tabela 3	Médias e variâncias da severidade da cercosporiose e da produção de grãos nas gerações avaliadas. UFLA, Lavras, MG, 2011	48
Tabela 4	Relação de marcadores de microssatélites associados à resistência a cercosporiose, sua posição no genoma, valor do teste de F, variância residual, proporção explicada pelo marcador e frequência de recombinação obtida na análise de regressão linear simples. UFLA, Lavras, MG, 2011	53
Tabela 5	Frequência de recombinação, estimativas do efeito aditivo e de dominância do loco marcador (β_1 , β_2) e do loco QTL (a,d) associados à resistência a cercosporiose em milho, por meio de regressão linear simples. UFLA, Lavras, MG, 2011	55
Tabela 6	Relação de marcadores de microssatélites associados à produção de grãos, sua posição no genoma, valor do teste de F, variância residual, proporção explicada pelo marcador e frequência de recombinação obtida na análise de regressão linear simples	56
Tabela 7	Frequência de recombinação e estimativas dos efeitos aditivos e dominante do loco marcador (β_1 , β_2)e do loco QTL (a, d) associados a produção de grãos, por meio de regressão linear simples.....	56

Tabela 8	Resumo da análise de regressão múltipla para resistência a cercosporiose utilizando o processo de Stepwise para a seleção dos marcadores	58
Tabela 9	Resumo da análise de regressão múltipla para produção de grãos utilizando o processo de Stepwise para a seleção dos marcadores	59
Tabela 10	Relação dos marcadores de microssatélites associados à resistência a cercosporiose e as informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), grau de dominância (d/a), variância, porcentagem de recombinação (r), razão de máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade	62
Tabela 11	Relação dos marcadores microssatélites associados à produção de grãos e as informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), variância, porcentagem de recombinação (r), razão da máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade a partir de valores expressos em kg/planta.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Cercosporiose	16
2.1.1	Importância e sintomatologia	16
2.1.2	Etiologia da doença	18
2.2	Controle genético da resistência a Cercosporiose	21
2.3	Marcadores moleculares no melhoramento genético	23
2.4	Deteção de QTL	25
2.5	Mapeamento e identificação de QTL associados à cercosporiose	28
2.6	Identificação de QTLs associados à produção de grãos	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Material genético	32
3.2	Multiplicação das sementes e obtenção da geração F₂	32
3.3	Avaliação da doença	33
3.4	Avaliação da produção de grãos	34
3.5	Análises dos dados e estimativas dos parâmetros genéticos	34
3.6	Análises moleculares	36
3.6.1	Extração do DNA	36
3.6.2	Marcadores microssatélites	37
3.7	Deteção de QTL	39
3.7.1	Regressão Linear com marcas individuais	39
3.7.2	Regressão linear múltipla	41
3.7.3	Análise por meio da máxima verossimilhança	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Avaliação fenotípica dos dados	45

4.2	Estimativa de parâmetros genéticos.....	48
4.3	Polimorfismo entre genitores e análise de composição dos primers.....	49
4.4	Detecção de QTL.....	52
4.4.1	Regressão Linear por marcas individuais	52
4.4.2	Regressão linear múltipla.....	57
4.4.3	Análise por meio da máxima verossimilhança	60
5	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O avanço em produtividade na cultura do milho devido ao melhoramento genético é evidente, no entanto, condições de estresses edafo-climáticas e/ou biológicas podem dificultar a expressão do máximo potencial genético de produtividade das cultivares. No Brasil tem-se observado aumento da área de safrinha e de plantio direto com a cultura, o que tem propiciado o desenvolvimento de doenças durante todo o ano. Nestas condições são observadas alterações tanto na severidade quanto na dispersão de doenças, devido ao aumento do potencial de inóculo dos patógenos que sobrevivem nos restos da cultura anterior.

No entanto o cultivo nessas condições é inevitável e irreversível por propiciar o aumento da renda aos agricultores, com reflexos diretos no agronegócio brasileiro. Além disso, o plantio direto tornou-se uma técnica adotada em várias regiões do país por ser uma importante prática de conservação do solo, além de apresentar outras inquestionáveis vantagens para o agricultor quando comparada ao preparo convencional do solo.

É importante ressaltar que a doença é uma interação dinâmica entre dois organismos vivos (patógeno e hospedeiro) e o ambiente. Com isso, basta que as condições se tornem favoráveis à interação ou que ocorra variação no patógeno, para que uma doença considerada secundária passe a ter importância relevante para a cultura. Diferentes patossistemas têm sido estudados, visando o conhecimento da evolução de epidemias (ALVES, 2004), aspectos moleculares da interação patógeno-hospedeiro (BRUNELLI, 2004; JULIATTI et al., 2009), controle genético (BRITO, 2009; LOPES et al., 2007), danos e perdas (BRITO et al., 2007; SOUZA, 2005).

Não há dúvidas sobre a importância do melhoramento genético do milho para as características de resistência aos estresses bióticos e abióticos, buscando

garantia de estabilidade da produção de grãos nos diferentes sistemas de cultivo, de forma sustentável com menos impacto ao meio ambiente. No Brasil, o melhoramento visando à resistência às doenças é importante em função do número crescente de doenças, muitas consideradas sem importância econômica até pouco tempo atrás. Tem sido relatado que desenvolvimento de novas doenças ou de raças fisiológicas constitui a causa mais importante da descontinuidade de híbridos comerciais no mercado, diante das técnicas de cultivo utilizadas pelos agricultores. Como exemplos têm-se, doenças causadas por *Bipolaris maydis* raça T no início dos anos 70, *Phaeosphaeria maydis* na década de 80, do complexo de enfezamento do milho (“corn stunt” e “maize bushy stunt”) e ferrugens na década de 90.

Mais recentemente, no Brasil, a cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora zea-maydis* (Cz), tem sido considerada uma das principais doenças na cultura do milho, principalmente na região centro-sul do país. Hoje, a incorporação de resistência genética a Cz está entre os principais objetivos dos programas de desenvolvimento de híbridos para as regiões em que essa doença é prevalente. Sabe-se que o desenvolvimento de cultivares para a resistência a doenças é demorado e oneroso por envolver vários ciclos de seleção.

O mapeamento e identificação de locos de caracteres quantitativos (QTLs) com o uso de marcadores moleculares possibilitam o desenvolvimento mais rápido de cultivares resistentes e produtivas, via seleção assistida por marcadores, dentre eles os microssatélites e os SNPs (Single nucleotide polymorphism). Com o uso destas ferramentas, para a investigação dos caracteres, aliado a disponibilidade de metodologias estatísticas de identificação de QTLs, é possível o monitoramento de regiões cromossômicas específicas que afetam a expressão do caráter, fornecendo informações sobre o número, localização e magnitude dos efeitos do loco ou locos que controlam os caracteres quantitativos.

Por ser um caráter quantitativo, as dificuldades inerentes ao incremento da produção são as mesmas encontradas para os caracteres de expressão complexa, como a expressão de resistência na maioria das doenças em milho. Estudos relacionados ao conhecimento da natureza e da magnitude dos efeitos gênicos que controlam o caráter alvo são importantes para direcionar os trabalhos de introdução de alelos favoráveis e maximizar a exploração da variabilidade genética.

Diante do exposto o objetivo desta pesquisa foi identificar QTLs e seus efeitos associados com a resistência à cercosporiose e com a produção de grãos em germoplasma de milho tropical.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cercosporiose

2.1.1 Importância e sintomatologia

A cercosporiose foi inicialmente descrita na cultura do milho (*Zea mays L.*), em Illinois, Estados Unidos, no ano de 1925 (TEHON; DANIELS, 1925 citados por COATES; WHITE, 1994). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1953 (CHUPP, 1953) e durante um longo período, foi considerada uma doença secundária por sua ocorrência esporádica e baixa severidade. Esse quadro foi revertido no final da década de 90, quando foram relatadas epidemias em alguns campos de produção nos municípios de Rio Verde e Jataí (GO). Nas safras seguintes, a epidemia progrediu para toda a região centro-sul brasileira (JULIATTI; BRANDÃO, 2000).

Os sintomas da cercosporiose são observados inicialmente na fase de floração, principalmente nas folhas baixas (WARD et al., 1999), quando o patógeno coloniza o limbo foliar, provocando extensas áreas necróticas. O sintoma típico da doença se caracteriza pelo aspecto linear retangular das lesões que, geralmente, são delimitadas pelas nervuras (LATTEREL; ROSSI, 1983), (Figura 1). Estas manchas possuem coloração palha e ou verde-oliva e, sob condições de alta umidade relativa, tornam-se cobertas por esporos, conferindo-lhes uma coloração acinzentada (CHUPP, 1953). Por esta característica, a mancha é conhecida, na língua inglesa, como ‘*gray leaf spot*’.



Figura 1 Sintomas em folha, causados por *Cercospora zeae-maydis*, agente causal da cercosporiose do milho

Híbridos menos suscetíveis podem apresentar sintomas mais atenuados que os apresentados acima. As manchas, nesse caso, podem ser menores e menos retangulares, geralmente acompanhadas por bordos cloróticos ou avermelhadas (FREPPON; LIPPS; PRATT, 1994). A esporulação neste tipo de lesão é diminuta, o que contribui para uma menor intensidade da epidemia.

A redução na produção de grãos em híbridos suscetíveis pode ser considerável. Donahue, Stromberg e Myers (1991) estimaram perdas de até 25% em regiões dos EUA. Em agosto de 1995, o Wall Street Journal reportou que a doença reduziu a produção em 50%, em muitos campos de produção de milho dos EUA (WARD et al., 1999). Na África do Sul, foram constatadas perdas de 65% em híbridos de milho suscetíveis (WARD; NOWELL, 1998 citados por BRITO, 2007).

Danos de até 50% podem ser encontrados dependendo do estágio fenológico do milho em que a doença aparece (LIPPS, 1998). Se a doença não ocorre até o período de enchimento dos grãos, os danos são menores. Se a infecção da planta e o aparecimento dos sintomas iniciais se evidenciarem entre

a 4ª e 8ª folha, a redução do potencial produtivo da cultura poderá oscilar entre 40% e 70%. Porém, se a incidência exceder 40%-50% da área foliar posicionada acima da espiga, no período compreendido entre o pendoamento e o florescimento, os danos podem oscilar entre 65% e 90% (WARD et al., 1999).

Nutter e Jenco (1992) avaliaram o efeito da severidade da doença, ocorrendo no terço médio da planta de milho (folhas 6 a 12), no estágio de grãos pastoso/farináceos, e observaram que a cada 1% de acréscimo na severidade, a produção de grãos foi reduzida em 47,6 kg ha⁻¹.

Brito et al. (2007) quantificaram os danos causados pela cercosporiose na região Sul de Minas Gerais e observaram valores que variaram de 16% a 27%, para híbridos suscetíveis à doença. Os mesmos autores concluíram que o nível de dano causado pela cercosporiose no milho varia entre as épocas de semeadura e entre os híbridos avaliados com diferentes níveis de resistência, sendo, em média, de 13,3%.

Essa redução de produtividade se dá pela alta severidade da doença nas folhas, diminuindo a área fotossinteticamente ativa. Os danos também ocorrem pelo enfraquecimento da planta que, por sua vez, favorece podridões de colmo levando ao tombamento da mesma. Os danos não se restringem somente à redução causada diretamente pelo patógeno. Nas safras de 2000 e 2001, vários híbridos altamente produtivos tiveram que ser substituídos por outros de menor potencial produtivo, mas com boa resistência.

2.1.2 Etiologia da doença

A etiologia da doença é associada a duas espécies fúngicas: *Cercospora zae-maydis* Tehon & Daniels e *Cercospora sorghi* Ellis & Everh f. sp. *maydis* (CHUPP, 1953). Ambas foram relatadas em praticamente todas as regiões brasileiras em que o milho é cultivado (FANTIN et al., 2001). No campo, *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* é um patógeno pouco eficiente na colonização

de tecidos foliares, uma vez que a lesão produzida por esta espécie é pequena, sempre circundada por halos cloróticos e com pequena quantidade de esporos. A outra espécie, *C. zeaе maydis*, coloniza, de forma mais eficiente, o hospedeiro, produzindo lesões retangulares, geralmente sem halo clorótico e com grande quantidade de conídios, sendo atribuídos a esta espécie os surtos epidêmicos da doença (CHUPP, 1953; WARD et al., 1999).

A diferenciação das duas espécies baseia-se na morfologia de seus conídios. *C. zeaе-maydis* possui conídios mais curtos e largos, com dimensões variando de 40-165 µm de comprimento por 4-9 µm de largura, enquanto que, em *C. sorghi* f. sp. *maydis*, os conídios são mais estreitos, medindo de 40-120 µm de comprimento por 3-4,5 µm de largura (DUNKLE; CARSON, 1998; SHURTLEFF, 1980).

Isolados coletados em várias regiões de produção de milho nos EUA, indicaram que a população americana de *C. zeaе maydis* é composta por dois grupos genéticos do patógeno (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998). No entanto, isolados com padrão genético do grupo I foram encontrados em todas as regiões amostradas, enquanto aqueles do grupo II foram encontrados apenas ao leste do país. Em estudos realizados por Dunkle e Levy (2000), com isolados africanos demonstraram que a população de *C. zeaе maydis* é composta, unicamente, por isolados do grupo II. Em ambos os estudos, houve alta similaridade genética entre os isolados de cada agrupamento (sempre maior que 90%), o que pode ser decorrência da baixa capacidade de recombinação e ou mutação desses isolados. Brunelli (2004), estudando isolados de *C. zeaе maydis* coletados em campos de produção de milho da região centro-sul brasileira, observou a existência de forma generalizada, dos grupos I e II de *C. zeaе maydis* no território brasileiro.

As temperaturas ótimas para o progresso da cercosporiose ocorrem entre 25° e 30 °C e longos períodos de umidade relativa do ar próxima a 90%. Tem sido observado que o progresso da doença é beneficiado pela alternância de duas

condições distintas: um período de água livre sobre a folha e outro período com a superfície foliar seca, ambas sob umidade relativa alta. Quando o esporo atinge a folha ele se fixa na superfície e necessita de água livre para “germinar”. Depois de germinado é necessário um período com a superfície foliar seca para que ocorra a penetração, que se dá pelos estômatos. A colonização da folha inicia-se a partir deste processo. Mesmo sob condições favoráveis, o período latente de *C. zea-maydis* é longo em comparação ao de outros patógenos foliares e pode variar de 14 a 28 dias (PAUL; MUNKVOLD, 2005).

Espécies de *Cercospora* produzem uma fitotoxina não específica chamada cercosporina. Quando estes fungos são cultivados em meio de cultura e sob regime de alta luminosidade, há liberação da toxina no meio na forma de um pigmento de coloração vermelho-púrpura que pode ser facilmente observado. No tecido foliar, reações químicas ocorridas após a liberação desta substância a convertem em produtos capazes de danificar a integridade da membrana celular, desorganizar a estrutura citoplasmática e ocasionar a morte da célula, agindo como fator de virulência na doença causada (DAUB, 1982 citado por BRUNELLI, 2004).

A espécie *C. zea-maydis* é um patógeno que infecta somente o milho sendo sua sobrevivência garantida pela colonização do hospedeiro vivo ou dos restos de cultura presentes na superfície do solo (LATTERELL; ROSSI, 1983). No Brasil, as práticas de semeadura direta e do plantio de milho safrinha, associadas ao uso de irrigação (pivô central), garantem o incremento e a manutenção do inóculo, além da umidade adequada à infecção pelo patógeno, fatos que podem ter contribuído para o aumento da doença nestes últimos anos (FANTIN et al., 2001).

A doença é disseminada por meio de esporos produzidos pelo fungo na planta hospedeira ou em tecido de restos culturais, os quais são levados pelo

vento e ou respingos de chuva para dentro da mesma cultura ou para regiões afastadas (WARD et al., 1999).

2.2 Controle genético da resistência a Cercosporiose

Antes de iniciar um programa de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares resistentes às doenças, devem-se avaliar os danos econômicos ocasionados pela doença, as fontes de resistência, o mérito agrônomico destas fontes, a complexidade da herança da resistência, a facilidade de manipulação do patógeno, além de definir as regiões para onde se pretende controlar as doenças (BORÉM; MIRANDA, 2009).

