

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À
TOLERÂNCIA À ALTA TEMPERATURA DE
SECAGEM EM SEMENTES DE MILHO**

**KALINKA CARLA PADOVANI DE CARVALHO
SALGADO**

2005

KALINKA CARLA PADOVANI DE CARVALHO SALGADO

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À
TOLERÂNCIA À ALTA TEMPERATURA DE
SECAGEM EM SEMENTES DE MILHO**

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



Orientadora

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

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

Salgado, Kalinka Carla Padovani de Carvalho

**Mapeamento de QTLs associados à tolerância à alta temperatura de
secagem em sementes de milho / Kalinka Carla Padovani de Carvalho
Salgado. -- Lavras : UFLA, 2005.**

109p. : il.

Orientadora: Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Tese (Doutorado) -- UFLA.

Bibliografia.

**1. Milho. 2. Temperatura de secagem. 3. Mapeamento de QTLs. 4. Semente.
5. Marcador microssatélite. 6. Marcador molecular. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.**

CDD-633.1521

-633.1586

KALINKA CARLA PADOVANI DE CARVALHO SALGADO

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA À ALTA
TEMPERATURA DE SECAGEM EM SEMENTES DE MILHO**

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

APROVADA em 10 de agosto de 2005.

Pesq. Dra Cláudia Teixeira Guimarães EMBRAPA Milho e Sorgo

Prof. Dr. João Bosco dos Santos UFLA

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete V. F. da Rosa EMBRAPA Café


Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho
UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais Lázaro e Joana D'Arc,

Por exercerem de maneira sublime a missão que Deus lhes confiou
de serem pais, guias e amigos.;

Às minhas irmãs Kênia e Kaline,

Pelo amor, carinho, amor e amizade que nos une.;

À minha sobrinha Gabriela,

Por ser o nosso "raio de sol".;

OFEREÇO

**Senhor conceda-me serenidade para aceitar tudo que não posso
mudar,**

**coragem para mudar as coisas que posso,
e a sabedoria de distinguir entre umas e outras.**

Reinhold Niebuhr

Ao meu namorado Robson, pelo carinho, apoio e amor.;

Aos meus amigos e familiares, pelo amor e incentivo em todos os
momentos.;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e por mais um dia de vida.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo apoio na condução desse trabalho.

À professora Édila Vilela Resende Von Pinho, pela orientação, confiança, amizade e principalmente pelo apoio durante todos esses anos.

À pesquisadora Cláudia Teixeira Guimarães, pela co-orientação, amizade e valiosa colaboração na realização desse trabalho.

Ao professor Renzo Garcia Von Pinho pela co-orientação e colaboração.

Aos professores Renato Mendes Guimarães, João Bosco dos Santos e à pesquisadora Stella Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela participação na banca examinadora da defesa de tese e pelas valiosas sugestões.

Aos professores Maria Laene Moreira de Carvalho, Maria das Graças Guimarães Carvalho, João Almir de Oliveira e ao pesquisador Antônio Rodrigues Veira, pela atenção sempre concedida.

À pesquisadora Lilian Padilha, pelo apoio e acima de tudo pela amizade.

Aos Técnicos e pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, pelo convívio e amizade.

Aos colegas de pós-graduação, Solange, Dinara, Maria de Lourdes, Tida, Sandro, Mariney, Elisa, Luciana, Marcela, Keline, Wagner, Silvia, Pedro, Ubiraci, pela amizade e apoio.

Aos alunos da iniciação científica, César, Fabrício, Sancho, Maurílio, Vinícius e Clarissa e aos estagiários da Embrapa Milho e Sorgo pelo auxílio na condução dos experimentos, com grande responsabilidade e dedicação.

À secretária Andrea, pelo apoio constante e amizade.

Aos Funcionários do Laboratório de Sementes, Elsa, Dalva e Elenir e aos funcionários do Núcleo de Biologia Aplicada Miguel e Wanderson pelo auxílio e bom convívio nesse período.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e da taxa de bancada.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais –FAPEMIG, que financiou parte deste trabalho.

À família Padilha, exemplo de carinho e atenção, por me apoiar nesse trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Tolerância de sementes à dessecação	4
2.2 Mecanismos de tolerância à dessecação	9
2.3 Controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem	21
2.4 Marcadores microssatélites	24
2.5 Construção de mapas genéticos	28
2.6 Detecção e mapeamento de QTLs	30
2.7 Mapeamento de genes associados ao estresse hídrico e de temperatura em milho	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material genético	39
3.2 Multiplicação das sementes e obtenção das gerações F ₂	39
3.3 Secagem das sementes das linhagens	40
3.4 Avaliação da tolerância a altas temperaturas de secagem	41
3.4.1 Teste de germinação	41
3.4.2 Envelhecimento acelerado	42

3.5 Procedimentos estatísticos	42
3.6 Avaliação fenotípica das famílias $F_{2,3}$	43
3.7 Avaliação genética da população F_2 e fenotípica das famílias $F_{2,3}$	43
3.8 Análises estatísticas dos dados fenotípicos	44
3.9 Análises moleculares	46
3.9.1 Extração e quantificação do DNA genômico	46
3.9.2 Marcadores SSR	47
3.10 Análise de ligação dos marcadores	50
3.11 Detecção e mapeamento de QTLs	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Multiplicação das sementes e obtenção das gerações F_2	52
4.2 Avaliação fenotípica das famílias $F_{2,3}$	53
4.3 Análise dos marcadores microsatélites	56
4.4 Construção do mapa genético	70
4.5 Identificação de marcadores moleculares associados a QTLs	72
5 CONCLUSÕES.....	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO	104

RESUMO

SALGADO, Kalinka Carla Padovani de Carvalho. **Mapeamento de QTLs associados à tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho.** 2005. 109p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A utilização de altas temperaturas de secagem em sementes de milho colhidas em espigas com elevados teores de água pode levar a uma baixa qualidade das sementes. No entanto, a tolerância a altas temperaturas de secagem é influenciada pelo genótipo. A identificação de marcadores moleculares, ligados aos QTLs para essa característica, pode auxiliar nos programas de melhoramento, na compreensão do caráter e no conhecimento da posição e magnitude de seu efeito. O presente estudo foi realizado com os objetivos de avaliar o nível e a distribuição do polimorfismo de locos de microssatélites, mapear regiões genômicas responsáveis pela tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem e, ainda, quantificar os efeitos dessas regiões na variação fenotípica da característica. Inicialmente, para a seleção de linhagens para a tolerância à alta temperatura de secagem, sementes de 12 linhagens foram colhidas, manualmente, em espigas com teor de água em torno de 35% e secadas em secador a 45 °C, até atingirem teor de água de aproximadamente 11%. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio dos testes de germinação e envelhecimento acelerado, sendo selecionadas as linhagens 12 e 5, intolerante e tolerante à alta temperatura de secagem, respectivamente. A análise de polimorfismo entre as linhagens e entre *bulks* de plantas F_{2,3} tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem foi realizada por meio de 342 marcadores microssatélites. Os marcadores polimórficos foram usados nas análises de ligação com a característica fenotípica, em uma população segregante constituída de 129 famílias F_{2,3} provenientes do cruzamento das linhagens 12 e 5, utilizando-se as metodologias de regressão e de mapeamento por intervalo composto. Não houve polimorfismo entre os *bulks* avaliados e dos *primers* utilizados entre as linhagens, 34% foram polimórficos, 48% monomórficos, 7% falharam em produzir qualquer produto amplificado e 11% apresentaram uma baixa resolução. Por meio das metodologias de regressão e de mapeamento por intervalo composto foram identificados três QTLs associados com a tolerância das sementes à alta temperatura de secagem, presentes nos

* Comitê Orientador: Profª Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho - UFPA (Orientador), Drª. Cláudia Teixeira Guimarães – EMBRAPA Milho e Sorgo, Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho - UFPA.

cromossomos 6 e 8 e explicando 39% da variação fenotípica da característica. Foram observados efeitos aditivos, de dominância e sobredominância significativos para o controle da tolerância à alta temperatura de secagem.

ABSTRACT

SALGADO, Kalinka Carla Padovani de Carvalho. Mapping of QTL associated with tolerance to high drying temperature of the maize seeds. LAVRAS: UFLA, 2005. 109p. (Tese - Doctorante in Plant Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The use of high drying temperature in corn seeds harvested on corn cobs with high water content could originate seeds with low quality. Although, the tolerance to drying at high temperatures is influenced by genotype. The identification of molecular markers linked with QTLs for this trait could help in breeding programs, in addition to improve the understanding of their position and effect intensity. The present work aimed to evaluate the level and the polymorphism distribution of the microsatellite locus, to map the tolerance to high drying temperature of corn seeds, and also to quantify the effects of these regions in the phenotypic variation of the trait. Initially, for the lines selection to tolerance at high drying temperatures, seeds from 12 lines were harvested by hand on corn cobs with water content near 35% and dried artificially at 45 °C, until the water level reached approximately 11%. The seed physiological quality was evaluated using germination and accelerated aging test, being selected the lines 12 and 5, intolerant and tolerant to high drying temperature, respectively. The polymorphism analysis among the lines and among the bulks of plants F_{2:3} tolerant and intolerant to high drying temperature was made by 342 microsatellite markers. The polymorphic markers were used in linkage analysis with the phenotype trait, in a segregant population composed by 129 F_{2:3} families originated from the crosses of lines 12 and 5, using the methodologies of regression and Composite Interval Mapping. There were no polymorphism among evaluated bulks, and considering the primers used among the lines, 34% were polymorphic, 48% monomorphic, 7% failed to amplify any fragment and 11% showed a low resolution. Based in the methodologies of regression and Composite Interval Mapping there were identified three QTLs associated with the seed tolerance to high drying temperature, present in chromosomes 6 and 8 and explaining 39% of the phenotypic variation of the trait. The effects

* Guidance Committee: Prof^a Dr^a. Édila Vilela de Resende Von Pinho - UFLA (Major Professor), Dr^a. Cláudia Teixeira Guimarães – EMBRAPA Milho e Sorgo, Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho - UFLA.

addictive, dominance and overdominance were significant for the control of the tolerance to high drying temperature.

1 INTRODUÇÃO

A colheita de sementes de milho em espigas favorece a antecipação da mesma e, conseqüentemente, a otimização das estruturas de beneficiamento e de secagem. Além disso, esse método permite que a colheita seja realizada mais próxima ao ponto de maturidade fisiológica, com máxima qualidade das sementes. Porém, o elevado teor de água das sementes de milho colhidas em espigas, contribui para acelerar o processo de deterioração, devido à elevada atividade metabólica, durante o período compreendido entre a colheita e a secagem. Tal fato, além de consumir parte das substâncias de reserva das sementes, libera energia e água, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos e insetos, o que exige uma secagem rápida após a colheita.

A utilização de altas temperaturas possibilita o aumento da capacidade de secagem de sementes colhidas com elevados teores de água (Borsato et al., 1999). Porém, cuidados são exigidos no processo de secagem, uma vez que as sementes se encontram mais sensíveis a elevadas temperaturas de secagem quando apresentam altos teores de água (Rosa, 2000). Assim, a operação de secagem artificial pode causar danos em sementes de milho, com significativas reduções na qualidade fisiológica, sendo que a susceptibilidade da semente aos danos por secagem é função das condições de secagem, da qualidade e do teor de água iniciais da semente, do estágio de desenvolvimento em que as sementes se encontram no momento da colheita e de aspectos genéticos (José, 2003).

Para sementes de milho, a susceptibilidade de sementes a danos por alta temperatura de secagem está associada ao efeito materno e é dependente do genótipo (José et al., 2004a). Características estruturais e bioquímicas em sementes têm sido associadas na aquisição e manutenção da tolerância à dessecação (Golovina et al., 2001). Devido ao grande número de elementos

ligados à tolerância à dessecação, o controle por múltiplos genes vem sendo associado a essa tolerância (Ingram & Bartels, 1996). Porém, esse é um processo complexo e pouco compreendido, requerendo estudos mais detalhados.

Com o advento da tecnologia dos marcadores moleculares, novos caminhos se abrem para a análise dos caracteres de herança quantitativa *Quantitative Traits Loci* (QTLs) e, conseqüentemente, para a Genética Quantitativa. Com a utilização de marcadores moleculares, como microssatélites, existe a possibilidade de se mapear segmentos de DNA que contenham locos que controlem esses caracteres e monitorar a segregação desses nas populações, assim como mensurar as contribuições desses para os diferentes caracteres (Souza Júnior, 2001).