No melhoramento convencional visando resistência horizontal têm sido utilizadas duas estratégias para avaliação: a. Melhoramento para os componentes da resistência; b. Resistência de campo. No primeiro caso, na maioria dos trabalhos tem sido utilizados os componentes da resistência que exibem maior herdabilidade, principalmente porque são avaliados com maior precisão, como o período latente. Já em relação à resistência de campo, avalia-se o desempenho dos genótipos com base na sua reação global ao patógeno, utilizando-se para isso os diversos procedimentos de medição de doença (SANTOS, 2008).

Existe a necessidade de realizar intercruzamentos nas populações segregantes, já que não se consegue concentrar todos os alelos para resistência horizontal em um único ciclo de seleção, assim a melhor estratégia para o melhoramento convencional de espécies alógamas seria a seleção recorrente. Como ela é geralmente empregada no melhoramento de vários caracteres agrônomicos, a reação a cada patógeno seria mais um caráter a ser considerado (SANTOS, 2008).

Além dos métodos de melhoramento convencional para resistência, a seleção assistida por marcadores apresenta grande potencial de utilização para a piramidação e introgressão de alelos de maior e menor efeito.

A identificação de alelos responsáveis por características quantitativas por meio de marcadores permite a manipulação individual de cada loco ou bloco gênico, sendo que cada um destes contribuem para uma parcela da variação fenotípica. O efeito fenotípico pode ser determinado sob diversas condições ambientais e genéticas. Assim tem-se a possibilidade de agrupar vários alelos de resistência para a obtenção de cultivares com resistência durável de forma mais rápida e eficiente.

Em estudos de herança foi observado que a resistência a cercosporiose é governada por um grande número de genes de pequeno efeito, com prevalência de efeitos aditivos (MARROF et al., 1996). A resistência à doença, principalmente a quantitativa, atua sobre os componentes policíclicos da doença, como período latente e esporulação (COATES; WHITE, 1994; FREPPON; LIPPS; PRATT, 1994). Esses efeitos diminuem a produção de inóculo secundário, reduzindo sobremaneira a epidemia na área. Genótipos que produzem apenas lesões cloróticas não esporulantes, diminuem a taxa de progresso da doença, proporcionando efetivo controle da mesma (FREPPON; LIPPS; PRATT, 1994; FREPPON; PRATT; LIPPS, 1996).

Frequentemente observa-se significativa interação genótipos x ambientes. A variação na severidade pode ser devido à instabilidade dos locos de resistência na interação com o ambiente e ou a diferenças na população do patógeno entre os ambientes (WARD et al., 1999). Desse modo, as causas dessas interações devem ser investigadas para proporcionar um controle mais efetivo da doença.

Vários locos controladores de características quantitativas (QTL), com diferentes tipos de ação gênica, são associados com a resistência a cercosporiose, sugerindo uma possível resistência horizontal ou poligênica (BUBECK et al., 1993). Esses QTLs podem ser detectados pelo uso de

marcadores moleculares do tipo RFLPs (SAGHAI-MAROOF et al., 1993), microssatélites (JULIATTI et al., 2009) e por SNP (POZAR et al., 2009).

2.3 Marcadores moleculares no melhoramento genético

Dentre os marcadores mais informativos baseados nas diferenças de comprimento das seqüências amplificadas pela reação da polimerase ou PCR estão os microssatélites. Estes marcadores amplificam regiões contendo seqüências repetitivas de DNA de comprimento variável. Microssatélites são pequenas seqüências de um a seis nucleotídeos comumente repetidos em tandem (GUPTA, 1996). Em milho, estima-se que ocorra um microssatélite a cada 58 Kb (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998). Microssatélites normalmente são flanqueados por segmentos de DNA únicos e conservados. Dessa forma, torna-se possível a escolha de primers que amplificam especificamente um único loco de microssatélite.

Os microssatélites (SSR) possuem uma série de vantagens, sendo freqüentemente escolhidos para o mapeamento genético em eucariotos. Dentre as vantagens, podem-se destacar alta reprodutibilidade, herança mendeliana, codominância, distribuição aleatória por todo o genoma e bom nível de polimorfismo. Além disso, requer pouca quantidade de DNA para sua amplificação, permite a semi-automatização em ensaios multiplex e são transferíveis entre genótipos, populações e laboratórios (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os alelos diferem porque apresentam números distintos de repetições em tandem, oriundos de crossing-over desigual durante a meiose ou do deslizamento da DNA polimerase durante a duplicação da molécula. Na reação de PCR, cada fragmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo de um mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Se o pareamento for feito com

uma sequência repetida erroneamente posicionada na outra fita, a DNA polimerase pode adicionar ou deletar uma ou mais cópias da repetição da nova fita de DNA em um processo conhecido como slippage (PINTO et al., 2001).

Independente da origem da variação e do elemento repetitivo, o microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Essa natureza altamente informativa, combinada com a especificidade e rapidez da tecnologia de PCR, fazem desses marcadores uma eficiente ferramenta para estudos de genes eucarióticos (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Em geral os elementos repetidos mais comumente encontrados são (AT)_n, seguidos por (AG)_n, além dos motivos (ATA)_n, (AAC)_n, (AGC)_n, (AAG)_n, (AATT)_n (AAAT)_n e (ACTC)_n (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998). Foi observado que microssatélites trinucleotídicos são menos frequentes que dinucleotídicos no genoma, sendo 57% dos microssatélites compostos por trinucleotídeos que contêm CG posicionados em regiões codificadoras no genoma. Já as repetições mono, di e tetranucleotídeos estão localizadas em regiões não codificadoras no genoma (MORGANTE; HANAFEY; POWELL, 2002; WANG; LEVY; DUNKLE, 1998).

Os marcadores SSR têm sido utilizado na detecção de genes ou locos cromossômicos que controlam uma determinada característica quantitativa, denominados QTLs (Quantitative Trait Loci). Segundo Falconer e MacKay (1996), um QTL é um segmento de cromossomo que afeta uma determinada característica, não sendo necessariamente um único gene.

Para que um determinado marcador molecular possa ser utilizado em um programa de melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores moleculares, é necessário que a população esteja em desequilíbrio de ligação. Caso contrário, a probabilidade de ocorrência de determinada classe de marcador seria independente da segregação dos alelos dos QTLs em questão. O

desequilíbrio de ligação é definido como qualquer desvio nas frequências alélicas esperadas sob cruzamentos ao acaso. Este desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados e estimados por meio de análises estatísticas (SILVA, 2001).

Para garantir esse desequilíbrio de ligação, o uso de delineamento experimental envolvendo o cruzamento de linhagens divergentes e a formação de gerações F_1 e F_2 se mostram mais vantajoso do que outros delineamentos (BEEK; ARENDONK; GROEN, 1995). Por apresentarem o máximo desequilíbrio de ligação, além de apresentarem facilidade e rapidez na obtenção, populações F_2 são comumente utilizadas em estudos de mapeamento e identificação de QTL. Porém, como as medições das características são feitas em plantas individuais, há uma diminuição da precisão da estimativa.

2.4 Detecção de QTL

Em grande parte dos trabalhos de melhoramento genético utilizando-se marcadores moleculares priorizam-se caracteres de herança simples, uma vez que as variações fenotípicas são de fácil mensuração e análise (LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000). Entretanto, a maioria das características de importância econômica em milho é classificada como poligênicas ou quantitativas (STUBER, 1995). Dentre elas, podem-se citar produção de grãos, altura da planta, teor de óleo e de proteínas nos grãos e resistência a maioria das doenças.

A capacidade de detectar um QTL depende da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como da herdabilidade da característica analisada (BORÉM; CAIXETA, 2009). As principais razões para o insucesso do uso de seleção assistida por meio de

marcadores de QTLs são a forte ligação destes com o ambiente, o uso de populações pequenas que geram problemas na estimativa do número de QTLs e de seus efeitos e em geral os QTLs explicam uma baixa porcentagem da variação fenotípica (BERNARDO, 2002).

A seleção assistida por marcadores tem sido utilizada com sucesso para características com alta herdabilidade e justificada para os caracteres com dificuldades na fenotipagem, como a infrequência na ocorrência de doenças, a avaliação de diferentes doenças que ocorrem em um mesmo período e competem pelo mesmo espaço foliar e ao alto custo da fenotipagem (HOLLAND, 2004).

O mapeamento e identificação de QTL, que se constitui em uma das principais aplicações dos marcadores moleculares, possibilitam a obtenção de informações de grande potencial para uso no melhoramento dos caracteres quantitativos. Uma das principais alternativas para a incorporação dessas informações no melhoramento genético seria a realização da SAM (seleção assistida por marcadores) com base exclusivamente nos QTLs mapeados, que podem ser transferidos para outros genótipos por meio de retrocruzamento assistido por marcadores. No caso do desenvolvimento de linhagens superiores para a obtenção de híbridos, essa estratégia pode ser empregada tanto na utilização de linhagens elite quanto não elite que possuam QTL de interesse para o caráter, posteriormente introgridos nas linhagens parentais para obtenção dos híbridos. A grande vantagem nesse processo é o aproveitamento de QTL de grande efeito presentes em linhagens não elites, que não seriam utilizadas no melhoramento convencional em função do tempo necessário à realização dos retrocruzamentos, uma vez que a transferência é direcionada apenas à região do genoma em que o QTL está presente (BENTO, 2006).

Diferentes são os métodos propostos para a identificação e localização de QTL, podendo a associação entre marcador e QTL ser avaliada utilizando-se

uma, duas ou mais marcas simultaneamente. Na análise de marcas individuais, a distribuição dos valores do caráter é examinada separadamente para cada loco marcador, podendo ser utilizada uma regressão linear simples para cada marcador. Assim, cada teste é realizado independente da informação dos outros locos, sendo esse tipo de análise geralmente, uma boa opção quando o objetivo é simplesmente a detecção de QTL ligados à marca em detrimento da estimação da posição e dos efeitos do mesmo (SILVA, 2001).

Na análise de regressão múltipla, em que um conjunto de variáveis independentes está disponível, o modelo de regressão não precisa incluir necessariamente todas estas variáveis. Deve-se escolher o modelo que melhor explique a variação na variável dependente y , incluindo apenas as variáveis independentes que contribuam para a eficiência do modelo, expressa pela sua capacidade de prever y . O modelo mais adequado para explicar as variações na variável dependente é aquele que inclui todas as variáveis principais, associadas à variável dependente, sem incluir variáveis redundantes, ou seja, correlacionadas entre si. Entre os métodos que podem ser utilizados na escolha do modelo, o stepwise tem sido mais frequentemente utilizado em análise de QTL (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

O método da máxima verossimilhança foi proposto considerando que a probabilidade de detectar um determinado QTL, dado o genótipo de um marcador molecular, depende tanto do seu efeito quanto da proximidade em que ele se encontra do marcador. Como nas análises de regressão ou de variância, as associações detectadas podem ser atribuídas a QTLs de grande efeito, relativamente distantes do marcador, ou de pequeno efeito, porém próximos ao marcador, é necessário utilizar uma metodologia que permita tanto o estudo da associação considerando valores de distâncias (r) mais precisos, quanto à avaliação e o teste dos efeitos do loco QTL.

Outra análise mais detalhada seria o mapeamento por intervalo, proposto por Lander e Botstein (1989). A ideia original dos autores foi de utilizar um par de marcadores como unidade de análise e não um único marcador, sendo esta a base de todos os métodos de mapeamento de QTL utilizados atualmente. Por meio da técnica é possível obter uma localização mais precisa dos marcadores e QTL (SCHUSTER; CRUZ, 2004).

2.5 Mapeamento e identificação de QTL associados à cercosporiose

A maior parte das pesquisas de mapeamento de QTLs de resistência à Cercosporiose foi conduzida em ambiente de clima temperado (BUBECK et al., 1993; CLEMENTS; DUDLEY; WHITE, 2000; GORDON, 2003; SAGHAI-MAROOF et al., 1996).

Bubeck et al. (1993), utilizando as linhagens NC250 e ADENT como fontes de resistência e três populações $F_{2:3}$, mapearam QTL em cinco cromossomos, mas somente um destes, no cromossomo 2, foi consistente nas populações e ambientes utilizados. Gordon (2003) também mapeou QTL nos cromossomos 2 e 4 explicando em conjunto 47% da variação fenotípica na geração $F_{2:3}$ e 55% na geração $F_{3:4}$ nos ambientes avaliados. Saghai-Marroff et al. (1996) encontraram 3 QTLs nos cromossomos 1, 4 e 8 que explicaram conjuntamente 44 e 68% da variação fenotípica em populações F_2 e F_3 .

Em pesquisa realizada por Pozar et al. (2009), foram mapeados e caracterizados QTLs relacionados com a resistência a Cz, em três diferentes ambientes, por meio de marcadores SSR e SNP. Para confirmação dos efeitos dos QTLs identificados nos 187 $F_{2:3}$ derivados do cruzamento das linhagens contrastantes MON323 e MON402, foram utilizadas linhagens quase isogênicas (LQI). Foram mapeados quatro QTLs, nos cromossomos 1, 3 e 7, dos quais três foram avaliados em LQIs apresentando efeitos aditivos e dominantes. Estes

locos de resistência não foram consistentes entre os ambientes e apresentaram uma porcentagem da variação fenotípica de no máximo 25,6%. Na avaliação das LQIs foram observados efeitos individuais altamente significativos para os QTLs dos cromossomos 1 e 3 na redução da severidade de Cz.

Juliatti et al. (2009) trabalharam com 90 famílias F_3 oriundas do cruzamento dos parentais BS03 (suscetível) e BS04 (resistente) e delineamento em lâttice 10 x 10 com três repetições. Foram utilizados 62 marcadores SSR para análise de ligação após verificar o polimorfismo entre os genitores. Foi verificada uma alta herdabilidade para a característica avaliada e encontrado sete QTLs na população utilizada, com proporção da variação fenotípica entre 14,26 e 22,14% entre os ambientes. Os QTLs tiveram efeitos aditivos negativos, significando que o alelo de resistência originou-se do parental resistente, quando utilizadas notas menores para resistência. Alguns QTLs encontrados foram coincidentes entre ambientes.

Clements, Dudley e White (2000) avaliaram a presença de genes de resistência quantitativa utilizando os parentais FR1141(suscetível) e 061(resistente), a primeira geração do retrocruzamento com o parental suscetível, marcadores RFLP e diferentes épocas de avaliação. Cinco QTLs consistentes encontrados nos cromossomos 1, 2, 5 e 7 foram significativamente associados com a cercosporiose nos ambientes. O QTL encontrado no cromossomo 1 foi o que apresentou a maior parte da variação fenotípica (23%) e as cinco regiões encontradas foram associadas com efeitos aditivos e juntas representaram 58,7% da variação fenotípica. Os autores ainda verificaram na avaliação tardia, a possibilidade de existência de regiões que podem estar associadas com maturidade e senescência precoces das plantas. Segundo o autor, a senescência precoce das plantas relacionada aos QTLs pode afetar os efeitos benéficos associados com QTLs identificados na avaliação inicial.

Asea et al. (2009) avaliaram a resistência para patógenos foliares utilizando os genitores CML202 (linhagem suscetível) e VP31 (linhagem resistente), marcadores SSRs e famílias $F_{2,3}$ e $F_{3,4}$. Foi encontrado e validado um QTL no Bin 4.08 associado aos marcadores umc1086 e umc1559, o qual reduziu significativamente a severidade da doença.

Pelo exposto, pode-se observar que a resistência a cercosporiose em milho é controlada por diversos genes com diferentes proporções da variação fenotípica, cuja identificação dos mesmos é de grande interesse, por constituir uma importante estratégia em programas de melhoramento genético.

2.6 Identificação de QTLs associados à produção de grãos

Ajmone-Marsan et al. (1995) mapearam 4 QTLs para produção, que explicaram 24,5% da variação fenotípica do caráter. O QTL de maior efeito foi localizado entre 0 cM e 55 cM no cromossomo 6. Este trabalho foi novamente realizado utilizando-se outra amostra da mesma população, confirmando as posições de 2 dos 4 QTLs previamente mapeados para produção de grãos, um deles correspondendo ao QTL de grande efeito localizado no cromossomo 6, sendo ainda mapeado mais 1 QTL não reportado anteriormente (AJMONE-MARSAN et al., 2001).