Em estudos de tolerância ao estresse hídrico em plantas e sementes têm sido identificadas múltiplas mudanças na expressão de genes que são induzidos por esse estresse. O conhecimento das bases genéticas e dos mecanismos responsáveis pela tolerância à dessecação constitui uma ferramenta adicional em programas de melhoramento genético, sendo que o estudo da localização de genes que controlam essa variação fenotípica, a magnitude de seu efeito e as interações com outros QTLs permite uma melhor compreensão do caráter e também do monitoramento das regiões genômicas onde estão posicionados os locos de interesse.

Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares associados com a tolerância à alta temperatura de secagem, pode ter grande utilidade no melhoramento genético, seja auxiliando na seleção de genótipos de interesse em programas de retrocruzamento ou na identificação de novas fontes de tolerância à alta temperatura de secagem, tendo em vista que a avaliação fenotípica é bastante complexa.

Nesse sentido, no presente trabalho linhagens de milho foram avaliadas quanto à tolerância de sementes à alta temperatura de secagem. Foram avaliados

ainda o nível e a distribuição do polimorfismo de locos de microssatélites, identificadas regiões genômicas responsáveis pela característica e, ainda, quantificados os efeitos dessas regiões na variação fenotípica para essa característica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tolerância de sementes à dessecação

A produção de sementes de milho de qualidade é muito importante dentro do sistema de produção agrícola, pois, se bem executada, favorece a obtenção de estandes uniformes no campo e de altas produtividades.

A colheita de sementes de milho em espigas apresenta uma série de vantagens, tendo em vista a possibilidade de colheita antecipada, evitando-se os riscos de ataques de insetos, doenças ou chuvas no campo. Permite, ainda, a debulha das sementes sob teor de água mais adequado e menores riscos na secagem, uma vez que o embrião da semente está protegido pelo sabugo. Nesse tipo de colheita também é possibilitada a seleção de espigas, na qual são eliminadas aquelas com sintomas de deterioração e, principalmente, aquelas cujo padrão difere visualmente das características da cultivar em questão (Scaranari, 1997). Também possibilita a redução dos danos mecânicos que normalmente ocorrem durante a colheita mecanizada a granel (Rosa, 2000).

Assim, a colheita de sementes em espigas possibilita a antecipação da mesma, favorecendo não só a qualidade das sementes, mas também o planejamento de todo o processamento e distribuição do produto, propiciando um melhor aproveitamento da estrutura de secagem e beneficiamento. Entretanto, nessas condições, as sementes encontram-se com elevado teor de água, exigindo cuidados no seu manuseio, notadamente quanto à agilidade no processo de secagem das espigas (Scaranari, 1997), uma vez que as sementes com alto teor de água podem ser intolerantes à alta temperatura de secagem, o que leva a uma baixa germinação e vigor das sementes (Rosa, 2000).

Assim, o processo de secagem é uma etapa crítica na produção de sementes de milho, podendo, de um lado, limitar a colheita e, de outro, onerar o custo de produção (Rosa, 2000). Segundo Magari et al. (1997), híbridos de milho que possibilitem uma rápida redução do teor de água das sementes colhidas em espigas são necessários para a redução do custo de produção de pós-colheita, relativos à secagem artificial de sementes. Segundo os autores, o aumento da eficiência na operação de colheita tem estimulado práticas de secagem mais rápida. Porém, expor as sementes com altos teores de água a temperaturas elevadas durante a secagem artificial pode resultar na redução da qualidade das mesmas (José, 2003). No entanto, esse autor sugere a existência de variabilidade genética ligada às taxas de secagem das sementes e à tolerância a altas temperaturas de secagem.

Sabe-se, ainda, que o nível de tolerância à dessecação depende do estágio de desenvolvimento da semente. Durante o desenvolvimento, as sementes ortodoxas passam pela fase de histodiferenciação, deposição de reserva, acompanhado por um rápido aumento na massa seca. Após a histodiferenciação e antes da secagem na maturação, as sementes adquirem a tolerância à dessecação (Pammenter & Berjak, 1999). Assim, a dessecação é a fase terminal do desenvolvimento das sementes, o que leva para um estágio metabólico quiescente entre o desenvolvimento e a germinação (Kermode & Bewley, 1985). Na natureza, o final do estágio de desidratação ocorre gradualmente com o equilíbrio entre o teor de água da semente e a umidade relativa do ambiente. Entretanto, na produção de sementes de milho, essa desidratação ocorre por meio da secagem artificial, onde as sementes são expostas a um grande volume de ar aquecido, que facilita a remoção da água das sementes. Esse passo crítico na produção de sementes requer um bom manejo, sendo um fator limitante para a capacidade de colheita e uma causa freqüente de danos (Harrinson & Wright, 1929; Perdomo & Burris, 1998).

Danos celulares irreversíveis podem ocorrer quando o volume de água na célula fica abaixo de valores críticos. Isso porque a água participa da maioria das reações bioquímicas da célula e sua remoção pode causar profundos efeitos no metabolismo celular, podendo até mesmo levá-la à morte. Alterações na conformação de membranas e configurações de proteínas podem ocorrer devido à perda de interações hidrofílicas e hidrofóbicas. Além disso, a perda de água na superfície molecular pode expor sítios às interações desnaturantes ou compostos tóxicos, tais como radicais livres (Walters, 2000). Assim, a secagem artificial pode afetar diferentes processos fisiológicos, os quais podem, direta ou indiretamente reduzir a germinação e o vigor das sementes (Seyedin et al., 1984).

A susceptibilidade das sementes aos danos de secagem depende das condições de cultivo, de aspectos genéticos e, principalmente, do estágio de desenvolvimento em que as mesmas se encontram no momento da colheita (Rosa, 2000), uma vez que as sementes não toleram dessecação em todos os estádios de desenvolvimento. A passagem do estado de intolerância para a tolerância à dessecação ocorre em um estágio particular do desenvolvimento para cada espécie (Kermode & Bewley, 1985). Em feijão (*Phaseolus vulgaris*), após 32 dias da antese, as sementes se tornam tolerantes à dessecação e são capazes de germinar, após uma dessecação prematura (Dasgupta & Bewley, 1982). Bochicchio et al. (1991; 1994) observaram que embriões de milho são intolerantes à dessecação aos 20 dias após polinização (DAP) e a tolerância à rápida secagem é adquirida num estágio preciso do desenvolvimento, após 25 DAP, antes da maturidade fisiológica. Embriões imaturos durante a histodiferenciação não toleram uma secagem rápida, mas geralmente adquirem a tolerância durante a deposição de reservas ou quando o máximo de matéria seca é alcançado (Corbineau et al., 2000). Segundo Walters (2000), à medida que ocorre a maturação dos embriões, os mesmos adquirem tolerância até níveis de

potencial de água progressivamente mais baixos, havendo uma considerável variação entre sementes de diferentes espécies, e também dentro de uma espécie, na resposta à dessecação em termos de conteúdo de água para os quais as sementes podem ser secadas (Pammenter & Berjak, 1999).

Assim, em sementes ortodoxas, a tolerância à dessecação depende da espécie, do cultivar, do estágio fisiológico e geralmente ocorre nas últimas fases do desenvolvimento (Rosa, 2000). Além disso, parâmetros do método de secagem, como tempo e temperatura de secagem também influenciam na capacidade das sementes sobreviverem à dessecação (Fornal et al., 1993; Rosa, 2000). Sementes são intolerantes a uma rápida secagem ou a altas temperaturas de secagem durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Segundo José (2003), a exposição de sementes com altos teores de água a temperaturas elevadas durante a secagem artificial pode resultar em redução da qualidade fisiológica das mesmas.

As sementes de milho que são colhidas em espigas podem apresentar um teor de água alto, de aproximadamente 40%. Dessa forma, as sementes em espigas são secadas com ar quente antes do beneficiamento e do armazenamento. Sementes neste estágio são tolerantes a uma temperatura moderada de secagem e intolerantes a altas temperaturas ou à secagem excessivamente lenta (Chen & Burris, 1990; Herter & Burris, 1989). A susceptibilidade a danos pela alta temperatura de secagem pode ser reduzida por meio de pré-condicionamento, durante o qual as sementes são parcialmente secadas a uma baixa temperatura (20-35°C) por certo período de tempo e, em seguida, submetidas à secagem sob alta temperatura (Rosa, 2000; Herter & Burris, 1989; Perdomo & Burris, 1998).

Rosa (2000) observou que as sementes de milho colhidas próximo ao ponto de maturidade fisiológica, com altos teores de água, são tolerantes à secagem na temperatura de 35°C e intolerantes sob temperatura de 50°C. No

entanto, a pré-secagem inicial à temperatura de 35°C induziu tolerância à temperatura de 50°C, a qual foi adquirida gradativamente, à medida que as sementes de milho perderam água, sendo máxima com teores de água entre 25,3% e 28,5%.

Seyedin et al. (1984) observaram maior valor de condutividade elétrica e maior lixiviação de açúcares em sementes de milho que foram secadas a 50°C, quando comparadas com aquelas secadas a 35°C. Os mesmos autores também observaram que a alta temperatura de secagem pode resultar na hidrólise de amido no eixo embrionário das sementes durante os estágios iniciais do processo de secagem, o que pode ter acarretado uma maior lixiviação de açúcares em sementes secadas a 50°C. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen & Burris (1990), que observaram um aumento nos valores de condutividade elétrica e lixiviados de açúcar em sementes de milho secadas a 50°C tendo esse dano da membrana sido associado a uma redução da qualidade das sementes. Ainda segundo os autores, sementes de milho podem tolerar uma temperatura de secagem de 50°C, desde que sejam pré-secadas a uma temperatura de 35°C por um período de 12 a 36 horas.

Madden & Burris (1995) avaliaram o efeito da temperatura de dessecação de 35°C e 45°C na função mitocondrial em eixos embrionários de sementes de milho durante os estágios iniciais de embebição. Apesar dos valores de germinação das sementes terem sido superiores a 90% para todos os tratamentos, houve uma redução da viabilidade e uma maior relação da parte aérea/radícula das plântulas daquelas que foram secadas a 45°C, quando comparadas com as sementes que foram secadas a 35°C. As sementes foram colhidas com teor de água variando entre 500 a 350 g H₂O kg⁻¹, porém, os autores observaram que esse efeito de umidade foi pequeno no teste frio, quando comparado com a variação da temperatura de secagem. Os autores constataram uma maior taxa de absorção de O₂ em sementes secadas a 35°C, após 1 hora, do

que em sementes secadas a 45°C, tendo essa taxa permanecido constante nessas últimas após 6 horas de embebição e aumentando nas sementes secadas a 35°C. Segundo os autores, a funcionalidade e o desenvolvimento mitocondrial durante os estágios iniciais de embebição são prejudicados quando as sementes são secadas com alta temperatura, sendo a mitocôndria, nesse período, um elemento determinante na taxa de germinação e subsequente crescimento das plântulas. Sabe-se, no entanto, que vários mecanismos estão envolvidos na tolerância à dessecação.

2.2 Mecanismos de tolerância à dessecação

Diferentes processos podem conferir proteção durante a secagem das sementes. Organismos tolerantes à dessecação podem sobreviver à remoção de água, uma vez que os constituintes celulares podem ser protegidos ou reparados (Walters et al., 2001). Segundo Bartels et al. (1988), a tolerância à dessecação é um fenômeno complexo, que tem sido descrito nos níveis morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, envolvendo a expressão coordenada de um grande número de genes (Walters et al., 2001). Para Leprince et al. (1993), os principais mecanismos de tolerância à dessecação em sementes são a presença de LEA proteínas (do inglês *late embryogenesis abundant*). Elas compõem um sistema de proteção contra radicais livres e juntamente com a síntese e o acúmulo de açúcares não redutores, estabilizam membranas e proteínas formando uma fase vítrea no citoplasma.

Rosa (2000) relatou que a aquisição de tolerância à dessecação é um processo complexo, que envolve muitos fatores, os quais interagem entre si e a ausência ou a ineficiência de um dos fatores podem levar a diferentes graus de tolerância. Segundo Leprince et al. (1993), cada componente do mecanismo de tolerância à dessecação é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado geneticamente.

A perda de viabilidade em sementes devido à dessecação é freqüentemente atribuída à perda da integridade da plasmalema, tendo como consequência um excessivo vazamento de solutos citoplasmáticos (Blackman et al., 1995). A ruptura da estrutura da membrana pode levar a uma descompartimentarização dos componentes celulares, resultando na liberação de enzimas que degradam as estruturas celulares e citoplasmáticas (Wolker et al., 1998b). Em estudos com tecidos secos, tem sido observado que a desorganização da membrana é um fenômeno comum se a dessecação for letal, uma vez que as células que são secadas em um estágio tolerante permanecem organizadas (Crèvecoeur et al., 1976; Dasgupta et al., 1982, citados por McKersie, 1996). A desorganização e o aumento da permeabilidade da membrana podem ser tanto consequência de uma ruptura física da membrana durante o colapso celular quanto devido a mudanças na organização física de lipídeos e proteínas componentes da membrana (Senaratna & McKersie, 1983).