Austin e Lee (1996) realizaram o mapeamento de marcas individuais para a detecção de QTL associados à produção de grãos e aos componentes ligados a produção. Foram detectados ao todo 63 QTLs, sendo 6 deles para produção de grãos, explicando 21,8% da variação fenotípica. Empregando o mapeamento por intervalo, Veldboom e Lee (1994) mapearam QTLs para produção de grãos e seus componentes. Apenas 1 QTL foi detectado para produção de grãos, situado a aproximadamente 114 cM no cromossomo 6, que explicou 35% da variação fenotípica.

Ajmone-Marsan et al. (2001) identificaram 4 e 5 QTLs para produção de grãos em duas populações, explicando respectivamente 27,2% e 30,1% da variação fenotípica dos quais, para esta última, 11,9%, foram referentes a apenas um QTL, localizado no intervalo entre 20 e 40 cM no cromossomo 6. Stuber et al. (1992) mapearam QTLs para produção de grãos e prolificidade, utilizando mapeamento por intervalo em duas populações. Para produção de grãos foram mapeados 6 QTLs e 8 QTLs, explicando respectivamente 60,9% e 59,1% da variação fenotípica do caráter nas populações utilizadas.

Bento (2006), empregando o mapeamento por intervalo composto expandido para múltiplos ambientes (mCIM), encontrou 24 QTLs para produção de grãos com grau médio de dominância parcial e com proporção da variação fenotípica de 53,8%. O autor relata a instabilidade dos QTLs nos ambientes avaliados como desafio adicional para a seleção assistida por marcadores em áreas de clima tropical.

Em pesquisa realizada por Barrios (2010), utilizando o mapeamento por intervalo composto modificado para múltiplos ambientes, foram encontrados 49 QTLs nos diferentes ambientes avaliados, demonstrando a grande quantidade de genes presentes no controle do caráter. Não foram encontrados QTL coincidentes entre os grupos de ambientes, a variância fenotípica explicada pelos QTLs foi baixa (menor que 5%), demonstrando a predominância de QTL com efeitos de baixa magnitude e a proporção total da variância fenotípica foi de 19,58%. Foi encontrado ao menos um QTL em quase todos os dez cromossomos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Material genético

Os genótipos utilizados pertencem ao programa de melhoramento de milho da empresa GENESEEDS - Recursos Genéticos Ltda. Foram utilizadas duas linhagens contrastantes quanto à reação para cercosporiose, a linhagem GNS30 (resistente) e a linhagem GNS31 (suscetível), obtidas a partir da mesma população formada por linhagens derivadas dos germoplasmas Cateto e Caribbean. Ambas possuem grãos duros, porte baixo e ciclo semitardio.

3.2 Multiplicação das sementes e obtenção da geração F₂

Foi conduzido um campo para a multiplicação de sementes das linhagens e gerar as sementes da população F₂. Na época do florescimento, as espigas de plantas F₁ foram protegidas com sacos plásticos antes da emissão do estilo-estigma para evitar cruzamentos indesejáveis e posteriormente foram realizadas as autofecundações. A geração F₂ foi fenotipada quanto à reação à doença e a produção de grãos mensurada a partir de espigas individuais e posteriormente foi genotipada com a utilização dos marcadores que apresentaram polimorfismo entre os genitores.

3.3 Avaliação da doença

Para a avaliação da severidade da doença, foi conduzido um experimento com delineamento em blocos com 20 plantas de cada genitor e do híbrido F_1 e 240 plantas da geração F_2 , com três repetições. As plantas foram dispostas em linhas de 4 m e espaçamento entre linhas de 0,8 m. Foram utilizadas linhas de bordadura com genótipo suscetível a fim de aumentar a incidência do patógeno. A avaliação visual da área foliar afetada pela doença foi realizada aos 95 dias após a emergência por meio de escala diagramática da Agrocerec (1996), (Figura 2), variando de 1 a 9, sendo 1 = 0% (altamente resistente); 2 = 0,5% (resistente); 3 > 0,6% e $\leq 10\%$ (resistente); 4 >11% e $\leq 30\%$ (medianamente resistente); 5 >31% e $\leq 50\%$ (medianamente suscetível); 6 >51% e $\leq 70\%$ (medianamente suscetível); 7 >71% e $\leq 80\%$ (suscetível); 8 >81% e $\leq 90\%$ (suscetível); 9 >91% (altamente suscetível).

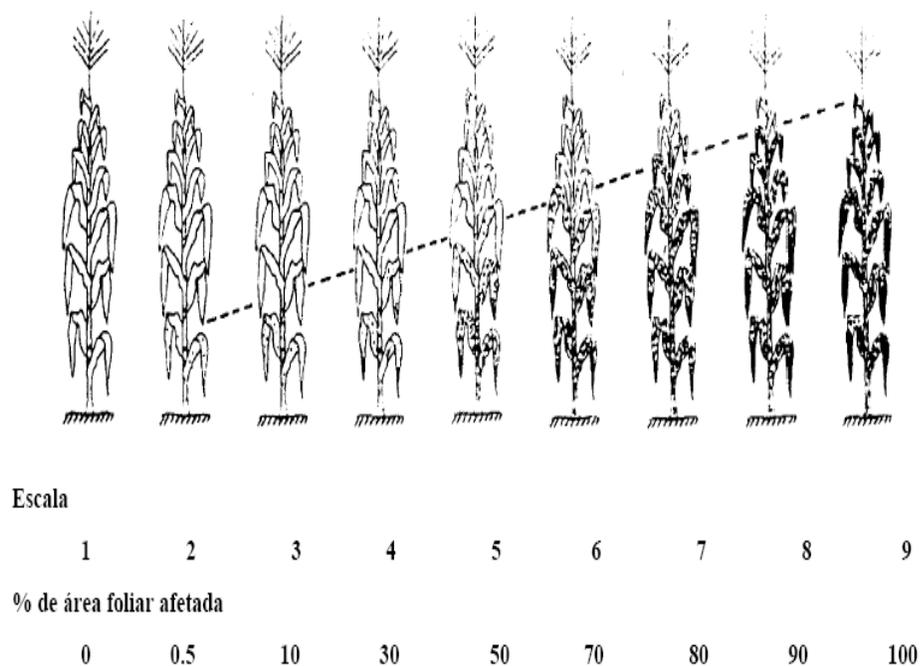


Figura 2 Escala diagramática para a avaliação das doenças foliares do milho proposta pela Agroceres (1996)

3.4 Avaliação da produção de grãos

Para a determinação da produção de grãos foi realizada a colheita e debulha manual das espigas por planta individual. Os grãos foram pesados e posteriormente o teor de água foi determinado. Os dados foram corrigidos para um valor de 13% de teor de água e expressos em gramas/planta.

3.5 Análises dos dados e estimativas dos parâmetros genéticos

Os dados fenotípicos de severidade da cercosporiose e de produção de grãos da geração F_2 foram agrupados em classes com suas respectivas

frequências e visualizados em um histograma construído pelo procedimento Proc capability do programa SAS 9.0 (SAS INSTITUTE, 2009). Foram acrescentados ao histograma os valores de média, desvio padrão e o número de plantas. Foi realizada a verificação da normalidade dos dados fenotípicos da geração F₂ por meio do procedimento Proc univariate do programa SAS 9.0 (SAS INSTITUTE, 2009).

Foi realizada a análise de variância dos dados fenotípicos da severidade da doença e produção de grãos utilizando o procedimento Proc glm do programa SAS 9.0 (SAS INSTITUTE, 2009). Foi considerado o número de plantas dentro de cada geração como tratamento, sendo que para os parentais e seu híbrido F₁ foram utilizadas 20 plantas e para geração F₂ 240 plantas por bloco. Foram realizados os contrastes entre os parentais, entre os parentais e seu híbrido F₁ e entre parentais e a geração F₂, sendo considerados significativos ao nível de (P<0,05).

A partir dos valores da variância dos dados de severidade da doença e produção de grãos foram estimados os componentes da variância. Considerou-se que a variância observada nos parentais e seu híbrido F₁ é apenas de origem ambiental (σ^2_E), ou seja, $\sigma^2_{P1} + \sigma^2_{P2} + \sigma^2_{F1}/3 = \sigma^2_E$, e que a variância da geração F₂ contém, além da variância ambiental, as variâncias genéticas (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008).

A herdabilidade foi calculada em função das variâncias genética e fenotípica, segundo as fórmulas:

$$\sigma_F^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$$

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_F^2}$$

Em que:

σ_F^2 : estimativa da variância fenotípica da geração F₂;

σ^2_G : estimativa da variância genética ;

h^2 : estimativa da herdabilidade.

3.6 Análises moleculares

3.6.1 Extração do DNA

Amostras de folhas das linhagens genitoras, das plantas F_1 e das progênes F_2 foram maceradas em N_2 líquido até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, foram adicionados a 100 mg do tecido verde, 700 μ L do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM de EDTA pH 8,0; 5M NaCl) com adição de 2% de β -mercaptoetanol e incubado a 65 °C por 45 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 600 μ L mL⁻¹ de mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), invertendo as amostras gentilmente por 5 minutos para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado, e novamente adicionou-se clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo-se as mesmas condições até a centrifugação a 14.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante, sendo adicionado isopropanol gelado na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. O DNA foi precipitado e lavado com 100 μ L de etanol 70%. Após o precipitado ser secado, foi diluído com 50 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) com 2 μ L de RNase (10mg mL⁻¹), mantendo-se a temperatura de 37 °C por 1 hora. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro GE Nanovue.

3.6.2 Marcadores microssatélites

Inicialmente os marcadores foram utilizados para verificar o polimorfismo entre as linhagens genitoras. Para esse estudo, foram utilizados 94 pares de primer SSR (Quadro 1). Alguns destes foram consultados em trabalhos anteriormente realizados com o caráter resistência a cercosporiose (ASEA et al., 2009; GORDON, 2003; JINES, 2004; POZAR et al., 2009) e pares de primers aleatórios já utilizados em trabalhos com a cultura do milho foram acrescentados.

Quadro 1 Relação dos pares primer utilizados para seleção de polimorfismo entre genitores

Nº	Primer	Nº	Primer	Nº	Primer	Nº	Primer
1	bmc 1025	26	bnlg 1520	51	umc 1033	76	phi 55
2	bnlg 1233	27	umc 1015	52	umc 1008	77	phi 70
3	bnlg 147	28	umc 1021	53	umc 1053	78	phi 56
4	bnlg 1258	29	umc 1036	54	bnlg 5899	79	phi 112
5	umc 1117	30	umc 1037	55	umc 1056	80	phi 059
6	umc 1360	31	umc 1055	56	bnlg 669	81	phi 0115
7	umc 1555	32	umc 1058	57	bnlg 125	82	phi 006
8	bmc 1811	33	umc 1063	58	umc 1010	83	phi 003
9	bmc 1605	34	umc 1065	59	bnlg 109	84	phi 082
10	umc 2082	35	umc 1512	60	bnlg 166	85	phi 019
11	umc 1071	36	umc 1546	61	bnlg 278	86	phi 116
12	umc 1042	37	umc 1577	62	bnlg 381	87	phi 197
13	umc 2077	38	umc 1255	63	mmc 0241	88	phi 071
14	umc 2148	39	umc 1341	64	bnlg 238	89	phi 055
15	umc 1559	40	bnlg 1006	65	bnlg 520	90	phi 087
16	bmc 1305	41	bnlg 2291	66	mmc 041	91	phi 096
17	bmc 1047	42	bnlg 1031	67	bnlg 420	92	phi 031
18	bnlg 1265	43	bnlg 1884	68	mmc 312	93	phi 035
19	bnlg 1621	44	umc 1610	69	mmc 321	94	phi 033
20	umc 1551	45	umc 1016	70	mmc 071		

“continua”

Quadro 1 “conclusão”

Nº	Primer	Nº	Primer	Nº	Primer	Nº	Primer
21	bnlg 1175	46	bnlg 1325	71	mmc0132		
22	umc 1230	47	bnlg 128	72	phi 072		
23	umc 1834	48	umc 1171	73	phi 097		
24	umc 1086	49	umc 1545	74	phi 074		
25	bmc 1714	50	umc 1054	75	phi 011		

As informações a respeito da sequência de bases e tipo de classe dos pares de primers foram obtidas no Maize Genetics and Genomics Database.

As reações de PCR consistiram de 20 ng de DNA, 0,5 µM de cada primer, 100 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e 1 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 25 µL. As ampliações utilizadas no momento de verificação do polimorfismo entre os genitores foram realizadas de acordo com a programação: uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, seguida por onze ciclos de 94 °C por 20 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 20 segundos, com a redução da temperatura de anelamento de 1 °C a cada ciclo até atingir 55 °C, seguidos por mais 20 ciclos com a temperatura de anelamento e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos. No momento da genotipagem com os marcadores polimórficos entre os genitores, as temperaturas de anelamento foram àquelas indicadas pelo fabricante e após a fase de desnaturação foi utilizado um touchdown mais reduzido.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 120 V por 2 horas. Para a revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a eletroforese, as placas foram separadas e o gel foi imerso em 1 litro de solução fixadora (etanol 10% ácido acético 0,5%) e mantido sob lenta agitação por 15 minutos. Em seguida, o gel foi submerso em 1 litro de solução de nitrato de prata (AgNO₃) (0,2%) sob agitação lenta por 15 minutos. O gel, então, foi lavado com água corrente e

mantido sob agitação lenta em solução de revelação (NaOH 3%, formaldeído 0,5%) até a completa visualização das bandas.

Após a avaliação inicial de polimorfismo entre os genitores, os primers polimórficos foram utilizados para genotipagem de 93 indivíduos da população F₂, sendo estes selecionados de acordo com a qualidade do DNA.

3.7 Detecção de QTL

A associação dos marcadores moleculares ao QTL foi realizada por meio de análises de marcas individuais utilizando as metodologias de regressão linear simples, regressão linear múltipla com seleção das variáveis regressoras pelo processo de stepwise e análise por meio da máxima verossimilhança.

3.7.1 Regressão Linear com marcas individuais

Foi realizada a regressão dos valores da característica quantitativa em função dos escores relativos ao genótipo do gene marcador. Para realizar a regressão linear dos dados de severidade da doença e produção de grãos de indivíduos da geração F₂ por marcador, o seguinte modelo foi usado:

$$Y_j = \beta_0 + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j} + e_j$$

em que:

Y_j: valor da característica avaliada no j-ésimo indivíduo da população F₂;

X_j: código do marcador (MM=2, Mm=1, mm=0);

X_{1j}: código do marcador para o efeito aditivo;

X_{2j}: código do marcador para o efeito dominante;
β₀: intercepto da regressão (média da característica);
β₁: inclinação da reta para o efeito aditivo;
β₂: inclinação da reta para o efeito dominante;
e_j: erro aleatório manifestado no j-ésimo indivíduo.

Os dados moleculares e as notas de severidade da doença e os valores da produção de grãos foram associados por meio do modelo de regressão linear simples, empregando o procedimento Proc reg do programa SAS 9.0 (SAS INSTITUTE, 2009). As associações foram consideradas significativas a um nível de probabilidade de $P < 0,05$ e o coeficiente de determinação (R_F^2) foi interpretado como a estimativa da proporção da variância fenotípica explicada por cada marcador.

A frequência de recombinação foi estimada em função do número médio de indivíduos por genótipo (K) e do valor do teste de F para cada marcador. A partir das estimativas dos efeitos aditivo e dominante do loco marcador (β_1, β_2) e da frequência de recombinação (r) foram calculadas as estimativas dos efeitos aditivos e dominante para o loco QTL, segundo as fórmulas de Schuster e Cruz (2008):

$$r^2 - r + \frac{k}{4(k + F)} = 0$$

Em que:

- r: frequência de recombinação
- k: número médio de indivíduos por genótipo
- F: valor calculado pelo teste de F

$$a = \frac{\hat{\beta}_1}{1 - 2r} \quad \text{e} \quad d = \frac{\hat{\beta}_2}{(1 - 2r)^2}$$

Em que:

a: efeito aditivo do loco QTL;

d: efeito de dominância do loco QTL;

β_1 : efeito aditivo do loco marcador;

β_2 : efeito de dominância do loco marcador;

r: frequência de recombinação.