Assim, a sobrevivência durante a dessecação requer a proteção de proteínas citoplasmáticas e a manutenção da estrutura de membrana lamelar, tanto na desidratação quanto na reidratação (Crowe et al., 1997; Hoekstra et al., 1994). Em algumas pesquisas, tem sido demonstrado que os açúcares podem estar associados a essa proteção. A aquisição de tolerância à dessecação durante a maturação das sementes e a perda dessa tolerância durante a germinação são correlacionadas com mudanças na composição de açúcares em muitas espécies (Leprince et al., 1993). Tipicamente, sementes tolerantes à dessecação acumulam sacarose e também estaquiose ou rafinose, e acumulam baixas quantidades de monossacarídeos, tais como galactose, glicose, frutose e manose. Embora a sacarose pareça estar ligada à estabilização de proteínas e membranas durante a secagem (Hinch & Hagemann, 2004), ela possui tendência a cristalizar em condições de baixa umidade. Assim, oligossacarídeos, tais como a rafinose, inibem esta tendência, sendo que esse açúcar parece ser importante

para a sobrevivência durante os estágios pós-secagem (Caffrey et al., 1988; Rosa, 2000). Os oligossacarídeos são capazes de manter a integridade das membranas por meio da interação com seus fosfolipídeos, substituindo a água durante a desidratação e prevenindo mudanças na conformação. Esses fatores contribuem para a formação do estado vítreo em citoplasmas secos à temperatura ambiente, o que é importante para prevenir a fusão de membranas (Chen & Burris, 1990; Mundree et al., 2002; Minorsky, 2003) e para proteção contra reações deteriorativas (Wolkers et al., 1998b; Minorsky, 2003).

Em sementes tolerantes à dessecação, o citoplasma se torna vítreo devido à presença de açúcares que promovem a vitrificação (Williams & Leopold, 1989; Sun & Leopold, 1997). No estado vítreo, reações de deterioração são evitadas devido à alta viscosidade, havendo também resistência nas mudanças no pH intracelular. A transição de estado líquido para vítreo, durante a desidratação celular, resulta na imobilização de estruturas celulares e componentes bioquímicos, preservando suas estruturas biológicas e minimizando danos provocados pela dessecação (Sun & Leopold, 1997).

Rosa (2000) observou que o decréscimo no conteúdo de glicose e o acréscimo no conteúdo de rafinose, após pré-secagem a 35 °C, está associado com a proteção das sementes de milho com altos teores de água contra os danos causados pela secagem à temperatura de 50 °C. O autor ressalta ainda que, mudanças nos conteúdos de sacarose parecem não estar relacionadas à aquisição dessa tolerância.

Segundo Walters (2000), a tolerância à dessecação constitui uma característica quantitativa, uma vez que a água possui muitas funções nas células e, conseqüentemente, sua indisponibilidade pode gerar diferentes tipos de estresses. Ainda segundo o autor, tal característica é adquirida continuamente, o que implica que os protetores da dessecação também devem ser adquiridos progressivamente, como ocorre com o conteúdo de determinados açúcares, que

núcleo, citoplasma (Hoekstra et al., 2001; Grelet et al., 2003), cloroplasto, retículo endoplasmático, aparatos de golgi e mitocôndria (Grelet et al., 2003), e possuem um aminoácido hidrofílico que permite uma alta solubilidade em água e resistência à desnaturação sob altas temperaturas (Ismail et al. 1999; Grelet et al., 2003; Bradford, 2004).

Mao et al. (1995) observaram que, durante o desenvolvimento das sementes de milho, a transcrição de RNA de LEA proteínas nos embriões de milho inicia aos 22 DAP, o que coincide com o momento em que os embriões aumentam a sua capacidade de sobreviver a uma rápida secagem (Bochicchio et al., 1994).

LEA proteínas estão presentes em um grande número de espécies de mono e dicotiledôneas, sendo que diferentes formas têm sido isoladas, clonadas e sequenciadas (McKersie, 1996). Essas proteínas têm sido agrupadas em diferentes grupos, os quais são definidos com base no padrão de expressão e sequência de aminoácidos, estando as maiores categorias nos grupos 1, 2 e 3 (Dure, 1992; Cumim, 1999; Bray et al., 2000; Wise, 2003). O grupo 1 (D19-LEA) é subdividido em duas superfamílias, sendo encontradas em plantas, diferentemente do grupo 3 (D7-LEA), que vem crescendo com a descoberta de proteínas homólogas em outros organismos que não sejam plantas, como, por exemplo, nematóides, sendo este grupo também subdividido em duas subfamílias (Wise, 2003). No grupo 2 (D11-LEA), Wise (2003) sugere existir três subfamílias, compostas por proteínas conhecidas como deidrinhas, as quais são encontradas, principalmente, em plantas (Swamy & Smith, 2000; Goyal et al., 2005). Os outros grupos são conhecidos como D113-LEA (grupo 4), D95-LEA (grupo 5) e D29-LEA (grupo 6). Cada grupo possui proteínas com uma sequência de aminoácidos bem conservada entre si. Essas proteínas são extremamente hidrofílicas, permanecem estáveis com aumento da temperatura,

são básicas e não contêm os aminoácidos cisteína e triptofano (Swamy & Smith, 2000).

As deidrininas estão presentes em sementes de milho, se acumulam durante a fase final da embriogênese e desaparecem durante a germinação (Bohnert, 2000). Essas proteínas são também produzidas por partes vegetativas das plantas, em resposta à baixa temperatura, salinidade, aplicação de ABA ou tratamentos que imponham um estresse hídrico (Pammenter & Berjak, 1999; Close et al., 1999; Karlson et al., 2003). O papel das deidrininas na tolerância ao estresse ainda não é conhecido, mas para Svensson (2001), as deidrininas atuam subjetivamente nas plantas, tanto em estresses de seca, salinidade e baixa temperatura quanto na dessecação de sementes. As deidrininas têm sido encontradas associadas com algumas macromoléculas e estão localizadas no núcleo ou citoplasma das células. Em sementes maduras de milho, as deidrininas foram localizadas no núcleo e citoplasma da camada de aleurona, escutelo e folhas embrionárias e somente no citoplasma das células próximas à radícula (Godoy et al. 1994). Assim, a teoria atual é a de que as deidrininas não desempenham uma função enzimática, mas, devido à sua natureza anfipática, inibem a desnaturação de um variado número de macromoléculas e estabilizam membranas durante a desidratação, protegendo a integridade celular (Pammenter & Berjak, 1999; Close et al., 1999; Svensson, 2001; Karlson et al., 2003).

Um outro grupo de proteínas que vem sendo associado com tolerância à dessecação em plantas e sementes é o das proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP). Essas proteínas são induzidas pelos mesmos estresses que induzem a expressão das LEA proteínas e a síntese das HSP coincide com a aquisição da tolerância à dessecação. Como o nome sugere, as HSP foram identificadas pela primeira vez como respostas ao estresse de calor. A habilidade de responder ao choque de temperatura também tem sido observada em

microrganismos, animais e plantas submetidas ao déficit hídrico (Harborne, 1997 citado por Nepomuceno et al., 2001).

HSP são geralmente designadas pelo seu peso molecular em kDa, sendo que as proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (15 – 30 kDa) conhecidas como *small heat shock proteins* (sHSP) (Vierling, 1991; Waters et al., 1996; Sun et al., 2002). Em plantas, há uma maior ocorrência de sHSP (Mansfield & Key, 1987), e as outras classes mais encontradas em plantas são as HSP60, HSP70, HSP90, e HSP100 (Vierling, 1991). Todas as sHSP em plantas são codificadas por seis famílias de genes nucleares e cada família corresponde a proteínas encontradas em diferentes compartimentos celulares: citossol (classe I e classe II), cloroplasto, retículo endoplasmático, mitocôndria e membranas (Waters et al., 1996).

Devido à acumulação de sHSP no período final da maturação de sementes, a função das sHSPs tem sido correlacionada com um ou mais processos desse estágio de desenvolvimento, como a dormência (Wehmeyer & Vierling, 2001) e a tolerância à dessecação (Wehmeyer et al., 1996). Sun et al. (2002) observaram um aumento da expressão de sHSP no final do desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis* e sugeriram que essas proteínas atuam na proteção dos componentes celulares durante a dessecação e reidratação das sementes. Em ervilha, as HSP das duas classes citossólicas ocorreram nos embriões durante a síntese de reservas e tiveram o seu nível aumentado em sementes maduras (Coca et al., 1994; DeRocher & Vierling, 1994).

A maior parte das HSP provavelmente funciona como chaperonas, ajudando no dobramento e evitando a degradação de outras proteínas, tendo as células eucarióticas pelo menos duas principais famílias de chaperonas moleculares, que são as proteínas de choque térmico HSP60 e HSP70 (Alberts et al., 2004).

Em um estudo de tolerância à dessecação, Kollipara et al. (2002) observaram, por meio da germinação de sementes de milho, uma expressão diferencial entre híbridos recíprocos F_1 para essa característica. Algumas chaperonas foram expressas diferencialmente entre híbridos recíprocos em sementes submetidas à alta temperatura de secagem (43°C). Uma maior síntese de HSP ajudaria a proteger proteínas durante o estresse osmótico que ocorre com a desidratação das células (Zhu et al., 1997; Nepomuceno et al., 2001).

Lee et al. (1997) observaram que a classe I de sHSP em plantas possui atividade chaperona *in vitro*. Wehmeyer & Vierling (2000) avaliaram embriões de sementes mutantes de *Arabidopsis* intolerantes à dessecação e demonstraram que houve uma redução ou mesmo ausência da proteína HSP17.4. Esses resultados suportam a idéia do possível envolvimento dessas proteínas na habilidade das sementes em sobreviver à dessecação. Os autores sugerem que, *in vivo*, HSP17.4 pode ter um papel semelhante, prevenindo a agregação irreversível de outras proteínas durante dessecação ou pode ajudar no redobramento de proteínas desnaturadas.

Um aspecto comum durante a maioria das condições ambientais adversas é o aumento das espécies ativas de oxigênio (EAO) que, embora ocorram regularmente como produto do metabolismo celular, durante a dessecação a sua ocorrência é maior (Mundree et al., 2002).

Segundo Leprince et al. (1999), durante a secagem das sementes, pode haver um distúrbio na cadeia de transporte de elétrons. O transporte de elétron, embora em um baixo nível, foi registrado em tecidos de planta desidratados e a respiração foi até mesmo mensurável em sementes com teores de água tão baixo quanto 20% de teor de água. Porém, nos teores intermediários de água entre 31 a 25%, o metabolismo desequilibrado pode levar à geração e à atividade descontrolada de radicais livres (Hendry, 1993; Hendry et al., 1992; Leprince et al., 1990; Vertucci & Farrant, 1995).

É imprescindível que, durante a secagem na maturação, sementes tolerantes sejam capazes de passar por esse conteúdo de água com um dano mínimo. A redução de tal dano pode se dar pela ação eficiente de sistemas de antioxidantes (Leprince et al., 1993; Puntarulo et al., 1991), como também pela diminuição do metabolismo, que consiste em um processo que diminui os efeitos potenciais deletérios associados com a desidratação (Pammenter & Berjak, 1999; Berjak & Pammenter, 2003). Segundo Berjak & Pammenter (2003), tal processo foi encontrado por Rogerson & Matthews (1977), que registraram um declínio acentuado no substrato respiratório precedendo, e presumivelmente causando, a queda na taxa respiratória e por Farrant et al. (1997), que observaram um declínio na taxa respiratória, o qual ocorreu enquanto a mitocôndria se tornou diferenciada, antes da secagem na maturação de sementes de feijão. Assim, essa redução na respiração constitui um evento essencial que permite a uma semente ortodoxa resistir à perda rápida de água (Berjak & Pammenter, 2003).

Células tolerantes à dessecação sofrem menor dano oxidativo do que células sensíveis a esse estresse. Isso provavelmente ocorre devido à diminuição da produção de EAO ou a ativação efetiva de sistemas antioxidantes, ou à ação de ambos os mecanismos em conjunto (Hoekstra, 2002). Os radicais livres geralmente causam danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, tendo como primeiro alvo as membranas, causando a perda da sua integridade em organismos sensíveis à dessecação quando estão sob condições de estresse hídrico (Hoekstra, 2002; Bewley, 1979; Mundrre et al., 2002). A peroxidação de lipídeos também causa danos na integridade das membranas, o que resulta em uma lixiviação de solutos para fora das organelas e da célula, alterando, assim, a função da membrana e causando desequilíbrios metabólicos (Mundrre et al., 2002). Dessa maneira, se os mecanismos antioxidantes, que normalmente extinguem esses radicais livres, não forem eficientes para combatê-los durante a

dessecação, uma série de reações pode levar a um aumento na peroxidação de lipídeos, a danos na membrana e, eventualmente, à morte celular (Hendry, 1993; Leprince et al., 1993).

Há falta de dados referentes ao papel de sistemas antioxidantes durante desenvolvimento e aquisição da tolerância à dessecação em sementes (Bailly et al., 2001). Porém, a habilidade das sementes para tolerar a dessecação pode estar relacionada à habilidade dos antioxidantes em remover EAO para evitar eventos danosos, como a peroxidação de lipídios causada por esses compostos (Hendry et al., 1992; Leprince et al., 1993; Vertucci & Farrant, 1995). Esses mecanismos envolveriam enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (Bailly et al., 2001), além de compostos antioxidantes, como tocoferol, ascorbato e glutatona, os quais estão presentes em grandes quantidades nas sementes (McKersie, 1996).

Outro mecanismo envolvido na tolerância à dessecação de sementes é o fitormônio ácido abscísico (ABA), que tem um efeito pleiotrópico no crescimento e desenvolvimento de plantas. Genes responsivos a ABA são normalmente expressos durante o final da embriogênese, quando as sementes são dessecadas e, em alguns casos, se tornam dormentes. Esse hormônio tem sido um mediador entre processos fisiológicos em resposta às condições de estresse, como seca, salinidade e frio (Hjellstrom, 2002; Guan & Scandalios, 1998).

O estudo de alguns genes mutantes tem ajudado na elucidação da indução de tolerância à dessecação. Plantas mutantes de várias espécies podem apresentar alteração no conteúdo ou na sensibilidade de ABA, incluindo milho (VP2, VP5, VP7, VP8, VP9) e *Arabidopsis* (LEC 1, LEC 2 e FUS 3) (Neill et al., 1987; Harada, 1997). O nível de ABA aumenta durante a primeira metade do desenvolvimento da semente e declina durante o final da maturação, quando o teor de água da semente diminui (Bewley & Black, 1994). Nas plantas mutantes,

tanto para síntese como para sensibilidade à ABA, pode ocorrer viviparidade e não indução de tolerância à dessecação (Koornneff et al., 1989).

Bochicchio et al. (1994) estudaram o efeito de ABA na aquisição de tolerância à dessecação em sementes de milho. Esses autores observaram que durante a embriogênese de sementes milho, o ABA endógeno aumenta concomitantemente com a aquisição de tolerância à dessecação, o ABA exógeno pode induzir tolerância em embriões mutantes (vps) que são deficientes em ABA e intolerantes à dessecação, e a tolerância é adquirida em embriões sensíveis ao ABA por uma secagem lenta, durante a qual o nível de ABA aumenta. Porém, os autores ressaltaram que o papel do ABA endógeno na tolerância à dessecação em embriões de milho é questionável, pois, quando os embriões tiveram a síntese de ABA inibida durante a secagem lenta, a tolerância à dessecação foi induzida, apesar do baixo nível de ABA endógeno.

A proteção à dessecação por ABA tem sido correlacionada com um aumento no acúmulo de deidrinas em sementes em resposta a esse hormônio (Bradford, 2004; Bohnert, 2000) e aumento da expressão de genes de enzimas antioxidantes (Guan & Scandalios, 1998).

Usando o mutante vp14 deficiente em ABA, In-Jeong et al. (2004) demonstraram que o ABA atua na manutenção da integridade da membrana plasmática por meio da prevenção de níveis altos de EAO durante o estresse hídrico nas radículas de plântulas de milho. Sob condições hídricas ideais, os níveis de EAO foram baixos nas plântulas mutantes e selvagens. Entretanto, sob condições de estresse hídrico, os níveis de EAO foram maiores nas radículas de cultivares mutantes, tendo havido uma perda da integridade da membrana na zona de crescimento das radículas desse mutante deficiente em ABA. Segundo os autores, esse aumento que ocorre de EAO em plântulas mutantes foi prevenido pela presença de ABA em plântulas normais.

Guan & Scandalios (1998) avaliaram o efeito do hormônio ABA na expressão de dois genes da enzima superóxido dismutase em embriões de milho sob condições de estresse osmótico. Essa enzima é encontrada em quase todos os organismos e catalisa a dismutação de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Os transcritos do gene *sod4* aumentaram em resposta ao estresse osmótico, em consequência do aumento do nível de ABA nos embriões em desenvolvimento e maduros. O aumento na transcrição desse gene pode ser devido, em parte, a mudanças metabólicas mediadas por ABA, levando a mudanças nos níveis de radicais livres e, conseqüentemente, na indução do sistema de defesa antioxidante.

Pelo exposto, nota-se que a tolerância à dessecação é um processo complexo, que envolve muitos fatores os quais interagem entre si, podendo a ausência ou ineficiência de um deles levar a diferentes graus e condições da tolerância (Rosa, 2000). Cada componente do mecanismo de tolerância à dessecação é igualmente crítico, agindo em sinergismo (Leprince et al., 1993), exigindo, dessa forma, estudos mais detalhados em nível genético.

2.3 Controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem

Em diversos trabalhos foi observada diferença na expressão fenotípica entre sementes de milho de plantas F_1 de híbridos e recíprocos, tais como peso seco do embrião e endosperma, tamanho de semente, proteína e óleo no embrião, síntese de zeína, germinação de sementes a baixa temperatura e tolerância a injúrias de secagem (Groszmann & Sprague, 1948; Bagnara & Daynard, 1983; Miller & Brimhall, 1951; Chaudhuri & Messing, citados por Kollipara et al., 2002; José et al, 2004a).

A comparação entre híbridos e recíprocos constitui uma excelente maneira de se estudar a herança de genes que se expressam diferentemente devido ao parental de origem (Kollipara et al., 2002). Entende-se por

cruzamento recíproco aquele em que o genitor é usado ora como fêmea, ora como macho. Desse modo, se a herança de um dado caráter é controlada por genes nucleares, os resultados de um cruzamento e de seu recíproco serão idênticos. Porém, se o caráter é devido a efeitos citoplasmáticos, os resultados dos cruzamentos terão sempre o mesmo fenótipo do genitor feminino, o qual contribui com o citoplasma. Esse tipo de herança pode ser explicado por dois mecanismos: o efeito materno e a herança extracromossômica (Ramalho et al., 1995).

No efeito materno, a herança é controlada por genes nucleares do progenitor feminino, sendo a expressão fenotípica de alguns caracteres do filho independente dos genes doados pelo pai. Contudo, é importante salientar que o efeito materno na expressão desses caracteres nos descendentes se dá apenas por uma ou, no máximo, duas gerações. Já na herança extracromossômica, a expressão fenotípica de alguns caracteres na progênie é controlada por genes situados no citoplasma, sendo que principais portadores desses genes nas plantas são as mitocôndrias e os cloroplastos (Ramalho et al., 1995).

Com o objetivo de estudar o controle genético para tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho por meio de um cruzamento dialélico parcial, utilizando características fisiológicas das sementes, José et al. (2004b) avaliou seis linhagens tolerantes e seis linhagens intolerantes à alta temperatura de secagem. O autor observou que, para sensibilidade à alta temperatura de secagem das sementes, parece haver efeito materno ou extracromossômico, conduzindo a outros mecanismos que possam estar influenciando nessa tolerância, como as características físicas do pericarpo, um tecido de origem materna.

Em cruzamentos recíprocos com dez linhagens de milho contrastantes para tolerância à dessecação e tolerância à baixa temperatura de germinação, Kollipara et al. (2002) observaram diferenças no padrão de expressão de

proteínas para as duas características estudadas em alguns cruzamentos. As proteínas que foram expressas diferentemente entre os híbridos e recíprocos foram classificadas em vários grupos funcionais, incluindo metabolismo de carboidratos e aminoácidos, transporte de elétrons, resposta ao estresse, chaperonas, associadas ao citoesqueleto, entre outras. Os autores também observaram que os genes de herança extracromossômica não apresentaram efeitos fenotípicos significativos.

Ibrahim & Quick (2001) verificaram que o efeito materno concorreu com 67% da variação recíproca para o controle genético para tolerância térmica em folhas de trigo, avaliados pela estabilidade térmica das membranas (MTS), por meio da avaliação de lixiviados em tecidos foliares após exposição a altas temperaturas. Em sementes de caupi (*Vigna unguiculata*), há efeito materno associado com a lixiviação de exsudatos e com a embebição de sementes (Ismail, et al., 1999).

Em sementes de *Arabidopsis*, Bentsink et al. (2000) observaram efeito materno para a produção de oligossacarídeos em sementes híbridas de cruzamentos recíprocos. Diferenças no conteúdo de rafinose foram observadas entre o híbrido e o recíproco, tendo os valores sido bem similares ao parental feminino, indicando efeito materno. Para o conteúdo de estaquiose, parece haver controle da herança, tanto por efeito materno quanto por genes cromossômicos. Porém, ao contrário desses açúcares, o conteúdo de sacarose nas sementes híbridas parece ter um efeito paternal, o que é inesperado e sugerindo que existe um controle genético mais complexo para o conteúdo de sacarose em sementes de *Arabidopsis*.

Características físicas do pericarpo, que é um tecido materno, também influenciam na taxa de secagem de sementes de milho (Burris & Navratil, 1980). Tracy & Galinat (1987) observaram que a espessura e a densidade das paredes das células no pericarpo podem afetar o grau de compactação, o que varia entre

as diferentes cultivares estudadas. Desse modo, a diferença na taxa de absorção e perda de água pelas sementes de milho vem sendo associada com a espessura e permeabilidade do pericarpo (Purdy & Crane, 1967) e foram relacionadas com a diferença na tolerância das sementes de milho à alta temperatura de secagem por José et al. (2005). Esses últimos autores observaram que diferenças na estrutura do pericarpo das sementes podem influenciar na tolerância das sementes de determinados genótipos a alta temperatura de secagem. Sementes de linhagens e de híbridos apresentando estrutura do pericarpo mais densa, formada por células mais compactas, foram mais sensíveis à alta temperatura de secagem, o que pode ter dificultado a dissipação de água das sementes, contribuindo para uma baixa qualidade fisiológica dessas sementes após secagem à alta temperatura.

Assim, o mecanismo de tolerância à dessecação é complexo, com mais de um fator contribuindo em diferentes graus e condições, exigindo, dessa forma, estudos em nível genético. Dessa forma, além dos testes fisiológicos e bioquímicos utilizados para a seleção de genótipos tolerantes à alta temperatura de secagem, os marcadores moleculares podem ser utilizados para a construção de mapas genéticos e identificação de genes ou alelos relacionados a essa característica.

2.4 Marcadores microssatélites

Nas últimas décadas, variações na sequência de DNA têm sido intensamente exploradas como marcador genético para o mapeamento do genoma de várias espécies. Contudo, a tendência atual é considerar como características desejáveis para o marcador molecular ideal, a alta informação por loco e a facilidade e a rapidez com que se obtêm tais informações (Ogliari, 1999).

A técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) é particularmente promissora para estudos genético-moleculares, devido à facilidade, à rapidez, à

versatilidade e à sensibilidade dessa classe de marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Uma das variações dessa tecnologia são os microssatélites, também conhecidos como SSR. ✕

Esses marcadores são baseados na amplificação de um a seis nucleotídeos, comumente repetidos de 10 a 60 vezes em tandem (Gupta et al., 1996). Em monocotiledôneas, é esperado um microssatélite a cada 65 Kb, enquanto nas dicotiledôneas, um microssatélite a cada 21 Kb. Em milho, estima-se que ocorra um microssatélite a cada 58 Kb (Lagercrantz et al., 1993; Wang et al., 1994). Recentemente, em muitos trabalhos, tem sido demonstrado que um grande número de SSRs está localizado em regiões de transcrição do genoma, como, por exemplo, em genes e em seqüências expressas identificadas (ESTs, *expressed sequence tag*) (Morgante et al., 2002). Porém, geralmente o número de repetições e o comprimento total desses SSRs nestas regiões são relativamente pequenos. Em cereais como o milho, trigo, cevada, arroz e sorgo, 1,5% – 7,5% dos ESTs contêm de SSRs (Kantety et al., 2002; Thiel et al., 2003; Li et al., 2004), tendo Kantety et al. (2002) observado que essa taxa varia entre 1,5% para milho a 4,7% para arroz. A presença de SSRs nos transcritos de genes conhecidos tem sugerido que esses influenciam a expressão ou função dos genes. Em arroz, por exemplo, no gene *waxy*, foi encontrado um microssatélite (CT)_n na região não transcrita 5', cujo comprimento do fragmento polimórfico está associado com a quantidade de amilose (Ayes et al., 1997; Bao et al., 2002).