3.7.2 Regressão linear múltipla

Foi realizada uma análise de regressão múltipla envolvendo todos os marcadores polimórficos entre os genitores, utilizando o comando Proc reg do programa SAS 9.0 (SAS INSTITUTE, 2009). Na análise foram considerados os marcadores como variáveis independentes e cada característica fenotípica como variável dependente. Os marcadores de maior importância para a eficiência do modelo foram selecionados observando a significância do teste de F parcial ($P < 0,05$) e a porcentagem de variação explicada por eles foi estimada pelo coeficiente de determinação parcial.

O processo de seleção de variáveis regressoras Stepwise (DRAPER; SMITH, 1981) foi aplicado para obter uma melhor estimativa dos valores genotípicos dos QTL e da porcentagem da variação fenotípica bem como eliminar marcas de efeito marginal.

No processo de Stepwise, inicialmente coloca-se no modelo de regressão, somente o marcador com maior valor de F parcial que tenha sido significativo. Em seguida, testa-se o marcador, dentre os candidatos a entrar no

modelo, que possui o valor mais alto de F parcial na presença do primeiro marcador. Dentre os marcadores do modelo recém formado, aqueles que apresentarem teste F não significativo são retirados do modelo e os que apresentam teste de F significativo são mantidos. Esses testes são efetuados um por um, a cada passo. O processo continua até que todos os marcadores candidatos a entrar no modelo sejam testados e até que todos os marcadores do modelo tenham F parcial significativo.

3.7.3 Análise por meio da máxima verossimilhança

A associação dos marcadores com os QTLs por meio da máxima verossimilhança foi realizada utilizando o procedimento Proc iml do programa SAS 9.0 (SAS INSTITUTE, 2009). Para este método os valores de produção de grãos foram expressos em kg/planta. Os valores de média, efeitos aditivo e de dominância, variância, frequência de recombinação foram estimados por processos iterativos considerando a maximização de uma função de verossimilhança por meio do algoritmo EM. Para isso, utilizou-se um modelo de mistura condicional à segregação conjunta da marca e de um suposto QTL, dada sua frequência de recombinação.

Este método é baseado no princípio da iteração e o algoritmo foi executado em etapas. Primeiro foi atribuído um valor inicial (arbitrário) de frequência de recombinação de 0,1 (r_0) e obtido valores iniciais das médias de cada genótipo marcador e da variância que permitiram estabelecer estimativas das probabilidades (etapa esperança) de cada fenótipo apresentar os possíveis genótipos do QTL. Nessa etapa foram feitas inferências de probabilidades dos genótipos de QTL condicionais aos marcadores, já que os genótipos dos QTLs não são observáveis. Com estes resultados estimados, foram encontrados valores

dos parâmetros que produzem a máxima verossimilhança e/ou até os valores convergirem para as equações de máxima verossimilhança (etapa maximização).

O teste estatístico utilizado para verificar se há associação entre um marcador e um QTL, foi a razão de verossimilhança (LR) seguindo uma distribuição de qui-quadrado. Neste teste verificaram-se os valores encontrados para a razão entre as hipóteses H_1 (presença de QTL) e H_0 (hipótese de nulidade), em que, os parâmetros são estimados assumindo a ausência do QTL. Ou seja, $H_0: \mu_{MM} = \mu_{Mm} = \mu_{mm}$ com a e $d=0$ ou $r=0,5$. Segundo a expressão:

$$LR = -2 \ln \left[\frac{L(r = 0,5)}{L(\mu_1, \mu_2, \mu_3, \sigma^2, r; y_i)} \right]$$

Em que:

LR: razão de verossimilhança;

μ_1 : média fenotípica referente ao genótipo homocigoto dominante;

μ_2 : média fenotípica referente ao genótipo heterocigoto;

μ_3 : média fenotípica referente ao genótipo homocigoto recesivo;

σ^2 : variância residual

r : frequência de recombinação

y_i : vetor com valor fenotípico dos indivíduos.

No entanto, após o uso do modelo de mistura, construiu-se uma distribuição empírica H_0 por meio de permutações para realizar a inferência estatística da significância do(s) efeito(s) do suposto QTL. Foram utilizadas 3000 permutações (N) para reconstruir (simular) a distribuição da variável LR e determinar o valor crítico ($\alpha=0.05$), que permite declarar a existência de um QTL associado ao marcador (CHURCHILL; DEORGE, 1994). Neste teste os valores máximos da razão de verossimilhança são armazenados e ao final de N

análises, estes são ordenados por ordem de magnitude permitindo estimar o valor crítico para cada teste por marcador, ou seja um valor crítico pontual (SCHUSTER; CRUZ, 2008).

A ação gênica de cada QTL detectado foi determinada por meio das estimativas do grau de dominância e classificadas segundo o critério proposto por Stuber, Edwards e Wendell (1987): aditivo (A) = 0 a 0,20; dominância parcial (DP) = 0,21 a 0,80; dominância completa (DC) = 0,81 a 1,20 e sobredominância (SD) > 1,20.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação fenotípica dos dados

A distribuição dos indivíduos da população F_2 de acordo com os valores da severidade da doença, avaliada segundo escala Agroceres (1996), está apresentada na Figura 3.

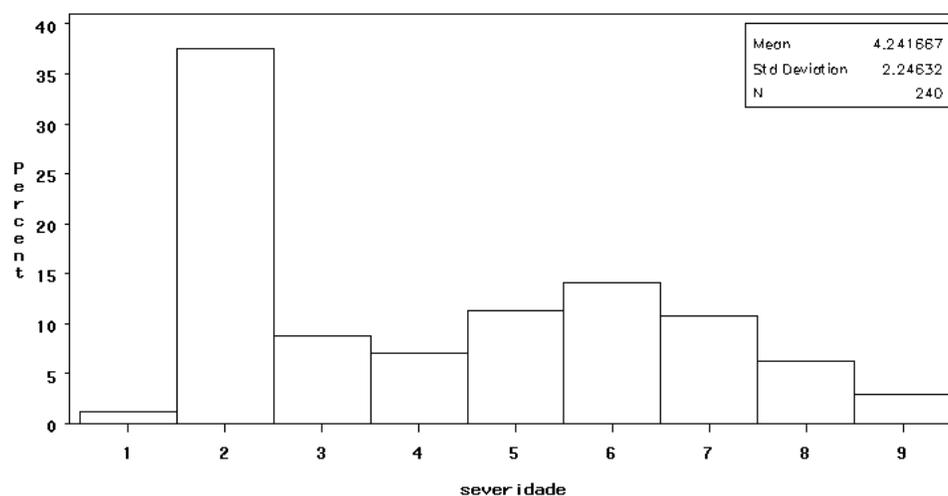


Figura 3 Distribuição da população F_2 oriunda da combinação híbrida 30/31. Valores de média, desvio padrão e número de plantas (N)

Foi observada maior concentração dos dados fenotípicos nas classes extremas com um maior número de indivíduos na classe considerada resistente à cercosporiose com notas 2 e 3 da escala de avaliação. Essa distribuição dos dados da severidade da doença foi verificada como não normal com baixa probabilidade do teste de Shapiro-Wilk no valor de 0,001. Na Figura 4, encontra-se a distribuição dos indivíduos da população F_2 de acordo com os valores de produção de grãos por planta. Observa-se grande número de classes fenotípicas e que a distribuição se aproxima da distribuição normal devido ao grande número de genes envolvidos no controle do caráter, como foi observado

por Barrios (2010). Porém segundo o teste de Shapiro-Wilk, essa distribuição também foi verificada como não normal, com valor da probabilidade de 0,0057.

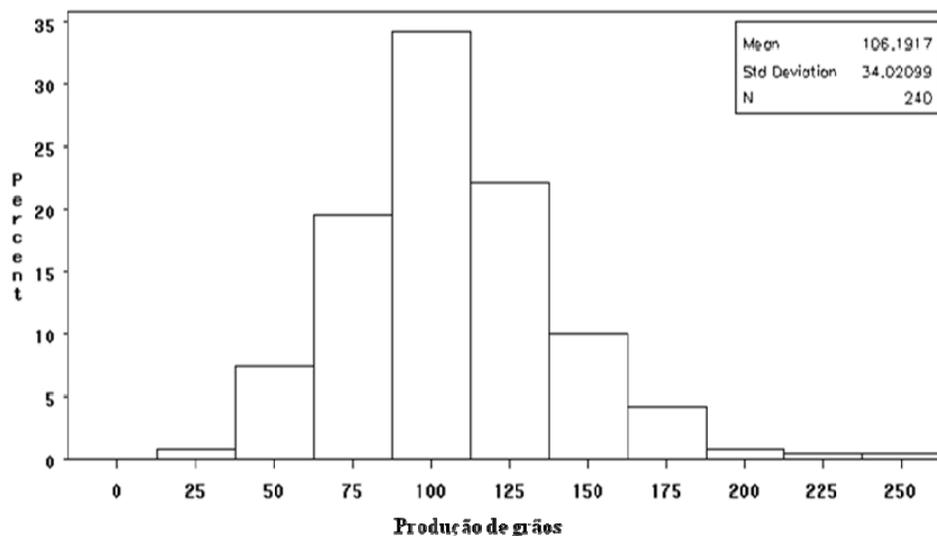


Figura 4 Distribuição da população F_2 oriunda da combinação híbrida 30/31. Valores de média, desvio padrão e número de plantas

Segundo Bradshaw et al. (1998), a utilização de dados não normais, juntamente com o uso de uma população F_2 com número reduzido de indivíduos, pode limitar a habilidade de identificar e estimar corretamente a magnitude dos efeitos de QTL. Dados fenotípicos com uma distribuição não normal podem subestimar o número e superestimar o efeito de QTLs identificados, uma vez que muitos métodos de análise de QTL assumem que a distribuição dos dados fenotípicos é normal.

Os resultados da análise de variância dos dados fenotípicos considerando as gerações envolvidas no trabalho estão na Tabela 1. O coeficiente de variação encontrado para severidade da doença está acima, porém similar aos valores observados por Juliatti et al. (2009). Já para produção de grãos o valor encontrado foi abaixo dos valores encontrado por Barrios (2010).

Para ambos os caracteres foi observada diferença altamente significativa nos contrastes avaliados. O contraste entre parentais utilizados mostra a possibilidade de serem utilizados em um cruzamento controlado para a formação da geração segregante F_2 avaliada no estudo de identificação de QTLs. Os outros contrastes mostram que existe diferença significativa entre parentais utilizados no cruzamento controlado e seu híbrido F_1 e entre parentais com as progênies F_2 .

Tabela 1 Resumo da análise de variância para severidade da cercosporiose e produção de grãos. UFLA, Lavras, MG, 2011

FV	GL	QM	
		Severidade	Produção
Blocos	2	6,93*	42,67
Gerações	3	311,43*	118444,9*
Tratamento (Gerações)	296	12,69*	2856,3*
P_1 vs P_2	1	143,27*	182426,03*
P_s vs F_1	180,3*	180,3*	148965,05*
P_s vs F_2	477,19*	477,19*	245274,9*
Erro	1,44	1,44	54,34
Médias	4,11	4,11	105,2
CV(%)	29,15	29,15	9,0

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Após o desdobramento dos tratamentos (número de plantas) dentro de cada geração foi observado diferença altamente significativa para as progênies F_2 em ambos os caracteres avaliados, indicando presença de variabilidade genética para ser estudada na identificação de alelos associados à resistência a cercosporiose e produção de grãos (Tabela 2).

Tabela 2 Resumo do desdobramento do tratamento dentro de cada geração para severidade da cercosporiose e produção de grãos. UFLA, Lavras, MG, 2011

Geração	GL	QM	
		Severidade	Produção
P_1	19	1,92	52,7
P_2	19	2,31	167,7*
F_1	19	1,15	528,4*
F_2	239	15,15*	3472,3*

* Significativo ($P < 0,05$)

4.2 Estimativa de parâmetros genéticos

Os valores encontrados para a média e variância dos dados de cada geração para as características avaliadas estão na Tabela 3.

Tabela 3 Médias e variâncias da severidade da cercosporiose e da produção de grãos nas gerações avaliadas. UFLA, Lavras, MG, 2011

Gerações*	μ Cercospora	Variância	μ Produção	Variância
P ₁	1,52	0,108	84,1	112,36
P ₂	8,15	0,167	62,6	176,22
F ₁	4,07	0,152	163,6	528,9
F ₂	4,77	0,761	106,5	1177,3

* P₁- GNS30, P₂ – GNS31; μ : média

Estes resultados sugerem que a interação alélica aditiva é predominante no controle da resistência a cercosporiose, uma vez que as médias das gerações F₁ e F₂ estão próximas ao ponto médio dos parentais. Neste tipo de interação os efeitos dos alelos são somados para formar o fenótipo (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2008). Em relação aos dados de produção de grãos, foram observados valores diferentes nas médias das gerações F₁ e F₂ e um valor médio de F₁ superior ao dos encontrados nos genitores, evidenciando algum tipo de interação dominante.

Os valores de variância encontrados para severidade da doença foram 0,142 de variância ambiental e 0,619 de variância genética. Para produção de grãos foi encontrado 272,48 e 904,8 para variância genética e fenotípica. A alta estimativa da herdabilidade para a severidade da cercosporiose (81,3%) está dentro dos valores encontrados em pesquisas anteriores (CLEMENTS; DUDLEY; WHITE, 2000; FREPPON; PRATT; LIPPS, 1996). O valor da herdabilidade encontrado para produção de grãos (76%) está abaixo de valores observados por Barrios (2010) e Bento (2006). Segundo Silva e Vencovsky

(2002), por meio de simulação de diferentes metodologias de detecção de QTL, o poder de detecção do teste pode ser aumentado quando a característica em questão possui valores de herdabilidade mais elevados.

Os altos valores de herdabilidade e a importância do efeito gênico aditivo no controle do caráter são favoráveis ao melhoramento para características controladas por um elevado número de genes. O benefício máximo da seleção assistida por marcadores de QTL seria aquela praticada sob condições de alta h^2 juntamente quando a característica de interesse é de difícil mensuração (DUDLEY, 1993).

4.3 Polimorfismo entre genitores e análise de composição dos primers

Dos 94 pares de primers utilizados na pesquisa, 23 foram polimórficos entre os genitores (Quadro 2), 53 não apresentaram polimorfismo e 18 pares não tiveram definição após a revelação dos produtos de amplificação (Figura 5).

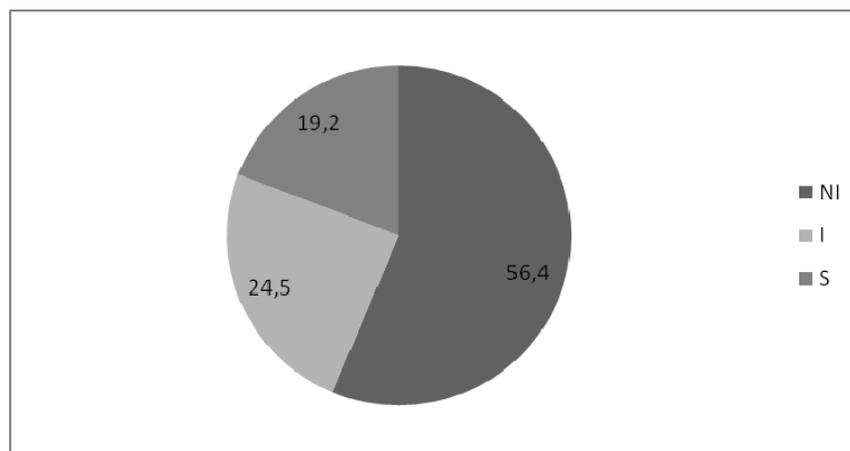


Figura 5 Porcentagem de pares de primer não informativos (NI), informativos ou polimórficos (I) e sem definição (S).

Quadro 2 Pares de primers polimórficos entre os parentais L30 e L31

Nº	Primers	Nº	Primers	Nº	Primers	Nº	Primers
1	bmc 1714	8	umc 1042	15	bnlg 1006	22	bnlg 278
2	bnlg 1258	9	bnlg 1265	16	mmc 041	23	bnlg 381
3	umc 1117	10	bnlg 1621	17	mmc 0241		
4	phi 074	11	umc 1086	18	umc 1033		
5	phi 006	12	bnlg 1520	19	umc 1056		
6	umc 2082	13	umc 1037	20	bnlg 1250		
7	umc 1071	14	umc 1058	21	umc 1016		

Na Figura 6 são apresentados exemplos de padrão de bandas dos genitores e do híbrido F₁ para marcadores polimórficos. Para alguns destes, foi observado padrão de bandas invertidos quanto às amostras dos genitores, além de apresentarem quantidades distintas de pares de bases. O fato pode estar relacionado com o alto polimorfismo encontrado para os marcadores microssatélites em milho (BORÉM; CAIXETA, 2009).

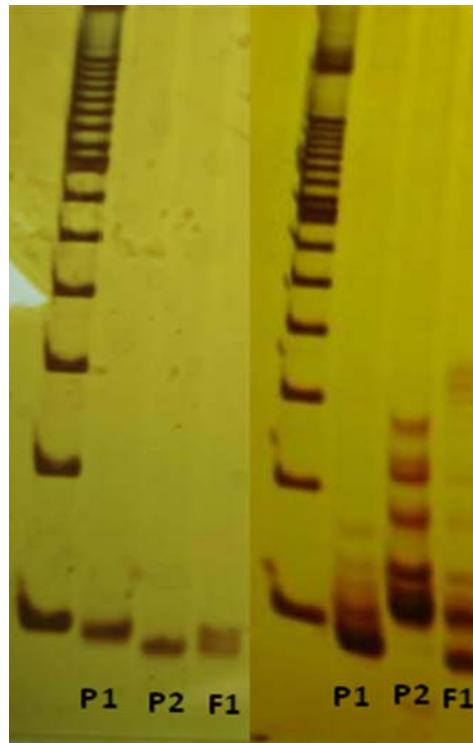


Figura 6 Eletroforese dos produtos da reação para os genitores (P_1 – resistente e P_2 – suscetível) e F_1 , utilizando padrão de 1000 pb.

Foi também realizada a análise da composição dos pares de primer polimórficos quanto ao tipo de repetição dos nucleotídeos. Dos 23 pares polimórficos, para sete pares não foram encontradas informações a respeito, treze são formados por dinucleotídeos, sendo a maioria composta pelo dinucleotídeo (AG). As repetições de dinucleotídeos constituem a classe mais freqüente e polimórfica de microssatélites (CHIN et al., 1996).

Em geral os elementos repetidos mais comumente encontrados são (AT) $_n$, seguidos por (AG) $_n$, além dos motivos (ATA) $_n$, (AAC) $_n$, (AGC) $_n$, (AAG) $_n$, (AATT) $_n$ (AAAT) $_n$ e (ACTC) $_n$ (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998).

Na Figura 7 está ilustrado um exemplo da genotipagem de alguns indivíduos da geração F_2 e posterior codificação com valores 0, 1 e 2 para os

genótipos homozigoto recessivo, heterozigoto e homozigoto dominante, de acordo com os padrões de bandas observados nos genitores. Este código dos genótipos foi utilizado para formação das matrizes no método dos quadrados mínimos dentro das análises de regressão e para separação dos fenótipos dos indivíduos F₂ baseados nos genótipos dos marcadores para iniciar a análise de máxima verossimilhança.

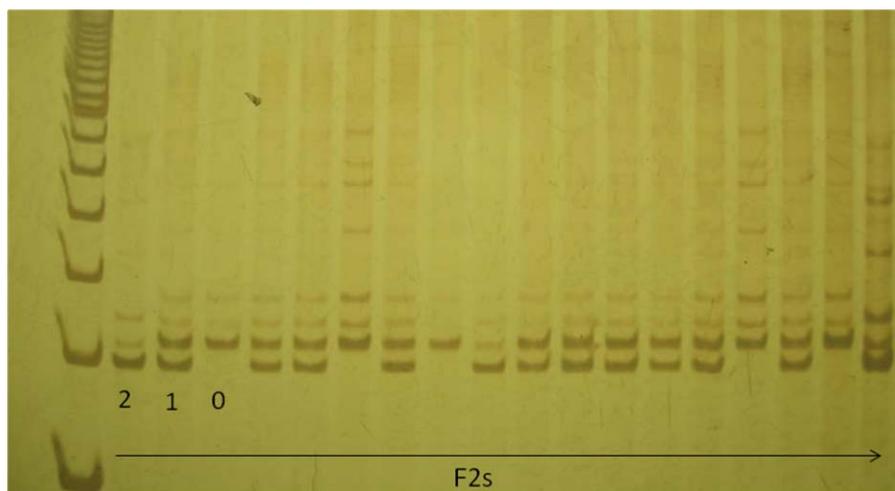


Figura 7 Genotipagem de indivíduos F₂ utilizando primer bnlg1265 e padrão de 1000 pb.

4.4 Detecção de QTL

4.4.1 Regressão Linear por marcas individuais

Por meio da análise de regressão linear, dos 23 marcadores polimórficos entre os genitores, apenas cinco mostraram-se associados a QTLs que possivelmente estão relacionados ao controle da resistência à cercosporiose, considerando um $p < 0,05$. Os resumos das análises de variância dos marcadores não associados estão no anexo A.

Na Tabela 4 são apresentados os marcadores associados a um QTL, sua posição conhecida nos cromossomos (baseada no banco de dados), o valor do teste de F com sua respectiva probabilidade, valor de R^2 (proporção fenotípica explicada pelo QTL) e o valor da frequência de recombinação do loco QTL em relação ao loco marcador.

Tabela 4 Relação de marcadores de microssatélites associados à resistência a cercosporiose, sua posição no genoma, valor do teste de F, variância residual, proporção explicada pelo marcador e frequência de recombinação obtida na análise de regressão linear simples. UFLA, Lavras, MG, 2011

<i>Marcador</i>	<i>Posição</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>	<i>Var.</i>	<i>R²(%)</i>	<i>FR</i>
umc 1117	4.04	6,41	0,0025	4,19	12,5	0,29
umc 2082	4.03	9,5	0,0002	3,96	17,4	0,25
bnlg 1265	4.05	5,57	0,0052	4,26	11,02	0,27
bnlg 1520	2.09	2,95	0,054	4,50	6,15	0,35
bnlg 1250	10.05	3,79	0,026	4,41	7,7	0,35

Var.: variância ou erro residual

Verificou-se que o marcador umc2082 apresentou maior significância de associação a um QTL e maior explicação da variância fenotípica em relação às outras marcas. Considerando a análise por marcas individuais, pode-se supor que o fato pode ter ocorrido devido ao marcador estar mais próximo do QTL de resistência, o que é verificado pela distância ou frequência de recombinação. Como a variação da característica quantitativa é explicada pelo marcador em função de sua ligação com o QTL, quanto maior for a intensidade de ligação, maior será a variância entre os genótipos dos marcadores (BERNARDO, 2002).

Os valores de R^2 para cada QTL associado ao marcador estão entre os valores relatados na literatura e dentro dos valores encontrados para caracteres quantitativos. Porém, no método de detecção utilizado, além do QTL que está sendo marcado, outros QTLs podem ocorrer próximos e afetar as médias dos genótipos, superestimando o efeito do QTL. Desta forma, um bloco gênico estaria sendo marcado e não apenas um único QTL. Em conjunto, os QTLs

explicaram 54,7% da variação fenotípica. Ressalta-se que no cromossomo 4 existe uma grande chance de se localizar um QTL por mapeamento por intervalo.

Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisas anteriores, como no trabalho de Clements, Dudley e White (2000) que observaram 5 QTLs explicando 58.7% da variação e no trabalho de Gordon (2003), o qual observou QTLs também nos cromossomos 2 e 4 explicando 54% da variação fenotípica.

As estimativas dos efeitos aditivos e de dominância do loco QTL foram calculadas a partir das estimativas de β_1 , β_2 (estimativas dos efeitos quantificado por intermédio do marcador) e da frequência de recombinação para cada marcador (Tabela 5). Foi verificada a predominância dos efeitos gênicos aditivos na resistência à cercosporiose em milho, como observado nos trabalhos de Bubeck et al. (1993), Clements, Dudley e White (2000), Gordon, Lipps e Pratt (2006), Juliatti et al. (2009) e Saghai-Marooft et al. (1993). Estes efeitos atuam no sentido de reduzir a severidade da doença (sinal negativo de a). Somente o QTL associado ao marcador bnlg1250 apresentou efeito de dominância positivo, ou seja, no sentido de aumentar a doença. Ressalta-se que a partir das estimativas dos efeitos aditivo e dominante do loco marcador (β_1 , β_2) e da frequência de recombinação (r) foram calculadas as estimativas dos efeitos aditivos e dominante para o loco QTL, segundo as fórmulas de Schuster e Cruz (2008).

O sinal negativo do efeito aditivo significativo também indica que o loco de resistência tem a contribuição do parental resistente L30, já que este efeito representa um contraste entre as médias dos genótipos dominante e recessivo a partir de notas inferiores atribuídas aos indivíduos mais resistentes.

Considerando o grau de dominância ($d/[a]$) dos QTLs detectados, observa-se ação gênica de dominância parcial para os QTLs associado aos marcadores umc1117 e umc2082 e de sobredominância para o restante,

resultados coincidentes com os observados em trabalhos anteriores que mostram o controle genético da resistência a cercosporiose controlado por diferentes tipos de ação gênica (BRITO, 2009; COATES; WHITE, 1998; THOMPSON et al., 1987; ULRICH; HAWK; CARROLL, 1990).

Tabela 5 Frequência de recombinação, estimativas do efeito aditivo e de dominância do loco marcador (β_1 , β_2) e do loco QTL (a , d) associados à resistência a cercosporiose em milho, por meio de regressão linear simples. UFLA, Lavras, MG, 2011

<i>Marcador</i>	<i>FR</i>	β_1	β_2	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d/a</i>	<i>Ação^e</i>
umc 1117	0,293	-1,129	-0,162	-2,72*	-0,945	0,35	DP
umc 2082	0,257	-1,444	-0,454	-2,97*	-1,924	0,65	DP
bnlg 1265	0,270	-1,001	0,595	-2,18*	2,8	1,28	SD
bnlg 1520	0,352	-0,657	0,505	-2,22*	5,3	2,56	SD
bnlg 1250	0,348	-0,412	0,971	-1,35	10,5*	7,7	SD

* significativo a 5% de probabilidade.

e tipo de ação gênica: AD – aditivo, DP – dominância parcial, SD – sobredominância.

Em pesquisas anteriores foram identificados QTLs de resistência a doença em todos os dez cromossomos do milho (BUBECK et al., 1993; CLEMENTS; DUDLEY; WHITE, 2000; GORDON, 2003; JULIATTI et al., 2009; LEHMENSIEK et al., 2001; POZAR et al., 2009; SAGHAI-MAROOF et al., 1993). Na presente pesquisa foram encontrados QTL nos cromossomos 2, 4 e 10, sendo que pela metodologia da análise de regressão linear simples existe a possibilidade de alguns destes marcadores estarem associados a um mesmo QTL. Porém não se tem uma localização precisa dos marcadores e do loco QTL bem como sua direção no mapa genético.

Para a característica produção de grãos, foram encontrados três possíveis QTL associados com os marcadores polimórficos entre os genitores, apresentando valores da probabilidade do teste de F abaixo de 0,05 (Tabela 6). Os resumos das análises de variância dos marcadores não associados estão no anexo B.

Foram encontrados QTLs nos cromossomos 2 e 4 com valores relativamente altos da proporção da variância fenotípica. Barrios (2010), por meio do mapeamento por intervalo composto, encontrou QTLs estáveis entre ambientes nestes mesmos cromossomos com valores de R^2 entre 0,96 e 4,87%. Este autor encontrou 9 QTLs nos três grupos de ambientes avaliados com valor total de R^2 de 19,58%, comparando com um valor total de 23,5% encontrado por meio da regressão linear por marcador e em um único ambiente avaliado.

Tabela 6 Relação de marcadores de microssatélites associados à produção de grãos, sua posição no genoma, valor do teste de F, variância residual, proporção explicada pelo marcador e frequência de recombinação obtida na análise de regressão linear simples

<i>Marcador</i>	<i>Posição</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>	<i>Var.</i>	<i>R²(%)</i>	<i>FR</i>
umc2082	4.03	3,33	0,048	1314	6,5	0,35
umc1058	4.11	4,39	0,015	1285	8,8	0,31
umc1042	2.07	4,09	0,019	1290	8,3	0,32

Var.: variância ou erro residual

Em relação ao grau de dominância foi verificada apenas ação gênica de sobredominância (Tabela 7), sendo este tipo de efeito anteriormente relatado em pesquisas de mapeamento e identificação de QTL para produção de grãos (BARRIOS, 2010; LIMA et al., 2006; STUBER et al., 1992).

Tabela 7 Frequência de recombinação e estimativas dos efeitos aditivos e dominante do loco marcador (β_1 , β_2) e do loco QTL (a, d) associados a produção de grãos, por meio de regressão linear simples

<i>Marcador</i>	<i>FR</i>	β_1	β_2	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d/a</i>	<i>Ação^e</i>
umc2082	0,35	-1,44	-0,45	-2,97*	-1,93	0,66	DP
umc1058	0,32	10,8	14,55	30,68	117,5*	4,48	SD
umc1042	0,33	-0,71	14,6	-2,08	124,96*	60,08	SD

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de t
e: tipo de ação gênica: SD – sobredominância

Os altos valores encontrados do efeito de dominância e o tipo de ação gênica de sobredominância podem ter sido afetados por fatores de grande

influência na seleção assistida por meio de marcadores de QTL, como a interação destes com o ambiente e o uso de populações pequenas que geram problemas na estimativa dos parâmetros (BERNARDO, 2002). Além de que em populações F_2 com alto desequilíbrio de ligação, QTLs com sobredominância devem ser considerados com cautela, pois podem ser na realidade QTLs ligados em fase de repulsão que apresentam um efeito total equivalente ao de sobredominância (LU; ROMERO-SERVERSON; BERNARDO, 2003).

Foi encontrado um marcador associado tanto a um QTL de resistência à cercosporiose quanto a um QTL de produção de grãos. Verificou-se que o marcador umc2082 está associado a um QTL com efeito de redução da severidade da doença com ação gênica de dominância parcial, mas com redução da produção devido a um pequeno efeito aditivo. Com as metodologias de análise de ligação utilizadas não seria possível saber a respeito da direção em que se encontra o QTL em relação ao marcador, necessitando da utilização de metodologias de mapeamento mais precisas na localização dos marcadores e dos QTL associados, além da necessidade de utilizar um mapeamento para múltiplos caracteres a fim de inferir sobre a existência de pleiotropia ou QTL ligados. Já os marcadores umc1058 e umc1042 apresentaram efeitos de dominância significativos no sentido de aumentar a produção de grãos.

4.4.2 Regressão linear múltipla

Pela análise de regressão múltipla para a resistência a doença foram identificados seis marcadores SSR ligados a QTL que participam do controle genético da característica (Tabela 8). Cinco deles, ligados aos marcadores umc2082, umc1117, umc1058, bnlg1250 e bmc1714, tendem a reduzir (sinal negativo da estimativa do parâmetro) a severidade da doença devido a um efeito

aditivo significativo e um QTL que tende a aumentar (sinal positivo) devido a um efeito de dominância presente no modelo.

Tabela 8 Resumo da análise de regressão múltipla para resistência a cercosporiose utilizando o processo de Stepwise para a seleção dos marcadores

<i>Marcador</i>	<i>Estimativas (a,d)</i>	<i>R² parcial</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Teste de F*</i>
intercepto	3,86		0,242	253,8
umc2082	-1,30 a	0,164	0,283	21,3
umc1117	-0,756 a	0,086	0,266	8,03
umc1058	-0,819 a	0,068	0,266	9,47
bnlg1250	0,953 d	0,043	0,355	7,21
bmc1714	-0,916 a	0,032	0,282	10,59
bnlg1520	-0,785 a	0,049	0,284	7,62

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

a, d: tipo de efeito atribuído ao QTL ligado aos marcadores

Em relação à análise de regressão linear por marcador, este método de detecção retirou um marcador e foram acrescentados dois no controle genético da característica. O QTL associado ao marcador umc2082 também apresentou maior valor da estimativa e maior R^2 parcial, como foi verificado na regressão linear por marcador. Os valores de R^2 encontrados pela regressão linear múltipla explicaram um total de 44,2% da variação fenotípica e apresentaram maior amplitude (3,15 – 16,4%) quando comparado aos encontrados na regressão linear simples. Maiores amplitudes em relação aos valores de R^2 foram verificados por Juliatti et al. (2009), os quais verificaram valores de 0,2 e 14,7%.