Embora ocorra esta variação entre as espécies vegetais, 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 et al., 1994).

Os microssatélites podem ser classificados em três famílias: a primeira são as de “repetições puras”, em que os locos são formados por um único motivo repetido; na segunda, formada por “repetições compostas”, mais de um motivo

compõe o microsatélite e as "repetições interrompidas" formam a terceira família, na qual os motivos são intercalados por nucleotídeos que não fazem parte da unidade de repetição (Pinto et al., 2001).

Foi observado que microsatélites trinucleotídicos são menos frequentes que dinucleotídicos no genoma, sendo 57% dos microsatélites compostos por trinucleotídeos que contêm CG estão posicionados em regiões codificadoras no genoma. Já as repetições mono, di e tetranucleotídeos estão localizadas em regiões não codificadoras no genoma (Wang et al., 1994; Morgante et al., 2002). Segundo Morgante et al. (2002), o fato de os trinucleotídeos estarem presentes em regiões codificadoras mais do que qualquer outro motivo, pode ser resultado de seleção negativa contra mutações que alterem a fase de leitura em regiões codificadoras.

Apesar das repetições de dinucleotídeos constituírem a classe mais frequente e polimórfica de microsatélites (Chin et al., 1996), a amplificação de repetições de dinucleotídeos tem se mostrado vulnerável à formação das chamadas bandas *stutter*. Essas são também denominadas de bandas sombra ou produtos do deslizamento da DNA polimerase, e diferem, em tamanho, do alelo principal por um número a mais ou a menos de repetições. No caso dos locos de repetições dinucleotídicas, a banda *stutter* é menor, em dois nucleotídeos, que a banda correspondente ao alelo principal. Esse padrão de multibanda dificulta a interpretação dos locos nesse tipo de repetição (Walsh et al., 1996; Pinto et al., 2001).

~~Enquanto o número de repetições em tandem de um microsatélite é variável, as sequências de bases que flanqueiam o microsatélite são conservadas no mesmo loco entre diferentes indivíduos da mesma espécie. Assim, é possível desenhar um par de *primer* específico para essas sequências adjacentes, o qual pode ser utilizado para amplificar os microsatélites (Lanza et al., 2000; Sousa 2001). Na reação de PCR, cada fragmento amplificado de~~

tamanho diferente representa um alelo de um mesmo loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998). 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 (Pinto et al., 2001).

Os microssatélites possuem uma série de vantagens, sendo, por isso, frequentemente escolhidos para o mapeamento genético em eucariotos (Beckmann & Soller, 1990; Taramino & Tingey, 1996). Dentre as vantagens, podem-se destacar alta reprodutibilidade, herança mendeliana, codominância, distribuição casualizada 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. Essas vantagens fazem com que os SSRs sejam ideais para o mapeamento e detecção de QTLs, desde que existam informações sobre a sequência dos *primers* que amplificam os microssatélites (Chin et al., 1996; Powell et al., 1996; Souza, 2001; Grattapaglia, 2001).

A maior limitação dos microssatélites é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam as regiões altamente repetitivas ou os microssatélites. Essa etapa requer laboratórios com infra-estrutura para clonagem e seqüenciamento de DNA em larga escala, além do custo elevado dos reagentes necessário. No entanto, essas limitações estão sendo vencidas rapidamente, existindo um grande número de *primers* microssatélites disponíveis para diversas espécies vegetais. Para milho, encontram-se mais de 2000 *primers* SSR disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (www.maizegdb.org/ssr.php), e a grande maioria apresenta localização definida nos 100 bins presentes nos 10 cromossomos do milho. Os bins são regiões de aproximadamente 20 cM, delimitadas por marcadores de posição conhecida (Gardner et al., 1993), designados pelo número do cromossomo seguido por dois

dígitos decimais, que referem-se à localização relativa do bin dentro do cromossomo do milho.

Assim, com o mapeamento genético de marcadores microssatélites pesquisas de identificação de QTLs têm sido realizadas, uma vez que mapas genéticos saturados aumentam a precisão na localização e na quantificação dos efeitos das regiões genômicas que controlam caracteres de importância (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.5 Construção de mapas genéticos

Um mapa genético é uma representação simplificada do genoma, no qual a molécula de DNA de cada cromossomo é representada por marcas ordenadas e espaçadas. Para cada cromossomo, é obtido um conjunto de marcadores ligados entre si, cujo conjunto é denominado de grupo de ligação (Silva, 2002). Para a construção de um mapa genético, são necessários a avaliação do padrão de segregação dos marcadores em indivíduos segregantes, a determinação da distância entre eles e o ordenamento linear dos marcadores em cada grupo de ligação (Schuster & Cruz, 2004; Vuylsteke et al., 1999).

A ligação entre os marcadores nos grupos de ligação baseia-se na hipótese de que a co-transmissão dos marcadores reflete sua proximidade, uma vez que a probabilidade de ocorrer permutas genéticas entre dois marcadores é inversamente proporcional à proximidade física entre eles. Cada uma desses marcadores possui, então, um vínculo genético com a região cromossômica que ele representa. A determinação da ordem e da distância relativa entre os marcadores de um mesmo grupo de ligação constitui um dos principais objetivos do mapeamento genético (Silva, 2002).

A distância entre os marcadores é obtida por meio da frequência de recombinação, que é a probabilidade de ocorrência de permuta genética entre dois marcadores que, juntamente com o LOD score (*log of odds-ratio*), permite

agrupar todos os marcadores que pertencem a um mesmo grupo de ligação. O *LOD score* indica, na escala logarítima, o quanto da hipótese dos marcadores estarem ligados é maior do que não estarem ligados. Por exemplo, um LOD igual a 2 significa que a hipótese dos marcadores estarem ligados é 100 vezes mais provável do que a hipótese deles não estarem ligados. O ideal é que as distâncias usadas na construção de mapas genéticos sejam totalmente aditivas, de modo que, ao atribuir novos locos (marcadores) ao mapa, não seja necessário ajustar as distâncias já estabelecidas. Entretanto, as frequências de recombinação não são aditivas porque é provável que haja interferência, isto é, a ocorrência de uma permuta genética afeta a ocorrência de outras permutas em regiões adjacentes (Silva, 2002; Carneiro & Vieira, 2002).

A falta de aditividade das distâncias entre pares de marcas, expressas pela porcentagem de recombinação, proporciona certa dificuldade no agrupamento e ordenamento dos locos num grupo de ligação. Por isso, torna-se necessário utilizar procedimentos que permitam estabelecer a melhor ordem possível (Schuster & Cruz, 2004). Essas funções são utilizadas para a correção de distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para distâncias de mapeamento, levando em conta ou não o fenômeno de interferência (Liu, 1998). As funções de mapeamento mais conhecidas são as de Haldane (1919) e de Kosambi (1944). A função de Haldane admite a independência das permutas nos intervalos adjacentes, enquanto que a função de Kosambi considera a interferência (Schuster & Cruz, 2004). A unidade de medida de distância genética de mapa é denominada Morgan (M), que corresponde a um segmento cromossômico no qual ocorre, em média, uma permuta gênica por gameta por geração, sendo mais comum a utilização da unidade de centimorgans (cM).

É interessante observar que não existe uma correlação entre distância física (número de pares de bases) e distância de mapa. A relação Kb/cM (quilopares de base por centiMorgan) é muito variável, podendo ocorrer regiões

cromossômicas de apenas algumas dezenas de milhares de pares de bases (distância física pequena), em que a probabilidade de recombinação é alta (regiões-alvo de recombinação – *hotspots*). Ao mesmo tempo, há regiões de alguns milhões de pares de bases (distância física grande), em que a recombinação é praticamente suprimida e a distância entre os locos é mínima (Carneiro & Vieira, 2002). Para o genoma do milho, segundo Lynch & Walsh (1998) citados por Silva (2002), é estimado que contenha 1400 cM de extensão e que seja constituído de 3×10^9 pares de base (pb). Dessa forma, um cM equivale a $2,140 \times 10^6$ pb, em média.

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares (Carneiro & Vieira, 2002). Segundo esses autores, procedimentos, como o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), estudos de sentença e clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a representar complementos importantes a serem considerados em programas de melhoramento em diferentes espécies vegetais.

2.6 Detecção e mapeamento de QTLs

Grande parte dos trabalhos de melhoramento genético que têm utilizado marcadores moleculares é priorizada para caracteres de herança simples, uma vez que as variações fenotípicas são de fácil mensuração e análise (Lanza et al., 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, prolificidade, peso do grão, diâmetro, comprimento e altura da espiga, altura da planta, teor de óleo e de proteínas nos grãos, dentre outros, apesar de alguns caracteres quantitativos apresentarem distribuição discreta, tais como prolificidade, número de folhas e número de fileiras de grãos do milho.

Ao contrário da pré-suposição de que características quantitativas são influenciadas por muitos genes de pequeno efeito, Lande (1981) sugeriu que poucos genes poderiam explicar uma proporção relativamente grande da variação genética para tais características. Tais genes de efeito maior, são conhecidos como QTL (do inglês *quantitative trait loci*, ou caracteres de herança quantitativa) e, algumas vezes, não podem ser localizados individualmente. Porém, é possível a localização da região do genoma em que estes locos podem estar presentes, bem como estimar o quanto tais locos contribuem para a variação total do fenótipo. Assim, segundo Falconer & Mackay (1996), o que é identificado é um segmento do cromossomo, em que um ou mais genes relacionados a uma característica podem estar situados e não necessariamente um só loco.

QTLs podem ser encontrados com o auxílio de marcadores ligados (Lynch & Walsh, 1988). Esse procedimento, embora reconhecido há muito tempo, só tornou-se realmente viável com a disponibilidade de inúmeros marcadores de DNA (Schuster, 1999).

A determinação de ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência de um desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco marcador e alelos do QTL. Este desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados e estimados por meio de análises estatísticas. Desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as frequências genótípicas dos gametas diferem do produto das frequências dos alelos componentes, denotando a existência de uma associação significativa entre os dois locos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

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 mostra mais vantajoso do que outros delineamentos (Van der Beek et al., 1995). Por apresentarem o máximo desequilíbrio de ligação,

populações F_2 são comumente utilizadas em estudos de mapeamento de QTLs. Porém, como as medições das características são feitas em plantas individuais, há uma diminuição da precisão da estimativa. Este problema pode ser contornado pela utilização de populações $F_{2,3}$, em que as plantas são genotipadas na geração F_2 e as características são medidas em plantas F_3 , permitindo, assim, o uso de repetições (Schuster & Cruz, 2004).

Dessa forma, cruzamentos controlados visam maximizar o desequilíbrio de ligação possibilitando que marcadores sejam utilizados para acompanhar um alelo de interesse. Isso é possível se houver uma diferença na média do fenótipo entre as classes genotípicas do marcador, o que permite inferir que existe um QTL ligado a estes marcadores, significando que as classes genotípicas dos marcadores segregam em conjunto com os alelos de um QTL de interesse (Falconer & Mackay, 1996). Porém, segundo os autores, o número de QTLs detectados sempre é subestimado, uma vez que dois QTLs muito próximos podem aparecer como apenas um se eles estiverem em associação; ou mesmo não detectar os QTLs, se estes estiverem ligados em repulsão.

O teste para verificar se um QTL está ligado ao marcador é baseado na estatística da razão de verossimilhança (LR) entre hipótese H_1 , que se refere à presença de um QTL ligado ao marcador e H_0 , que se refere à hipótese de ausência de ligação de um QTL a esse marcador. A estatística de LR é interpretada como a probabilidade de ocorrência dos dados, sob a hipótese nula, a qual é testada usando uma distribuição teórica de qui-quadrado. As probabilidades da detecção e da estimativa da posição do QTL ligado estão acopladas. Se a razão de verossimilhança exceder o limiar crítico que foi criado para aquele cromossomo, isto fornece evidências de QTLs ligados à marca, sendo a posição estimada pelo pico da probabilidade do mapa. Se o pico não exceder o limiar crítico, não existem evidências para aceitar a presença de QTL na região (Churchill & Doerge, 1994; Doerge & Churchill, 1996; Lynch &



Walsh, 1998; citados por Silva, 2002). No mapeamento de QTLs é muito comum o uso do LOD score, que é obtido em razão dos valores de verossimilhança. Entretanto, segundo Schuster & Cruz (2004), o uso de LR é mais adequado quando se utiliza a estatística de qui-quadrado para testar as hipóteses.

Existem diferentes métodos propostos para a localização de QTLs, podendo a associação entre marcador e QTL ser avaliada utilizando-se uma, duas ou mais marcas simultaneamente. Na análise de marcas simples, a distribuição dos valores do caráter é examinada separadamente para cada loco 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 QTLs ligados à marca em detrimento da estimação da posição e dos efeitos do mesmo (Silva, 2001). Um problema dessa metodologia de análise, segundo Liu (1998), é a não distinção entre um QTL de pequeno efeito, situado muito próximo ao marcador, de um QTL de grande efeito, situado mais distante.

Uma outra análise mais detalhada seria o mapeamento por intervalo, proposto por Lander & Botstein (1989). A idéia 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 QTLs utilizados atualmente (Schuster & Cruz, 2004). Por esse mapeamento, estima-se a localização de um eventual QTL entre marcadores flanqueando um intervalo, ou seja, entre duas marcas adjacentes de um grupo de ligação (Lander & Botstein, 1989). Essa tem sido uma alternativa para aumentar o poder de detecção das associações, permitindo estimar o efeito e a posição dos QTLs. Porém, o mapeamento por intervalo simples apresenta problemas de detecção, especialmente quando houver outros QTLs de grande efeito no mesmo grupo. Assim, se houver mais de um QTL no grupo ou em outros grupos de ligação, as

análises serão afetadas por todos esses QTLs, o que diminui a precisão das estimativas e o poder do teste (Beazorti, 2000; Schuster & Cruz, 2004).

Assim, o ideal para o mapeamento de QTL seria que os testes realizados em um determinado intervalo fossem independentes dos efeitos de outros QTLs localizados fora deste intervalo, aumentando, assim, a eficiência na detecção de QTLs. A utilização de um teste desse tipo foi proposta por Jansen (1992; 1993) e Zeng (1993), o qual foi denominado de mapeamento por intervalo composto, sendo nomeado assim por combinar o mapeamento por intervalo com a análise de regressão múltipla (Schuster & Cruz, 2004). Dessa forma, além de proporcionar maior resolução no mapeamento, a análise por intervalo composto permite o uso de dados obtidos em vários ambientes, para avaliar os efeitos da interação QTLs vs. ambientes (Carneiro & Vieira, 2002).

Uma estratégia de grande potencial para a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres de interesse é a técnica de *bulk segregante* (BSA – *bulk segregant analysis*) ou análise de segregantes agrupados (ASA). Essa estratégia inicialmente foi proposta por Arnheim et al. (1985) e, posteriormente, foi modificada por Michelmore et al. (1991). O procedimento consiste em detectar diferenças entre duas amostras agrupadas de DNA obtidas de uma população segregante. Estas amostras agrupadas são construídas ao se misturar quantidades iguais de DNA de indivíduos selecionados com base na expressão fenotípica de um caráter para se ter um genótipo idêntico em uma região genômica de interesse (“região alvo”) e genótipos ao acaso em regiões não ligadas à região alvo. Assim, as duas amostras de DNA tendem a diferir somente na região selecionada e serão monomórficas para todas as outras regiões. A seleção de indivíduos para constituir as amostras agrupadas (*bulks*) é feita identificando-se os fenótipos extremos de uma população segregante para a característica de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Essa técnica, inicialmente proposta para análise de caracteres de herança simples, também pode ser utilizada na identificação de locos controladores de QTLs. Utilizando essa estratégia, Brunelli (2000) identificou dois marcadores microsatélites ligados a uma região (QRL) que confere resistência quantitativa à ferrugem polissora em milho. Esse método simplifica bastante a identificação de marcadores ligados a genes de interesse, pois não é preciso analisar toda a população com todos os marcadores, mas apenas com aqueles que se mostrarem polimórficos entre os dois *bulks*. Com esses marcadores e com alguns flanqueando esses genes, pode ser confirmada a ligação e determinada a distância genética entre o marcador e o gene estudado (Schuster, 1999).

2.7 Mapeamento de genes associados ao estresse hídrico e de temperatura em milho

Um grande número de genes com um efeito potencial, tanto na termotolerância quanto na tolerância de plantas e sementes a estresse hídrico, tem sido descrito e um maior entendimento das respostas moleculares a esses estresses tem sido obtido por meio da avaliação de tais genes. Além disso, as regiões genômicas onde se encontram os locos controladores dessas características vêm sendo alvo de diversos estudos, visando o conhecimento da magnitude dos efeitos e as interações desses genes ou QTLs.

Sari-Gorla et al. (1999) realizaram um trabalho com o objetivo de identificar as regiões cromossômicas onde estavam presentes os fatores que conferem tolerância ao estresse hídrico durante o desenvolvimento e florescimento de plantas de milho e comparar com os QTLs que controlam os caracteres de desenvolvimento e florescimento. Os caracteres avaliados foram períodos de florescimento masculino e feminino, peso da planta e intervalo entre a antese e a emissão do estilo estigma. Foi observado que todos os QTLs que conferem tolerância à seca estavam localizados em posições cromossômicas

diferentes daquelas onde se encontram os QTLs que controlam os caracteres estudados. Segundo os autores, isto sugere que a tolerância das plantas a seca não é atribuída a uma combinação alélica favorável para os caracteres avaliados, mas sim baseada em características fisiológicas as quais não estão associadas diretamente com o controle dos caracteres avaliados.

Análise de QTLs para tolerância à alta temperatura em plantas de milho foram realizadas por Ottaviano et al. (1991), que detectaram seis QTLs explicando cerca de 53% da variabilidade da termotolerância de membranas celulares em milho. Mais tarde, a mesma população foi avaliada, tendo sido encontrados cinco QTLs ligados à capacidade de germinação de grãos de pólen e seis QTLs ligados a crescimento de tubo polínico em alta temperatura (Frova & Sari-Gorla, 1993; Frova 1996).

Para as desidrinas, que vêm sendo associadas à tolerância à dessecação e se acumulam em plantas e sementes, pelo menos 30 diferentes genes foram identificados como membros do grupo 2 das LEA proteínas (Bray, 1993). Campbell et al. (1998) avaliaram gene *dhn1*, também chamado de *rab17*, mapeado no cromossomo 6 e que expressa uma proteína de 18 KDa e uma proteína do embrião de milho de 40 KDa, que ainda não havia sido estudada. Na análise das proteínas, foi observado que ambas possuíam composição típica de desidrinas, mas com algumas diferenças entre elas, indicando que as duas são produtos de genes *dhn* diferentes. Os autores também observaram efeito materno para a proteína de 40 KDa em alguns cruzamentos, uma vez que a progênie F₁ somente apresentava essa proteína quando o parental feminino a expressava. No mapeamento dos genes associados a essas proteínas, a posição da desidrina de 22KDa foi mapeada e confirmada como sendo produto do gene *dhn1* e o gene que codifica a desidrina de 40 KDa foi mapeado como um novo loco no cromossomo 9, identificado como *dhn2*.

Com o objetivo de analisar a associação entre alelos específicos de locos *dhn* e variações fenotípicas relacionadas à seca e às respostas a variações de temperatura, Close et al. (1999) mapearam diferentes membros da família de deidrinas em milho e cevada. Em cevada, 11 genes *dhn* foram mapeados e em milho, 8 locos foram mapeados nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 6 e 9. Segundo os autores, parece que a natureza dispersa e multigênica das deidrinas é universal em plantas superiores.

Mudanças nos padrões de expressão de proteínas em plantas e durante a maturação dos embriões também vêm sendo relacionadas com tolerância de plantas ao estresse hídrico e de sementes à dessecação. Em um estudo associando a abundância de proteínas induzidas pela seca, Vienne et al. (1999) encontraram três QTLs nos cromossomos 1, 4 e 8 ligados a essas proteínas. Um outro grupo com expressão diferencial sob condições de estresse é formado pelas HSP, que têm sido relacionadas com a termotolerância e tolerância à dessecação. A HSP 101, que é uma proteína ligada à termotolerância em bactérias, leveduras e eucariotos, tem sido acumulada em sementes de milho maduras (Nieto-Sotelo et al.; 2002). Esses autores mapearam essa proteína no cromossomo 6, próximo aos marcadores *umc132* e *npi280*. Adicionalmente, a região cromossômica próxima ao marcador *umc132* está envolvida com a sensibilidade à seca e com a concentração de ABA tanto no xilema quanto em folhas. Já a região ligada ao *npi280* está ligada à produção de grãos e aos seus componentes, como, por exemplo, tamanho da espiga e profundidade de grãos.

Uma característica ligada à estabilidade de membranas das células em plantas e sementes tolerantes à dessecação é a presença efetiva de um sistema antioxidante. Plantas e sementes são dotadas com numerosos sistemas de defesa de antioxidante, sendo que as sementes contêm quantidades grandes de tocoferol, ascorbato e glutathione, os quais podem funcionar como antioxidantes. Wong et al. (2003) utilizaram marcadores microssatélites para o mapeamento de

isômeros de tocoferol em uma família $F_{2:3}$ de milho, tendo sido identificados pelo método de mapeamento de intervalo composto, dois QTLs nos cromossomos 1 e 5, sendo a maior parte da variação fenotípica detectada nesse último cromossomo.

Os carotenóides fazem parte da biossíntese de ABA e compõem uma classe de antioxidantes presentes em milho, com quatro diferentes compostos predominantes no grão. Com o objetivo de identificar QTLs ligados à acumulação de carotenóides em milho, Wong et al. (2004) construíram um mapa com marcadores microssatélites em uma população $F_{2:3}$ de milho. Na análise de intervalo composto, foi possível identificar regiões cromossômicas com QTL, tendo o gene *yellow-1* sido mapeado no cromossomo 6 e o gene *viviparous-9* mapeado no cromossomo 7. Esses dois genes estão associados com enzimas que catalisam os passos iniciais da rota de carotenóides.

Uma característica morfológica que vem sendo relacionada com a tolerância das sementes de milho à alta temperatura de secagem é a estrutura do pericarpo (José et al., 2005). Wang & Brewbaker (2001) identificaram três QTLs afetando a densidade e espessura em sementes de milho nos cromossomos 1, 2 e 6, explicando, juntos, 37,3% da variação fenotípica.

Pelo exposto, pode-se observar que a tolerância à alta temperatura de secagem parece ser controlada por múltiplos genes, cuja identificação dos mesmos em sementes de milho é de grande interesse, por constituir uma importante estratégia em programas de melhoramento genético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG e também no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

3.1 Material genético

Em trabalho desenvolvido por José et al. (2004a), utilizando 31 linhagens cedidas pela empresa GeneSeeds – Recursos Genéticos em Milho Ltda, foram selecionadas 12 linhagens contrastantes quanto à tolerância das sementes à temperatura de secagem de 45°C, das quais seis linhagens foram classificadas como tolerantes e seis como sensíveis. O grupo das seis linhagens tolerantes foi formado pelas linhagens 30, 42, 40, 86, 65 e 91, designadas pelos números de 1 a 6, respectivamente. Já o grupo das seis linhagens sensíveis foi formado pelas linhagens 50, 57, 43, 41, 74 e 84, designadas pelos números de 7 a 12, respectivamente. Essas sementes, juntamente com as dos 36 híbridos F_1 provenientes dos cruzamentos entre as linhagens contrastantes foram obtidas por aquele autor e utilizadas no presente trabalho.

3.2 Multiplicação das sementes e obtenção das gerações F_2

Para a análise das sementes das 12 linhagens quanto à tolerância à alta temperatura de secagem e também para a produção de sementes das progênes F_2 de cada um dos 36 híbridos F_1 , foi conduzido experimento de campo entre outubro de 2001 e fevereiro de 2002. Sementes de cada linhagem e da progênie F_2 foram obtidas em 4 linhas de 5m com 5 plantas/m. Na época do florescimento, as espigas foram protegidas com sacos plásticos antes da emissão

dos estilo-estigmas, para evitar cruzamentos indesejáveis e, posteriormente, foram realizadas as autofecundações.

Durante o desenvolvimento das sementes foi feito um acompanhamento da solidificação do endosperma por meio da linha de leite e as espigas foram amostradas para a determinação do teor de água, utilizando-se o método da estufa a 130°C, por 4 horas, conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

As sementes das progênes F_2 de cada um dos 36 híbridos F_1 permaneceram no campo até aproximadamente 18% de umidade, quando foram colhidas manualmente em espigas e secadas à sombra até atingirem umidade em torno de 12%. Em seguida, as mesmas foram expurgadas e debulhadas manualmente. As sementes retidas na peneira 16 de crivo circular foram tratadas com os fungicidas Tecto 600® e Captan® nas doses de 40g e 120g do produto comercial por 100Kg de sementes, respectivamente. Em seguida, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca a temperatura de $\pm 10^\circ\text{C}$ e umidade relativa em torno de 50% até a próxima semeadura.