Por meio das estimativas dos parâmetros foi possível verificar que os QTLs com sinal negativo do efeito aditivo, foram provenientes do genitor resistente L30, já que o efeito aditivo representa um contraste entre as médias dos homozigotos dominantes e recessivos, indicando a direção do alelo favorável. Os QTL ligados que participam do controle genético para resistência à doença, estão nos cromossomos 2, 4, 9 e 10.

Em ambas as metodologias de regressão foi identificado o marcador bnlgl1520 ligado a um QTL de resistência a doença. Este QTL também foi verificado por Gordon (2003) em duas gerações e diferentes ambientes avaliados, utilizando uma análise de marcas individuais por ANAVA, porém com maiores valores da variação da expressão fenotípica.

Por meio deste método de detecção de QTLs, foram encontrados dois QTLs ligados a produção de grãos, ambos contribuindo para o aumento da produção com efeitos de dominância (Tabela 9). O QTL associado ao marcador umc1042 apresentou maior valor da estimativa do valor genotípico e maior proporção da variação fenotípica. Em conjunto, os QTLs explicaram 13,6% da variação fenotípica, valor próximo ao encontrado quando se utilizou a regressão linear simples para verificar a associação e efeito dos marcadores a QTL.

Os QTL que participam do controle genético dessa característica estão localizados nos cromossomos 2 e 4.

Tabela 9 Resumo da análise de regressão múltipla para produção de grãos utilizando o processo de Stepwise para a seleção dos marcadores

<i>Marcador</i>	<i>Estimativas (a,d)</i>	<i>R²parcial</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Teste de F*</i>
intercepto	87,56		6,58	173
umc1042	21,48 d	0,082	7,23	8,3
umc1058	17,05 d	0,054	7,28	5,49

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

d: tipo de efeito atribuído ao QTL ligado aos marcadores

Utilizando diferentes tipos de análise de regressão, foram encontrados resultados coincidentes dos marcadores associados a QTLs, efeitos genéticos semelhantes para a resistência a doença, porém com valores mais baixos na regressão múltipla. Em relação à produção de grãos observaram-se efeitos distintos e superiores quando realizada a análise por meio da regressão simples. Estes valores podem estar superestimados pela metodologia utilizada para calcular os efeitos do QTL baseados nos efeitos do loco marcador. A análise de

regressão linear múltipla apresenta de forma mais rápida e precisa os marcadores associados a QTLs presentes no controle genético da característica bem como o tipo de seus efeitos presentes no modelo final.

Segundo Silva e Vencovsky (2002), o procedimento baseado em regressão múltipla é mais poderoso em identificar as marcas associadas à QTL, do que os procedimentos baseados em testes individuais, como a regressão linear simples, principalmente quando se avaliam características de baixa herdabilidade e com um pequeno número de indivíduos. Segundo os autores o poder do teste está relacionado com a probabilidade de rejeitar uma hipótese H_0 . Comparando os dois tipos de regressões observam-se maiores valores de F calculado para cada marcador, devido a menor variância residual quando utilizado a regressão múltipla. Como exemplo, para a resistência a doença, o marcador umc1117 apresentou um valor de Fc de 9,5 por meio da regressão linear por marcador e um valor de 21,3 na regressão múltipla.

4.4.3 Análise por meio da máxima verossimilhança

Por meio do método da máxima verossimilhança, dos 23 marcadores polimórficos entre os genitores, verificou-se uma associação significativa de três destes com QTLs que controlam a resistência a cercosporiose. Nas análises com esses marcadores foram verificados valores de máxima verossimilhança (LR) acima do valor crítico fixado na distribuição de H_0 considerando um α de 5%, rejeitando a hipótese de efeito nulo. Os valores de a e/ou d (efeitos aditivo e de dominância) foram diferentes de zero, o que pôde ser verificado por meio de análise gráfica (Figura 8).

Quanto maior o número de permutações, maior a precisão do valor crítico usado para verificar a associação entre marcador e QTL. Deorge e Rebai (1996), testando diversos níveis de significância, concluíram que para o nível de

10 e 5% de probabilidade são necessárias 1000 permutações. Na presente pesquisa foram utilizadas 3000 permutações, o que pode reduzir os valores do desvio padrão e tornar a análise mais precisa.

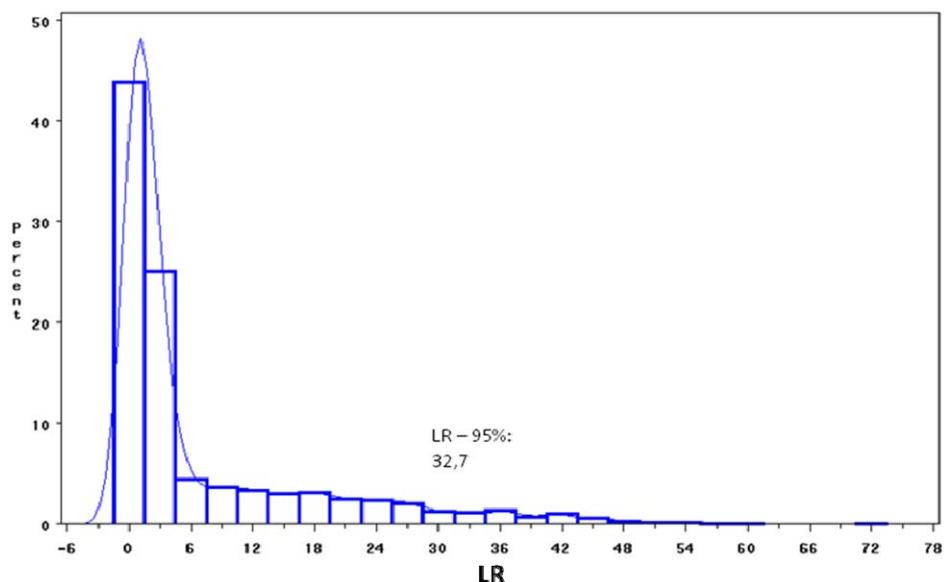


Figura 8 Distribuição empírica de H_0 , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc1117

As análises gráficas da significância de máxima verossimilhança (LR) para severidade da doença utilizando os outros marcadores associados estão anexas nas Figuras 1C e 2C.

Na Tabela 10 são apresentados os marcadores associados com QTLs que controlam a resistência da cercosporiose com os valores dos parâmetros estimados.

Tabela 10 Relação dos marcadores de microssatélites associados à resistência a cercosporiose e as informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), grau de dominância (d/a), variância, porcentagem de recombinação (r), razão de máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade

<i>Marcador</i>	<i>média</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d/a</i>	<i>ação^e</i>	<i>Var.</i>	<i>r</i>	<i>LR</i>	<i>Ho crítico</i>
umc1117	4.52	-2,13*	-1,7	0,78	DP	0,93	0.36	47,86	32,7
umc2082	4.54	-2,16*	-1,69	0,79	DP	0,89	0.31	52,25	41,7
umc1058	4.67	-1,91*	-1,75	0,92	DC	1,59	0.42	30,9	30,1

*significativo a 5% de probabilidade

e:tipo de ação gênica: DP: dominância parcial, DC: dominância completa

Estes parâmetros foram obtidos após a estacionaridade do Algoritmo EM, como pode ser observado na Figura 9.

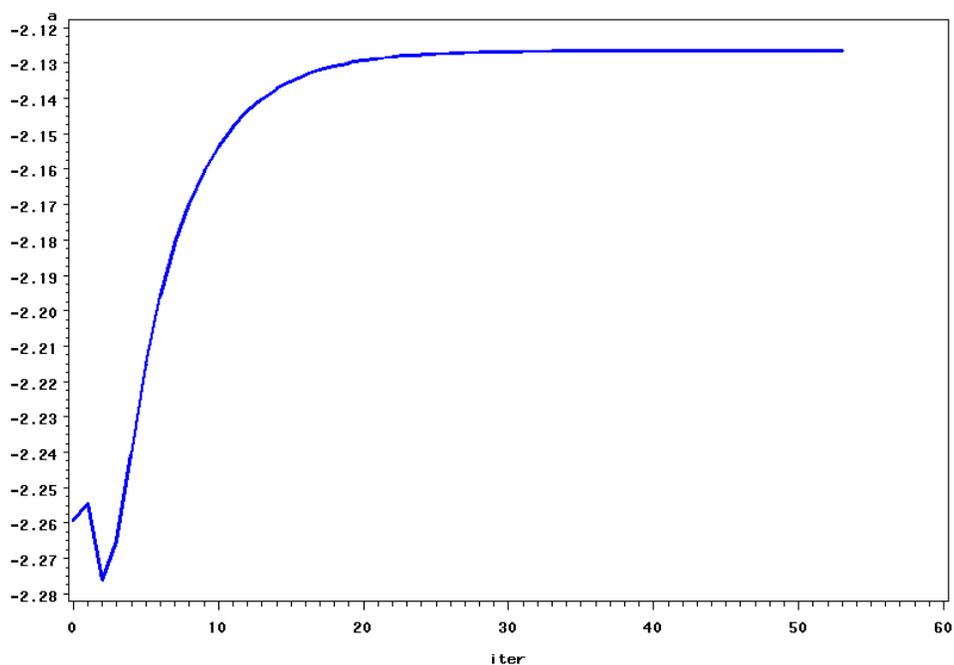


Figura 9 Estacionaridade do algoritmo EM considerando efeito aditivo (a) no controle da severidade da doença utilizando o marcador umc1117

As estimativas dos parâmetros dos marcadores não associados a QTL de resistência a cercosporiose estão na Tabela 1D do anexo D. Observa-se que para os QTLs associados às marcas foram observados valores de média de severidade da doença semelhantes e intermediários aos valores encontrados nas gerações F_1 e F_2 . Para os QTL encontrados, existe a predominância dos efeitos aditivos e estes atuam no sentido de reduzir a doença (sinal negativo da estimativa de a), com maior redução do QTL associado ao marcador umc2082. O sinal negativo dos valores do efeito aditivo também indica que para estes locos encontrados o alelo favorável foi originado do parental resistente. A predominância dos efeitos aditivos foi observada na maioria dos trabalhos relacionados com o controle da resistência a cercosporiose em milho. No trabalho realizado por Clements, Dudley e White (2000), no qual foram encontrados 5 QTLs consistentes nos ambientes com efeitos aditivo nos cromossomos 1, 2, 5 e 7.

Em relação ao tipo de ação gênica, foi observada dominância parcial para os QTLs associados aos marcadores umc1117 e umc2082, resultados também observados na análise de regressão linear e dominância completa para o QTL associado ao marcador umc1058.

Como verificado nas outras metodologias utilizadas, verificou-se que os marcadores umc1117 e umc2082 foram significativamente associados a QTL de controle da resistência à doença. Jines (2004) encontrou estes marcadores associados a um QTL de resistência a cercosporiose utilizando o mapeamento por intervalo composto, o que mostra que no presente trabalho, estes marcadores podem estar associados ao mesmo QTL. O marcador umc1058 mostrou-se associado a um QTL de resistência tanto quando utilizado a análise por meio de regressão linear múltipla quanto na análise por meio da máxima verossimilhança.

Para a produção de grãos, dos 23 marcadores polimórficos entre os genitores, verificaram-se dois destes associados significativamente a QTLs

presentes no controle genético do caráter. As análises com esses marcadores apresentaram valores de máxima verossimilhança (LR) acima do valor crítico fixado na distribuição de H_0 considerando um α de 5%, rejeitando, dessa forma, a hipótese de efeito nulo o que pôde ser verificado por meio de análise gráfica (Figura 10), após o teste com 3000 permutações.

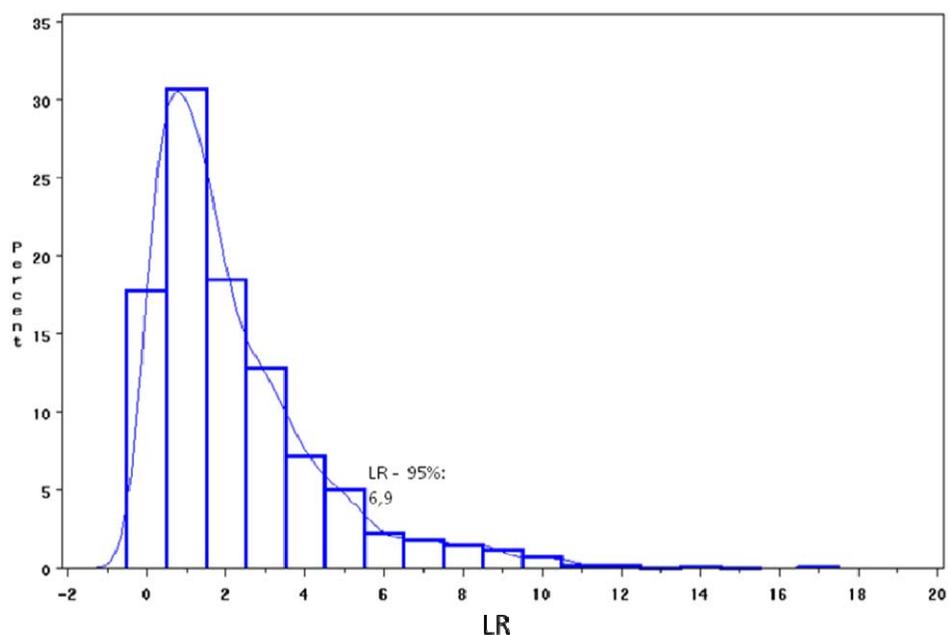


Figura 10 Distribuição empírica de H_0 , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc1042

A análise gráfica da significância de máxima verossimilhança (LR) para produção de grãos utilizando o marcador 1058 está na Figura 3C do anexo C.

Na Tabela 11 são apresentados os marcadores associados a QTLs que controlam a produção de grãos e seus respectivos valores dos parâmetros estimados.

Tabela 11 Relação dos marcadores microssatélites associados à produção de grãos e as informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), variância, porcentagem de recombinação (r), razão da máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade a partir de valores expressos em kg/planta

<i>Marcador</i>	<i>média</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>d/a</i>	<i>ação^e</i>	<i>Var.</i>	<i>r</i>	<i>LR</i>	<i>Prob.</i>
umc1042	0,096	-0,0007	0,022*	31,43	SD	0,001230	0,0007	8,10	6,9
umc1058	0,098	0,0108	0,017*	1,57	SD	0,001223	0,00013	8,66	6,21

*significativo a 5% de probabilidade

e:tipo de ação gênica:SD:sobredominância

Var.: variância

Estes parâmetros foram obtidos após a estacionaridade do Algoritmo EM, como pode ser observado Figura 11.

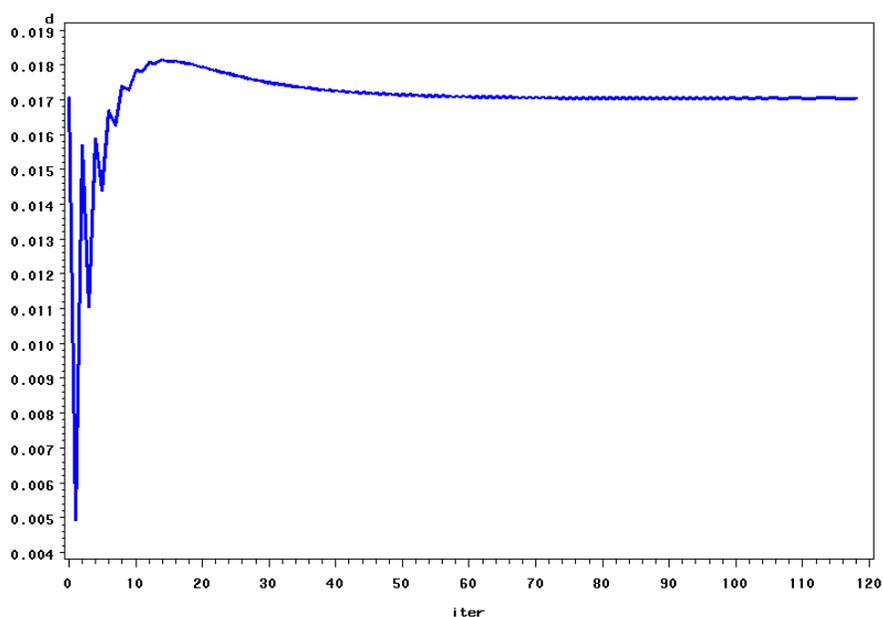


Figura 11 Estacionaridade do algoritmo EM considerando efeito de dominância (d) no controle da produção de grãos utilizando o marcador umc1058

As estimativas dos parâmetros dos marcadores não associados a QTL de produção de grãos estão na Tabela 2D do anexo D.