3.3 Secagem das sementes das linhagens

Sementes de cada uma das 12 linhagens foram colhidas em espigas, quando apresentavam teor de água de 35%. Após a colheita, as espigas foram despalhadas à mão e distribuídas nos secadores.

Os secadores utilizados foram construídos em madeira, de acordo com o modelo experimental de pequena escala descrito por Navratil & Burris (1982). Cada secador constitui-se de uma base, quatro gavetas empilháveis dotadas de encaixes especiais e um tampo. As paredes laterais da base e gavetas são construídas com uma folha de isopor de 20mm entre duas folhas de compensado de 10mm, para minimizar as trocas de calor com o meio ambiente.

Cada base de 61 x 61 x 61cm abriga um conjunto de resistências elétricas com capacidade de 3400 kW, cuja temperatura foi controlada por um termostato industrial microprocessado, marca Digimec modelo BTC-9090, com variação de temperatura de 10 a 100°C $\pm$ 3. A temperatura no leito de secagem foi monitorada de hora em hora, inserindo-se o termômetro nos orifícios existentes nas paredes das gavetas. Na base de cada secador, do lado externo, foi instalado um ventilador centrífugo, ligado a um motor de 0,25 kW, 115 V, capaz de elevar 196 L/seg a 7,6cm de pressão estática. O fluxo de ar foi ajustado para 23,00m³.min⁻¹.t⁻¹, por meio de uma porta graduada deslizável e fixada na entrada do ventilador. A base da cada gaveta, onde as espigas foram colocadas, constitui-se de uma malha de ferro que permite a livre passagem do ar de secagem.

As sementes foram submetidas à secagem a 45°C na massa, até atingirem teor de água entre 11% e 12%. Em seguida, sementes das linhagens foram debulhadas manualmente e aquelas retidas na peneira 16 de crivo circular foram tratadas com fungicidas como descrito anteriormente e avaliadas quanto à tolerância a dessecação pelos testes de germinação e de envelhecimento acelerado.

3.4 Avaliação da tolerância a altas temperaturas de secagem

3.4.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes, as quais foram semeadas entre papel toalha tipo Germitest umedecido com água destilada na proporção de 2,5mL.g⁻¹ de papel. As sementes permaneceram em germinador regulado para 25°C e as avaliações das plântulas normais foram efetuadas aos quatro e sete dias após a instalação do teste. Os

resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais das quatro repetições.

3.4.2 Envelhecimento acelerado

O teste foi realizado com o acondicionamento de sementes em mini-câmaras tipo “gerbox”, funcionando como compartimento individual, contendo, no seu interior, uma bandeja de tela de alumínio, onde as sementes foram distribuídas. No fundo de cada mini-câmara foram colocados 40mL de água e, a seguir, os “gerbox” foram mantidos incubados a 42°C por 96 horas. Decorrido o tempo de permanência na incubadora, as sementes foram colocadas para germinar.

A germinação foi realizada com quatro subamostras de 50 sementes, distribuídas em papel toalha umedecido com quantidade de água equivalente a duas vezes e meia o peso do substrato seco. As sementes permaneceram no germinador regulado para 25°C, sendo as avaliações realizadas aos quatro e sete dias após a semeadura. As plântulas foram consideradas normais quando apresentavam, pelo menos, 2cm de parte aérea, duas raízes seminais e a raiz principal.

3.5 Procedimentos estatísticos

Os testes realizados para avaliação da qualidade fisiológica das sementes seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Sisvar (Sistema de Análise de Variância) (Ferreira, 2000).

A partir dos resultados da qualidade fisiológica das sementes obtidos nesse primeiro ensaio, juntamente com os obtidos por José et al. (2004a), foi selecionada uma população para o estudo de mapeamento.

3.6 Avaliação fenotípica das famílias $F_{2,3}$

Um ensaio de campo foi implantado nos meses de fevereiro a junho de 2003, visando a verificação da distribuição fenotípica das famílias $F_{2,3}$. A parcela experimental foi constituída de uma linha de 5m com 5 plantas/m para as linhagens e para o híbrido F_1 e 8 linhas com as mesmas dimensões com as plantas da geração F_2 . O ensaio foi conduzido com duas repetições, totalizando 400 plantas F_2 e 50 para os demais tratamentos. Cada planta foi autofecundada e, das plantas da geração F_2 , foram produzidas sementes da geração $F_{2,3}$. As sementes foram colhidas com teor de água de 35% e os processos de secagem e de avaliação quanto à tolerância à dessecação, por meio do teste de envelhecimento, foram os mesmos descritos anteriormente, sendo que nesse último teste foram usadas quatro subamostras de 25 sementes por planta. O teste de envelhecimento foi escolhido pelo fato do mesmo ter sido indicado em outras pesquisas para a seleção de cultivares com sementes tolerantes à alta temperatura de secagem (José et al. 2004a). Esse autor também observou que por meio dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio sem solo e condutividade elétrica juntamente com o de envelhecimento acelerado, foi possível selecionar linhagens tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem.

3.7 Avaliação genética da população F_2 e fenotípica das famílias $F_{2,3}$

Este ensaio foi realizado visando à seleção de plantas com os extremos de tolerância para compor os grupos segregantes usados na análise de

polimorfismo dos marcadores microssatélites e para a geração da população de genotipagem. Para isso foi instalada, nos meses de outubro de 2003 a fevereiro de 2004, uma parcela experimental constituída de uma linha de 5m com 5 plantas/m para as linhagens e para o híbrido F_1 e 8 linhas com as mesmas dimensões para a geração F_2 . O ensaio foi realizado em duas repetições, totalizando 400 plantas F_2 e 50 para os demais tratamentos. Cada planta foi autofecundada, produzindo sementes da geração $F_{2,3}$. Cada planta individual foi identificada e foram coletadas folhas que ficaram armazenadas a -80°C . As sementes foram colhidas com teor de água de 35% e os processos de secagem e avaliação quanto à tolerância à dessecação foram os mesmos descritos anteriormente.

3.8 Análises estatísticas dos dados fenotípicos

As análises de variância para o envelhecimento acelerado das famílias $F_{2,3}$ obtidas na safra 2003 e na safra 2003/2004 foram realizadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = m + T_i + e_{(ij)}$$

Onde:

Y_{ij} : total da profênie i , na repetição j ;

m : média geral do experimento;

T : efeito aleatório do tratamento i ($i = 1, 2, \dots, s$);

$e_{(ij)}$: erro associado à observação Y_{ij} .

O esquema da análise de variância, bem como as esperanças dos quadrados médios estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 - Esquema de análise de variância utilizado nas análises individuais para as Famílias F_{2,3} nas safras 2003 e 2003/2004, considerando o delineamento inteiramente casualizado. UFLA, Lavras - MG, 2005.

FV	GL	QM	E(QM)
Tratamentos	GL ₁	Q ₁	$\sigma_e^2 + \sigma_{F23}^2$
Erro	GL ₂	Q ₂	σ_e^2

r: número de repetições; σ_e^2 : variância do erro; $\sigma_{F2,3}^2$: variância genética entre famílias F_{2,3}.

A partir dos quadrados médios obtidos nas análises de variância, foram estimadas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 1997), as variâncias fenotípica e genética e a herdabilidade no sentido amplo, para cada uma das duas safras, segundo as fórmulas:

$$\sigma_F^2 = \frac{QM_{Trat}}{r}$$

$$\sigma_G^2 = \frac{QM_{erro} - QM_{Trat}}{r}$$

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

Em que:

σ_F^2 : estimativa da variância fenotípica entre famílias;

σ_G^2 : estimativa da variância genética entre famílias;

QM_{Trat}: estimativa do quadrado médio de tratamentos;

QM_{erro}: estimativa do quadrado médio do erro;

r: número de repetições;

h_a^2 : estimativa da herdabilidade no sentido amplo.

3.9 Análises moleculares

3.9.1 Extração e quantificação do DNA genômico

Após análise dos resultados do teste de envelhecimento, foram selecionados, na população F₂, dois grupos com 10 plantas cada, para cada extremo de tolerante e não tolerante, para a avaliação do polimorfismo entre os *bulks*. Para a avaliação de polimorfismo entre as linhagens foram utilizadas cinco plantas de cada um dos genitores.

Assim, o DNA genômico foi extraído do material vegetal das plantas que estavam armazenadas a -80°C e a avaliação fenotípica quanto à tolerância à dessecação foi realizada com base nas sementes F_{2,3}. Esse procedimento foi adotado uma vez que em pesquisa realizada anteriormente por José et al. (2004b), foi observado que a tolerância à alta temperatura de secagem pode ser explicada pelo efeito materno.

Para a extração do DNA, as folhas foram maceradas em N₂ líquido até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, foram adicionados a 100 mg do tecido verde, 800 µL do tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%; 1M Tris-HCl pH 7,5; 0,5mM de EDTA pH 8,0; 5M NaCl) com adição de 2% de β-mercaptoetanol e incubado a 65°C por 90 minutos. Ao final deste período, foram adicionados 800 µL mL⁻¹ de mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foram invertidos gentilmente por 5 minutos para a obtenção de uma emulsão que, posteriormente, foi centrifugada a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado, e novamente foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo-se as mesmas condições até a centrifugação a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado, sendo adicionado isopropanol gelado na proporção de 1:1 para a precipitação dos ácidos nucleicos. Os tubos ficaram incubados a 4°C durante 2 horas e, posteriormente, foram centrifugados a 14000 rpm. O precipitado ficou

secando por cerca de 30 minutos e, então, foram adicionados 50µL de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) com 2µL de RNase (10mg mL⁻¹), mantendo-se a temperatura de 37°C por 1 hora . Após este período, o DNA foi precipitado com 100 µL de álcool etílico 95% e lavado com 100µL de etanol 70%. Após a eliminação do álcool etílico 70%, o precipitado foi secado e, posteriormente, diluído com 50µL de TE e o DNA foi quantificado em fluorímetro Hoeffer Scientific TKO100.

3.9.2 Marcadores SSR

A avaliação com marcadores SSR foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Inicialmente, os *primers* SSR foram avaliados entre as linhagens parentais e os dois *bulks* contrastantes para a seleção dos polimorfismos de interesse. Cada um dos *bulks* foi constituído pela mistura de DNA de folhas de 10 indivíduos da progênie F₂. Para esse estudo, foram utilizados 342 *primers* SSR, tendo 33 deles sido escolhidos por estarem ligados a genes que possuem funções semelhantes aos genes diferencialmente expressos entre sementes milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem, segundo Kollipara et al. (2002) (Quadro 1). Os demais *primers* foram selecionados com o objetivo de cobrir a maior extensão possível do genoma e flanqueando as regiões genômicas de interesse descritas por Kollipara et al. (2002). As seqüências de todos *primers* utilizados estão disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database*” (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

QUADRO 1 - Relação dos *primers* sintetizados com a localização e os genes detectados por esses locos SSRs. UFLA, Lavras-MG, 2005.

<i>Primers</i>	<i>Bins</i>	<i>Gene detectado</i>
phi056, phi097	1.01	<i>tub1</i> - beta tubulin 1
umc1021	1.03	<i>fad8</i> - fatty acid desaturase 8
umc1512	1.09	<i>cdj2</i> - chaperone DNA J2
phi011, phi055, phi094	1.09	<i>glb1</i> - globulin1
umc1065	2.05–2.06	<i>pbfl</i> - prolamin-box binding factor1
umc1010	3.09–3.10	<i>plt2</i> - phospholipid transfer protein homolog2
phi072, umc1008	4.01	<i>mtl1</i> - metallothionein1
phi074	4.04	<i>zp22.1</i> - zein protein 22.1
phi096	4.04; 5.03	<i>zp1</i> - zein alpha protein1
umc1610	4.10– 4.11	<i>Cpn10</i> - chaperonin10
umc1058	4.11	<i>Bip2</i> - Binding protein homolog2
umc1255	4.11	<i>Wee1</i>
phi006, phi019, phi076, umc1197	4.11	<i>cat3</i> - catalase3
umc1056	5.03	<i>px13</i> - peroxidase 13
umc1171	5.04	<i>incw1</i> - cell wall invertase1
phi070, umc1063	6.07	<i>mlg3</i> - lea protein group3
umc1545, umc1546	7.00	<i>hsp3</i> - heat shock protein3
phi112	7.01	<i>o2</i> - opaque endosperm2
umc1577	7.01	<i>his1a</i> - histone1a
umc1016	7.02	<i>kpp1</i> - kinase associated protein phosphatase1
phi115	8.03	<i>act1</i> - actin 1
phi071	10.04	<i>hsp90</i> - heat shock protein, 90 kDa
umc1053, umc1054	10.04	<i>incw3</i> - invertase cell wall3

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos

As reações de PCR consistiram de 10ng de DNA, 0,6 μ M de cada *primer*, 100 μ M de cada dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8,6), 50mM KCl, 2mM MgCl₂ e 1 U da enzima Taq polimerase, em um volume total de 10 μ L. As amplificações foram realizadas com uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, com a redução da temperatura de anelamento de 1°C a cada ciclo até atingir 60°C, seguidos por mais 25 ciclos com a temperatura de anelamento de 60°C e uma etapa final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 200 V por 1 hora. 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 com aproximadamente 100 mL da solução de revelação (NaOH 3%, formaldeído 0,5%). Então o gel foi mantido imerso sob agitação lenta em aproximadamente 900mL da solução de revelação até a completa visualização das bandas. Após o aparecimento das bandas os géis foram colocados novamente na solução fixadora. As imagens foram captadas pelo sistema Eagle Eye de fotodocumentação.