Ambos os QTLs apresentaram pequeno valor de frequência de recombinação, sendo situados bem próximos aos marcadores. Houve predominância dos efeitos de dominância que foram significativos e atuaram no sentido de aumentar a produção de grãos de milho, com maior efeito genético verificado no QTL associado ao marcador umc1042. Estes mesmos marcadores também foram identificados na análise de regressão múltipla. O marcador umc1058 está associado a um QTL com efeito de redução da severidade da doença com efeito aditivo significativo e com aumento da produção devido a um efeito de dominância significativo. Porém os QTLs encontrados para os diferentes caracteres possuem valores de frequência de recombinação bastante distintos.

Em relação ao tipo de ação gênica, foi observada sobredominância para os QTLs associados aos marcadores umc1042 e umc1058, resultados também observados na análise de regressão linear e em pesquisas anteriores como Barrios (2010) que encontrou QTLs ligados um grau médio de dominância indicando sobredominância.

Apesar de haver concordância quanto aos marcadores ligados a QTLs presentes no controle genético dos caracteres avaliados, bem como na semelhança dos valores de alguns parâmetros como os efeitos genéticos, foi observado diferença quanto ao número de marcas ligadas a QTL para resistência a cercosporiose na análise por meio da máxima verossimilhança. O resultado pode estar relacionado ao fato de que este método considera as probabilidades de cada fenótipo apresentar os possíveis genótipos do QTL em questão. Este procedimento é realizado na análise de máxima verossimilhança por meio de um processo iterativo dentro do algoritmo EM, quando realizada as inferências das probabilidades condicionais para os genótipos do QTL.

A precisão na detecção de associação entre um QTL e a marca tem como um dos principais fatores a frequência de recombinação (BORÉM; CAIXETA, 2009). A análise por meio da máxima verossimilhança pode ser considerada mais precisa já que este parâmetro é obtido por meio de um processo iterativo até que seja encontrado um valor máximo estável, como pode ser observado pela Figura 12. Esta informação a priori, foi inserida na função de verossimilhança (LR), assim a probabilidade de associação entre marca e QTL é condicional à frequência de recombinação.

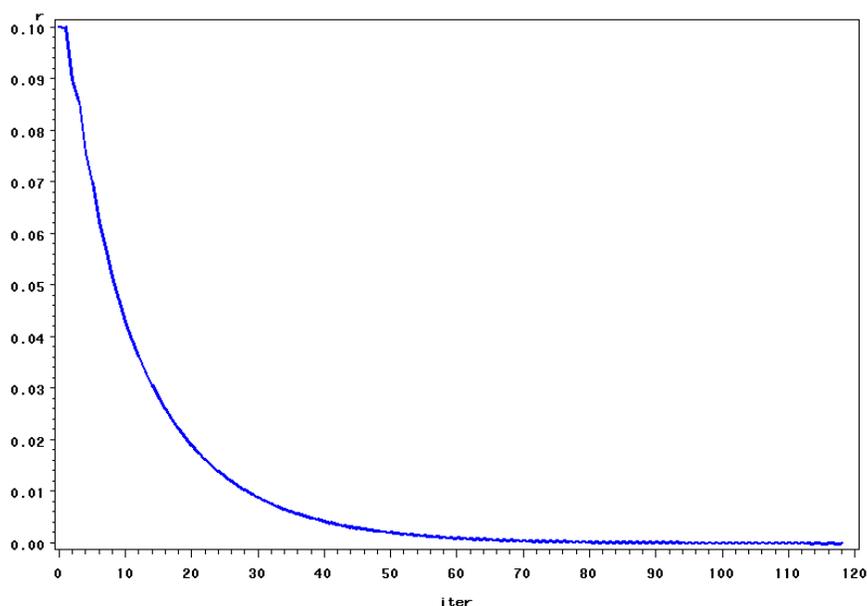


Figura 12 Estacionaridade do algoritmo EM considerando frequência de recombinação no controle da produção de grãos utilizando o marcador umc1058

Diferentemente da análise por meio da máxima verossimilhança, na análise por meio da regressão linear por marcador estima-se este parâmetro em função do número médio de indivíduos por genótipo (K) e do valor do teste de F para cada marcador. Ainda pôde ser observado, que na análise por meio da

máxima verossimilhança, a variância residual na qual a hipótese H_0 é testada, foi menor que os valores observados na regressão linear por marcador, aumentando o poder de detecção do teste.

Porém, mesmo com uma análise mais precisa por meio da máxima verossimilhança não seria possível afirmar a direção do QTL em relação à marca associada (direita ou esquerda no cromossomo), necessitando assim ser realizado um estudo com maior número de marcadores a fim de realizar um mapeamento genético e obter a localização mais precisa dos marcadores dentro dos grupos de ligação.

A identificação de alelos de efeitos menores por meio do uso de marcadores moleculares pode ser somada a detecção de alelos de maior efeito por meio de avaliação fenotípica, aumentando a eficiência do processo seletivo e aumentando os ganhos com a seleção ao se utilizar a informação molecular associada com a informação fenotípica.

No presente trabalho, a alta herdabilidade estimada para os caracteres avaliados contra a variação fenotípica explicada pelos marcadores moleculares sugere que a seleção assistida por marcadores (SAM) não deva ser tão eficiente quanto à seleção fenotípica. Entretanto, o uso da SAM pode ser uma alternativa viável para os melhoristas, uma vez que a avaliação fenotípica é demorada, trabalhosa e pode apresentar um alto custo.

Na SAM procura-se aumentar a frequência gênica de marcadores que estejam ligados a genes ou bloco de genes responsáveis por características de interesse, utilizando-se da seleção de indivíduos portadores destes alelos. Por meio dela é possível aumentar a intensidade de seleção, reduzir o intervalo de gerações aumentando a eficiência de avaliação.

Além disso, o mapeamento e a identificação de QTL podem contribuir significativamente para aumentar os conhecimentos sobre regiões cromossômicas específicas que afetam a expressão da característica alvo e

aumentar as informações sobre a magnitude e a contribuição dos efeitos gênicos, as quais são determinantes para o sucesso do programa de melhoramento genético.

5 CONCLUSÕES

Foram identificados marcadores moleculares ligados a QTL associados ao controle da resistência à cercosporiose e com a produção de grãos em milho por meio da regressão linear simples, regressão linear múltipla e por meio da análise da máxima verossimilhança.

O tipo de efeito predominante para o controle da resistência a cercosporiose foi o aditivo e para o controle genético da produção de grãos foi o de dominância.

Os marcadores promissores para serem usados em estudos de seleção assistida são umc2082 e umc1117 para resistência a cercosporiose e o umc1042 e umc1058 para a produção de grãos.

REFERÊNCIAS

AGROCERES. **Guia Agrocere de sanidade**. São Paulo, 1996. 72 p.

AJMONE-MARSAN, P. et al. Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different testers and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 2/3, p. 230-243, Feb. 2001.

_____. In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation for grain yield. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 3/4, p. 415-424, 1995.

ALVES, E. O. **Comportamento de genótipos de milho, em relação às ferrugens polysora e tropical, em diferentes ambientes**. 2004. 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

ASEA, G. et al. Validation of consensus quantitative trait loci associated with resistance to multiple foliar pathogens of maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 5, p. 540-545, May 2009.

AUSTIN, D. F.; LEE, M. Comparative mapping in F2:3 and F6:7 generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 7, p. 817-826, May 1996.

BARRIOS, S. C. L. **Interação QTL por ambientes para a produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical**. 2010. 89 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.

BEEK, K. van der; ARENDONK, J. A. M. van; GROEN, A. F. Power or two and three generation QTL, mapping experiments in a outbred population containing full-sib or half-sib families. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 6/7, p. 1115-1124, 1995.

BENTO, D. A. V. **Mapeamento de QTL para produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical**. 2006. 162 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Minnesota: Stema, 2002. 369 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 529 p.

BRADSHAW, J. R. et al. Quantitative trait loci affecting differences in floral morphology between two species of monkeyflower (*Mimulus*). **Genetics**, Bethesda, v. 149, p. 367-382, May 1998.

BRITO, A. H. **Controle químico e genético de doenças foliares e grãos ardidos em milho**. 2009. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BRITO, A. H. et al. Efeito da cercosporiose no rendimento de híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 279-285, dez. 2007.

BRUNELLI, K. R. **Cercospora Zeae-maydis: esporulação, diversidade morfo-genética e reação de linhagens de milho**. 2004. 118 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

BUBECK, D. M. et al. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 4, p. 838-847, July/Aug. 1993.

CHIN, E. C. L. et al. Maize simple repetitive DNA sequences abundance and allelic variation. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 6, p. 866-873, June 1996.

CHUPP, C. **A monograph of the Fungus Genus Cercospora**. New York: The Ronald, 1953. 667 p.

CHURCHILL, G. A.; DEORGE, R. W. Empirical threshold for quantitative trait mapping. **Genetics**, Austin, v. 138, n. 3, p. 963-971, Nov. 1994.

CLEMENTS, M. J.; DUDLEY, J. W.; WHITE, D. G. Quantitative trait loci associated with resistance to gray leaf spot of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 9, p. 1018-1025, 2000.

COATES, S. T.; WHITE, D. G. Sources of resistance to gray leaf spot of corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 12, p. 1153-1155, Dec. 1994.

DEORGE, R. W.; REBAI, A. Significance threshold for QTL interval mapping tests. **Heredity**, Washington, v. 76, n. 3, p. 459-464, June 1996.

DONAHUE, P. J.; STROMBERG, E. L.; MYERS, S. L. Inheritance of reaction gray leaf spot in a diallel cross of 14 maize inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 4, p. 926-931, July/Aug. 1991.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: J. Wiley, 1981. 709 p.

DUDLEY, J. W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 4, p. 660-668, 1993.

DUNKLE, L. D.; CARSON, M. L. Genetic variation in *Cercospora* and the potential impact on selecting for resistance to gray leaf spot of corn. In: ANNUAL CORN E SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 53., 1998, Chicago. **Proceedings...** Chicago: American Seed Trade Association, 1998. p. 30-35.

DUNKLE, L. D.; LEVY, M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zae-maydis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 486-490, May 2000.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow: Longman, 1996. 464 p.

FANTIN, G. M. et al. **A mancha de cercospora do milho**. Campinas: IAC, 2001. 19 p. (Boletim Técnico, 192).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FREPPON, J. T.; LIPPS, P. E.; PRATT, R. C. Characterization of the chlorotic lesion response by maize to *Cercospora zae-maydis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 10, p. 945-949, Oct. 1994.

FREPPON, J. T.; PRATT, R. C.; LIPPS, P. E. Chlorotic lesion response of maize to *Cercospora zae-maydis* and its effect on gray leaf spot disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 7, p. 733-738, July 1996.

GORDON, S. G. **Genetic mapping and components of resistance to cercospora zae-maydis in maize**. 2003. 123 p. Thesis (Ph.D. in Philosophy) - University of Wooster, Wooster, 2003.

GORDON, S. G.; LIPPS, P. E.; PRATT, R. C. Heritability and components of resistance to *cercospora zae-maydis* derived from maize inbred VO613Y. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 593-598, June 2006.

GUPTA, P. K. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, Columbus, v. 70, n. 1, p. 45-54, Apr. 1996.

HOLLAND, J. B. Implementation of molecular markers for quantitative traits in breeding programs-challenges and opportunities. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 4., 2004, Brisbane. **Proceedings...** Brisbane: ICS, 2004. 1 CD-ROM.

JINES, M. P. **Identification of quantitative trait loci for gray leaf spot resistance, maturity, and grain yield in a semi-tropical recombinant inbred population of maize**. 2004. 165 p. Dissertation (Master in Crop Science) - University of North Carolina, Raleigh, 2004.

JULIATTI, F. C.; BRANDÃO, A. M. **Cercosporiose em milho (*Cercospora zae-maydis* Tehon & Daniels) afeta plantios de milho no cerrado brasileiro**. Uberlândia: ICIAG-UFU, 2000. 45 p.

JULIATTI, F. C. et al. Genetic mapping for resistance to gray leaf spot in maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 169, n. 2, p. 227-238, 2009.

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

LANZA, M. B.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LATTERELL, F. M.; ROSSI, A. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 842-847, Aug. 1983.

LEHMENSIEK, A. et al. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, n. 3, p. 797-803, Mar. 2001.

LIMA, M. D. A. et al. Mapping QTL for grain yield and plant traits in a tropical maize population. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 17, n. 3, p. 227-239, Apr. 2006.

LIPPS, P. E. **Gray leaf spot: a global threat to corn production**. Ohio: ASP Net, Plant Pathology, 1998. Disponível em:
<<http://www.apsnet.org/online/feature/grayleaf/top.html>>. Acesso em: 1 jul. 2005.

LOPES, M. T. G. et al. Controle genético da resistência a mancha de *Phaeosphaeria* em milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 605-611, maio/jun. 2007.

LU, H.; ROMERO-SEVERSON, J.; BERNARDO, R. Genetics basis of heterosis explored by simple sequence repeat markers in a random-mated maize population. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 107, n. 3, p. 494-502, Aug. 2003.

MAIZE GENETICS AND GENOMICS DATABASE. **Data of maize**. Disponível em: <<http://www.maizegdb.org/>>. Acesso em: 1 jul. 2011.

MARROF, M. A. S. et al. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to gray resistance to gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 4, p. 539-546, Sept. 1996.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, London, v. 30, n. 2, p. 194-200, Jan. 2002.

NUTTER, F. W.; JENCO, J. H. Development of critical-point yield loss models to estimate yield losses in corn caused by *Cercospora zae-maydis*. (Abstr.). **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 9, p. 994-998, Sept. 1992.

PAUL, P. A.; MUNKVOLD, G. P. Influence of temperature and relative humidity on sporulation of *Cercospora zae-maydis* and expansion of gray leaf spot lesions on maize leaves. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 6, p. 624-630, 2005.

PINTO, L. R. et al. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 20, p. 16-19, maio/jun. 2001.

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

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2008. 464 p.

SAGHAI-MAROOF, M. A. et al. Gray leaf spot disease of maize: rating methodology and inbred line evaluation. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 6, p. 583-587, June 1993.

SANTOS, J. B. **Melhoramento de plantas visando resistência a doenças**. Lavras: UFLA, 2008. 139 p.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica: aplicada a população derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa, MG: UFV, 2008. 568 p.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn disease**. Urbana: American Phytopathological Society, 1980. 105 p.

SILVA, H. D. **Aspectos biométricos na detecção de QTLs (“Quantitative Trait Loci”) em espécies cultivadas**. 2001. 166 f. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2001.

SILVA, H. D.; VENCOVSKY, R. Poder de detecção de “quantitative trait loci”, da análise de marcas simples e da regressão linear múltipla. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 755-762, out./dez. 2002.

SOUZA, P. P. **Evolução da cercosporiose e da mancha branca do milho e quantificação de perdas, em diferentes genótipos com controle químico**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **User’s guide statistical**. Version 9.1. Cary, 2009. 1 CD-ROM.

STUBER, C. W. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. **Plants**, London, v. 11, n. 12, p. 477-481, Dec. 1995.

STUBER, C. W.; EDWARDS, M. D.; WENDELL, J. F. Molecular marker facilitated investigations quantitative trait loci in maize: II., factors influencing yield and its component traits. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 4, p. 639-648, July/Aug. 1987.

STUBER, C. W. et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Austin, v. 132, n. 3, p. 823-839, Nov. 1992.

THOMPSON, D. L. et al. Inheritance of resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 2, p. 243-246, Mar./Apr. 1987.

ULRICH, J. F.; HAWK, J. A.; CARROLL, R. B. Diallel analysis of maize inbreds for resistance to gray leaf spot. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 6, p. 1198-1200, Dec. 1990.

VELDBOOM, L. R.; LEE, M. Molecular-marker facilitated studies of morphological traits in maize: II., determination of QTLs for grain yield and yield components. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 4, p. 451-458, Oct. 1994.

WANG, J.; LEVY, M.; DUNKLE, L. D. Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 12, p. 1269-1275, Dec. 1998.

WARD, J. M. J. et al. Gray leaf spot: a disease of global importance in maize production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 10, p. 884-895, Oct. 1999.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador bnlg 1258 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1,89	0,94	0,2	0,821
Erro	90	429,04	4,96		
Total	92	430,92			

Tabela 2A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1071 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1,38	0,69	0,15	0,86
Erro	90	429,54	4,77		
Total	92	430,92			

Tabela 3A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1042 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	3,26	1,63	0,34	0,710
Erro	90	427,66	4,75		
Total	92	430,93			

Tabela 4A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador bnlg 1621 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	15,90	7,95	1,72	0,840
Erro	90	415,02	4,61		
Total	92	430,92			

Tabela 5A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1086 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	15,24	7,62	1,65	0,197
Erro	90	415,69	4,62		
Total	92	430,92			

Tabela 6A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador bmc 1714 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	17,37	8,69	1,89	0,157
Erro	90	413,55	4,60		
Total	92	430,92			

Tabela 6A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1037 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	2,74	1,37	0,29	0,758
Erro	90	428,29	4,76		
Total	92	430,92			

Tabela 7A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1058 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	25,12	12,56	2,79	0,067
Erro	90	405,81	4,51		
Total	92	430,92			

Tabela 8A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador bnlg 1006 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	8,58	4,29	0,91	0,4045
Erro	90	422,34	4,69		
Total	92	430,92			

Tabela 9A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1016 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	2,02	1,01	0,21	0,809
Erro	90	428,90	4,77		
Total	92	430,92			

Tabela 10A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1033 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	13,10	6,55	1,21	0,249
Erro	90	417,83	4,64		
Total	92	430,92			

Tabela 11A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador umc 1056 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	7,82	3,91	0,83	0,438
Erro	90	423,10	4,70		
Total	92	430,92			

Tabela 12A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador bnlg 278 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	7,48	3,74	0,79	0,455
Erro	90	423,45	4,70		
Total	92	430,92			

Tabela 13A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador bnlg 381 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	8,95	4,47	0,95	0,389
Erro	90	421,98	4,78		
Total	92	430,92			

Tabela 14A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador mmc 0241 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	13,22	6,61	1,24	0,246
Erro	90	417,71	4,64		
Total	92	430,92			

Tabela 15A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador mmc 041 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	8,24	4,12	0,88	0,419
Erro	90	422,68	4,69		
Total	92	430,92			

Tabela 16A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador phi 074 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	8,77	4,38	0,98	0,445
Erro	90	402,26	4,47		
Total	92	430,92			

Tabela 17A Análise de variância para severidade da doença utilizando o marcador phi 006 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	5,05	2,53	0,53	0,588
Erro	90	425,87	4,73		
Total	92	430,92			

ANEXO B

Tabela 1B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 1258 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	2682,6	1341,33	0,98	0,38
Erro	90	123746	1375,07		
Total	92	126439			

Tabela 2B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1117 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1057,19	528,60	0,38	0,683
Erro	90	125382	1393,13		
Total	92	126439			

Tabela 3B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1071 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	3965,2	1982,67	1,46	0,24
Erro	90	122474	1360,81		
Total	92	126439			

Tabela 4B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1042 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	3965,15	1982,57	1,23	0,468
Erro	90	122474	1360,81		
Total	92	126439			

Tabela 5B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 1265 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1751,9	875,9	0,63	0,533
Erro	90	124687	1385,4		
Total	92	126439			

Tabela 6B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 1621 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1564,2	782,21	0,56	0,82
Erro	90	125508	1396,8		
Total	92	126439			

Tabela 6B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1086 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	3066,05	1533,02	1,12	0,33
Erro	90	123373	1370,8		
Total	92	126439			

Tabela 7B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bmc 1714 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1740,3	870,2	0,63	0,56
Erro	90	124698	1385,5		
Total	92	126439			

Tabela 8B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 1520 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	596,1	298,1	0,21	0,80
Erro	90	125843	1398,3		
Total	92	126439			

Tabela 9B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1037 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1785,4	892,7	0,64	0,53
Erro	90	124653	1392,1		
Total	92	126439			

Tabela 10B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 1006 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	931,2	465,6	0,33	0,72
Erro	90	125508	1394,3		
Total	92	126439			

Tabela 11B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1016 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	5758,3	2879,1	2,15	0,13
Erro	90	120680	1340,9		
Total	92	126439			

Tabela 12B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1033 por meio da regressão individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	2286,9	1143,5	0,83	0,44
Erro	90	124152	1379,5		
Total	92	126439			

Tabela 13B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador umc 1056 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	4133,6	2066,8	1,51	0,22
Erro	90	122305	1358,9		
Total	92	126439			

Tabela 14B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 1250 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	4881,9	2449,9	1,81	0,17
Erro	90	121557	1350,6		
Total	92	126439			

Tabela 15B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 278 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	6752,4	3376,2	2,54	0,08
Erro	90	119686	1329,8		
Total	92	126439			

Tabela 16B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador bnlg 382 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	2820,9	1410,5	1,03	0,75
Erro	90	123618	1373,5		
Total	92	126439			

Tabela 17B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador mmc 0241 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1133,9	566,9	0,41	0,67
Erro	90	125305	1392,3		
Total	92	126439			

Tabela 18B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador mmc 041 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	1554,1	777,1	0,56	0,57
Erro	90	124885	1387,6		
Total	92	126439			

Tabela 19B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador phi 074 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	753,5	376,8	0,27	0,76
Erro	90	125685	1326,5		
Total	92	126439			

Tabela 20B Análise de variância para produção de grãos utilizando o marcador phi 082 por meio da regressão linear individual

<i>Fonte</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>Fc</i>	<i>Pr>F</i>
Modelo	2	7129,6	3564,8	2,69	0,07
Erro	90	119309	1325,7		
Total	92	126439			

ANEXO C

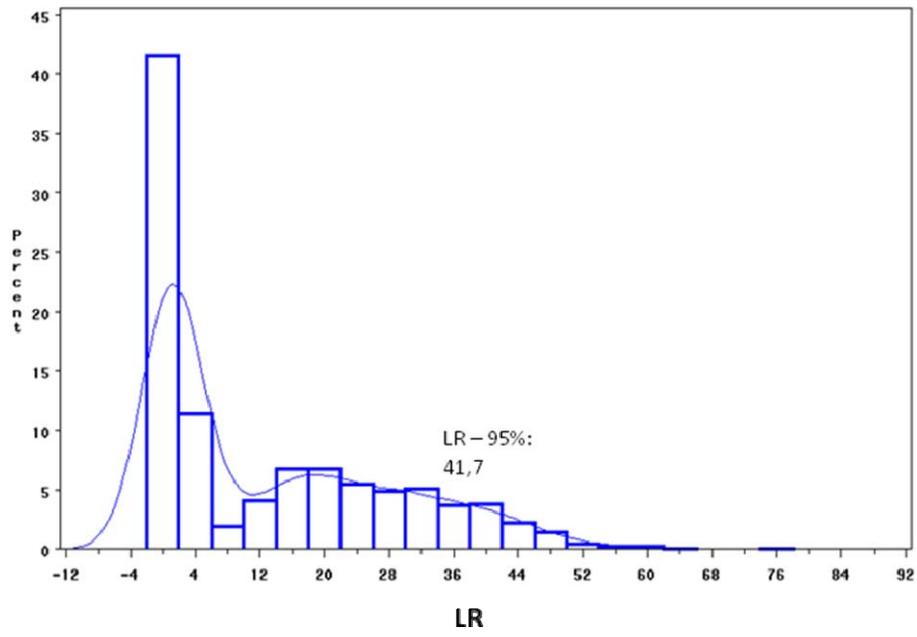


Figura 1C Distribuição empírica de H_0 , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc2082

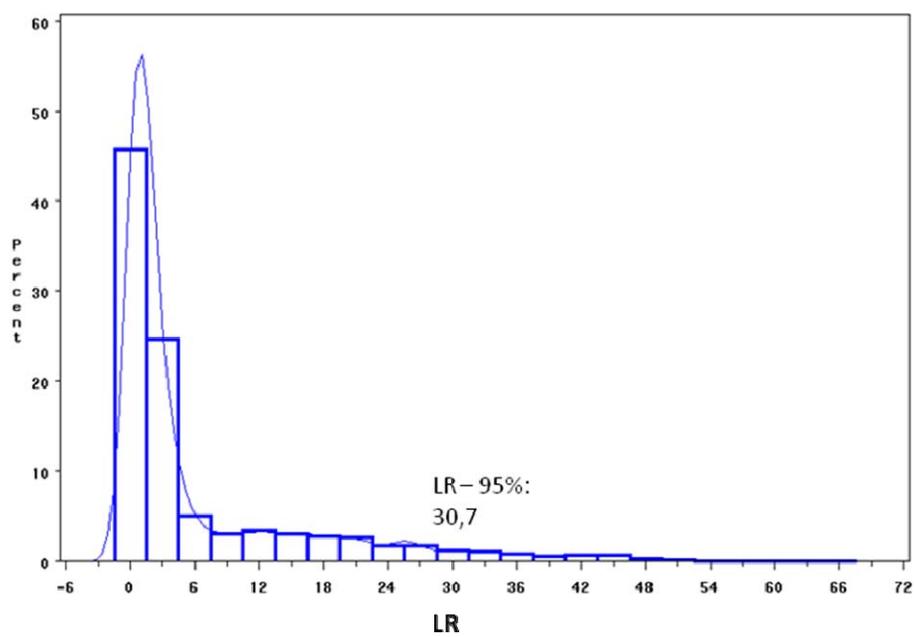


Figura 2C Distribuição empírica de H_0 , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc1058

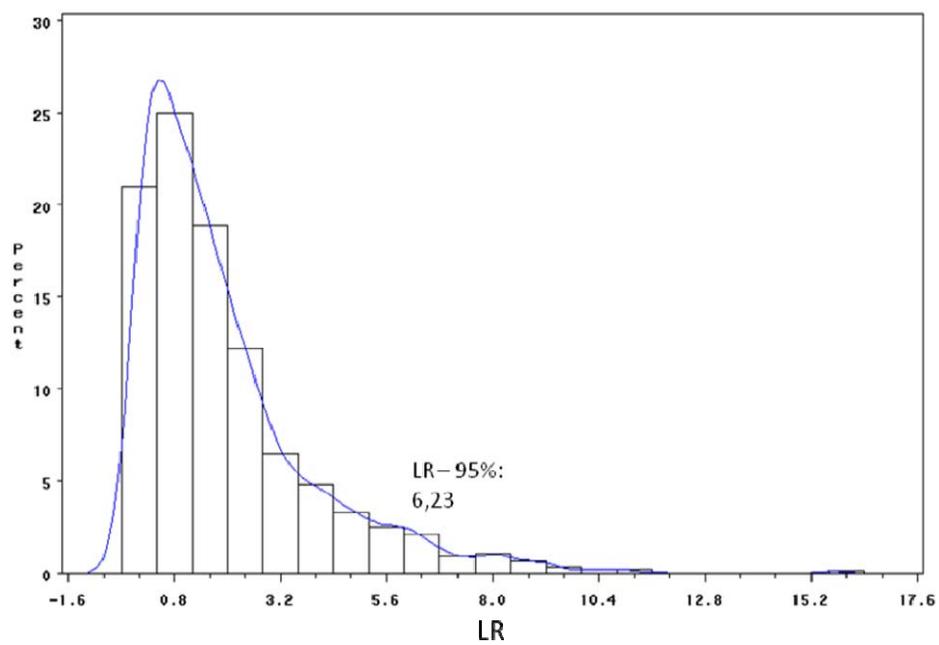


Figura 3C Distribuição empírica de H_0 , considerando os valores de (LR) obtidos em 3000 permutações utilizando o marcador umc1058

ANEXO D

Tabela 1D Informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), variância, frequência de recombinação (r), razão de máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade dos marcadores não associados a QTL de resistência a cercosporiose

<i>Marcador</i>	<i>média</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>Var.</i>	<i>r%</i>	<i>LR</i>	<i>Prob.</i>
bnlg1258	3,94	0,14	0,28	4,61	0.036	0,41	36,4
umc1071	3,97	-0,13	0,23	4,62	0.017	0,38	3,71
umc1042	3,99	-0,20	0,25	4,60	0.019	0,70	3,26
bnlg1265	3,74	-1,01	0,60	4,14	0,00001	10,85	23,6
bnlg1621	3,93	-0,16	0,25	4,58	0.030	0,42	3,71
umc1086	4,40	-0,38	-0,60	4,47	0.0038	3,35	26,01
bmc1714	4,42	-0,49	-0,59	4,46	0.0005	3,82	29,9
bnlg1520	3,87	-0,66	0,50	4,36	0.00003	5,90	23,9
umc1037	4,19	-0,25	-0,17	4,60	0.045	0,60	23,7
bnlg1006	4,02	-0,44	0,11	4,55	0.003	1,87	17,4
umc1016	4,26	-0,041	-0,32	4,62	0.033	0,43	14,2
umc1033	4,73	-1,91	-1,90	1,37	0.45	32,4	41,3
umc1056	3,92	-0,58	0,33	4,47	0.14	1,78	10,3
bnlg1250	3,69	-0,41	0,97	4,27	0.00001	7,51	32,8
bnlg278	4,37	-0,06	-0,55	4,55	0.017	1,32	29,1
bnlg381	4,42	0,08	-0,61	4,53	0.0042	1,92	29,2
mmc0241	4,05	-0,56	0,13	4,46	0.0039	2,81	32,91
mmc041	3,85	0,38	0,42	4,48	0.017	1,80	18,5
phi074	3,92	-0,82	0,27	4,30	0.00005	6,30	23,7
phi006	4,32	-0,22	-0,38	4,56	0.0085	1,10	3,99

a: efeito aditivo; d: efeito de dominância

Tabela 2D Informações de média, efeitos aditivo (a) e de dominância (d), variância, frequência de recombinação (r), razão de máxima verossimilhança (LR) e sua probabilidade dos marcadores não associados a QTL de produção de grãos, a partir de valores expressos em kg/planta

<i>Marcadador</i>	<i>média</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>Var.</i>	<i>r%</i>	<i>LR</i>	<i>Prob.</i>
bnlg1258	0,105	0,005	0,010	0,00133	0.00008	1,99	6,53
umc1117	0,104	0,005	0,003	0,00134	0.008	0,79	6,40
umc2082	0,117	-0,019	-0,018	0,00115	0.095	6,04	7,34
umc1071	0,119	0,019	-0,02	0,00111	0.24	4,54	6,78
bnlg1265	0,099	-0,004	0,015	0,00129	0.16	1,35	4,55
bnlg1621	0,110	-0,012	0,011	0,00143	0.0014	0,94	3,89
umc1086	0,117	0,017	-0,019	0,00114	0.27	3,55	7,13
bmc1714	0,113	0,0013	-0,012	0,00134	0.10	1,30	4,68
bnlg1520	0,109	-0,003	-0,005	0,00135	0.08	0,49	6,42
umc1037	0,112	-0,0016	-0,009	0,00134	0.009	1,32	5,43
bnlg1006	0,099	0,0006	0,016	0,00129	0.0001	4,32	6,89
umc1016	0,094	0,0008	0,016	0,00129	0.0001	4,33	6,42
umc1033	0,114	-0,003	-0,012	0,00133	0.018	2,01	6,03
umc1056	0,102	-0,008	-0,010	0,00131	0.03	3,09	7,31
bnlg1250	0,101	-0,004	0,013	0,00131	0.00007	3,66	6,77
bnlg278	0,114	-0,012	-0,012	0,00125	0.07	5,39	6,58
bnlg381	0,102	0,005	0,009	0,00132	0.00009	2,09	4,55
mmc0241	0,106	-0,005	0,003	0,00134	0.0008	0,83	6,55
mmc041	0,104	0,006	0,006	0,00134	0.05	1,21	4,09
phi074	0,106	0,004	0,002	0,00135	0.008	0,55	3,6
phi006	0,098	0,003	0,017	0,00128	0.0004	5,39	6,59