Após essa avaliação inicial, os *primers* que apresentaram polimorfismo entre as linhagens foram utilizados para genotipagem de 129 indivíduos da população F₂, tendo os métodos de extração, quantificação, amplificação e visualização do DNA para os demais indivíduos da população F₂ sido os mesmos descritos anteriormente.

3.10 Análise de ligação dos marcadores

As bandas polimórficas obtidas com os marcadores SSR foram codificados como 0 (alelo proveniente do parental susceptível a alta temperatura de secagem), 1 (indivíduo heterozigoto) e 2 (alelo proveniente do parental tolerante a alta temperatura de secagem). Marcadores com segregação mendeliana 1:2:1 pelo teste qui-quadrado ($P < 0,05$) foram mapeados com LOD $> 2,0$ usando o programa GQMOL (Cruz e Schuster, 2004). As distâncias no mapa em centiMorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi (Kosambi, 1944).

3.11 Detecção e mapeamento de QTLs

Os dados moleculares e as porcentagens do teste de envelhecimento acelerado foram associados por meio do modelo de regressão simples, utilizando o programa QTL Cartographer para Windows versão 1.21 (Basten et al., 2000). As associações foram consideradas significativas a um nível de probabilidade $P < 0,01$ e o coeficiente de determinação (r^2) foi interpretado como a estimativa da proporção da variância fenotípica explicada por cada marcador.

O mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1994) foi realizado utilizando-se as informações do mapa de ligação utilizando o programa QTL Cartographer para Windows versão 1.21 (Basten et al., 2000). O intervalo de precisão foi de 1cM, com uma distância de 10cM para controlar a interferência de múltiplos QTLs por meio de modelos de regressão *backward* e *forward*. A localização do QTL mais provável foi estimada pela função verossimilhança, sendo plotada uma curva em valores de LR para cada cM do genoma mapeado. O limite de significância foi determinado utilizando 1000 permutações ao acaso dos dados fenotípicos ($\alpha = 0,05$), segundo Doerge & Churchill (1996).

A ação gênica de cada QTL detectado foi determinada por meio das estimativas do grau de dominância ($d/[a]$) e classificadas segundo o critério proposto por Stuber et al. (1987): aditivo (A) = 0 a 0,20; dominância parcial (DP) = 0,21 a 0,80; dominância (D) = 0,81 a 1,20 e sobredominância (OD) > 1,20.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Multiplicação das sementes e obtenção das gerações F₂

Os dados de germinação e de envelhecimento acelerado das sementes das linhagens de milho submetidas à alta temperatura de secagem estão apresentados na Tabela 2. Houve diferenças nos valores de germinação e de vigor das sementes submetidas à secagem artificial a 45°C, o que está de acordo com as observações de José et al. (2004a).

A secagem das sementes de milho em espigas à temperatura de 45°C foi eficiente para a discriminação dos materiais quanto à tolerância à alta temperatura de secagem. Segundo José et al. (2004a), as grandes variações nos valores de vigor e de germinação das sementes que foram submetidas nessas condições de secagem reforçam a idéia de que a sensibilidade das sementes à alta temperatura de secagem varia com o genótipo.

De acordo com Seyedin et al. (1984), altas temperaturas de secagem podem resultar na hidrólise de amido no eixo embrionário das sementes durante os estágios iniciais do processo de secagem o que pode acarretar uma maior lixiviação de açúcares. O aumento dessa lixiviação em sementes secadas a uma alta temperatura pode ser um indicativo de dano na membrana, o qual pode ser associado a uma redução na emergência de plântulas (Chen & Burris, 1990).

Nessa pesquisa, foi possível observar diferentes valores de germinação e de envelhecimento acelerado entre as linhagens estudadas, porém pelo teste de envelhecimento houve maior discriminação entre as linhagens, tendo sido observada a mesma tendência no trabalho de José (2004a). Dessa maneira, esse teste foi escolhido para a discriminação de genótipos quanto à tolerância à alta temperatura de secagem nas populações de mapeamento.

TABELA 2 - Valores médios do teste de germinação (TG) e de envelhecimento acelerado (EA) de linhagens de milho, safra 2001/2002, colhidas com 35% de umidade e secadas artificialmente a 45°C. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Linhagens	Germinação (%)	Envelhecimento acelerado (%)
1	96 AB	81 BC
2	81 BCD	59 CDE
3	75 BCDE	71 BCD
4	49 FG	33 FG
5	98 A	100 A
6	40 G	16 G
7	68 CDE	68 CD
8	67 DE	64 CD
9	87 ABC	51 DEF
10	69 CDE	37 EFG
11	96 AB	92 AB
12	60 EF	9 G

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Com base nos resultados obtidos na avaliação da qualidade fisiológica das sementes das 12 linhagens secadas artificialmente no presente trabalho e confirmando os resultados obtidos por José et al. (2004a), a linhagem 12 com maior susceptibilidade à temperatura de secagem e a linhagem 5, com menor susceptibilidade foram selecionadas como materiais intolerante e tolerante à secagem a 45°C, respectivamente. Baseando-se nos resultados das estimativas dos efeitos recíprocos para o teste de envelhecimento acelerado observados por José et al. (2004b), a combinação híbrida 12/5 foi escolhida para a geração da população no estudo de mapeamento.

4.2 Avaliação fenotípica das famílias F_{2:3}

Nas Figuras 1 e 2 encontram-se a distribuição dos indivíduos da população F₂ de acordo com os resultados da porcentagem de germinação do teste de envelhecimento acelerado realizados nas famílias F_{2:3} de cada indivíduo nas safras 2003 e 2003/2004 respectivamente.

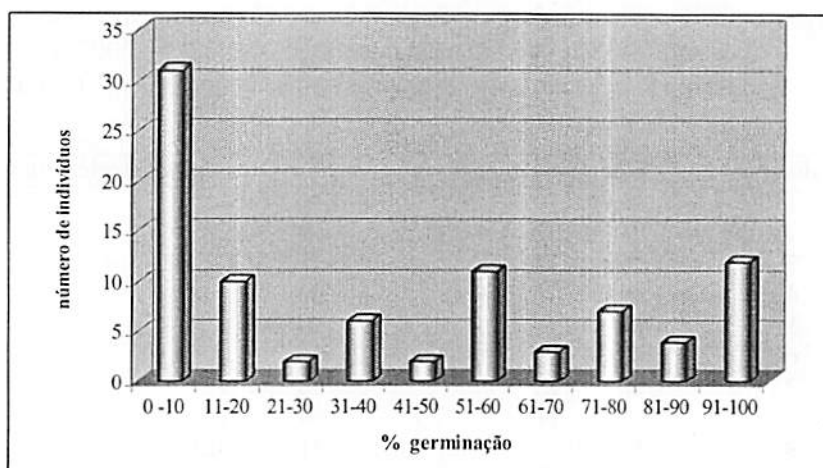


FIGURA 1 - Distribuição da população F_2 da combinação híbrida 12/5 da safra 2003 em 10 classes fenotípicas banseando-se nos valores percentuais de envelhecimento acelerado das sementes $F_{2:3}$. UFLA, Lavras, MG, 2005.

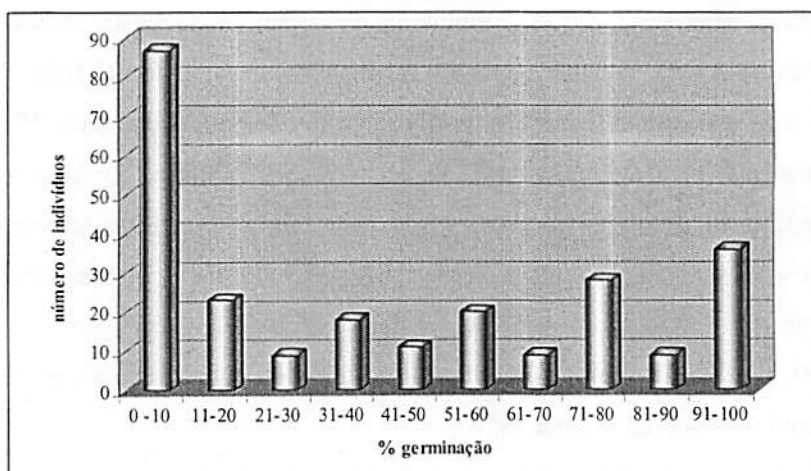


FIGURA 2 - Distribuição da população F_2 da combinação híbrida 12/5 da safra 03/04 em 10 classes fenotípicas banseando-se nos valores percentuais de envelhecimento acelerado das sementes $F_{2:3}$. UFLA, Lavras, MG, 2005.

As condições climáticas não foram semelhantes nos dois ensaios, uma vez que o primeiro foi realizado na safrinha, entre os meses de fevereiro a junho de 2003 e o segundo foi realizado nos meses de outubro de 2003 a fevereiro de 2004. Assim, as condições adversas de temperatura e de umidade relativa na safrinha provavelmente contribuíram para o baixo número de indivíduos obtidos no primeiro experimento.

Observa-se, pelas Figuras 1 e 2, que o comportamento das classes fenotípicas foi bastante semelhante entre as sementes produzidas nas safras 03 e 03/04, com uma maior concentração dos dados fenotípicos nas classes extremas. Essa distribuição não normal do vigor das sementes, com um maior número de indivíduos na classe considerada intolerante à alta temperatura de secagem pode ser um indicativo de herança oligogênica. Segundo Resende (2004), considerando a segregação de um gene maior e assumindo que a distribuição fenotípica de cada genótipo do gene maior seja normal, a distribuição resultante, ou seja, uma mistura de distribuições normais é geralmente não normal. Entretanto, segundo os autores, a simples rejeição de normalidade, por si só, não é suficiente para inferir sobre a presença de um gene de efeito maior.

Bradshaw Jr. et al. (1998) observaram uma distribuição não normal para a maioria das características florais estudadas em duas espécies de *Mimulus*. De acordo com os autores, a utilização de dados não normais, juntamente com o uso de uma população F_2 com 93 indivíduos, pode limitar a habilidade de identificar e estimar corretamente a magnitude dos efeitos de QTLs. 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. Entretanto, os autores abordaram que, segundo Churchill & Doerge (1994), a estratégia de mapeamento por intervalo com o uso de teste de permutação para a determinação do nível de significância para detecção do QTL minimiza a

identificação de falsos QTLs resultantes da utilização de dados fenotípicos com distribuição não normal em modelos estatísticos desenvolvidos para dados com distribuição normal. Tal afirmação também foi feita por Broman (2005).

Os valores estimados para herdabilidade no sentido amplo foram altos e semelhantes nas duas safras, variando de 98,29% a 99,18% (Tabela 3). Considerando que a herdabilidade não é apenas uma propriedade da característica, mas também da população e das condições ambientais a que foram submetidos os indivíduos, pode-se sugerir que houve pouca variação ambiental e, portanto, que a avaliação fenotípica para tolerância de sementes à alta temperatura de secagem utilizando o teste de envelhecimento acelerado apresenta alta eficiência.

4.3 Análise dos marcadores microssatélites

A partir dos resultados obtidos no teste de envelhecimento das sementes produzidas na safra 2003/2004, os 10 indivíduos mais tolerantes e os 10 indivíduos mais intolerantes foram utilizados para a formação de *bulks* segregantes para a análise inicial dos *primers*.

Dos 342 marcadores microssatélites testados entre as linhagens e os *bulks* segregantes, 117 (34%) foram polimórficos entre as linhagens genitoras, 163 (48%) foram monomórficos, 38 (11%) apresentaram produtos de baixa resolução no gel de acrilamida e 24 (7%) não apresentaram produtos de amplificação. Na Tabela 4, encontra-se a distribuição genômica dos marcadores microssatélites de acordo com os resultados da avaliação de polimorfismo entre as linhagens tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem.

TABELA 3 - Estimativas das variâncias genéticas (σ^2_g), fenotípicas (σ^2_f) e da herdabilidade (h^2) entre sementes de famílias $F_{2,3}$ de milho para o teste de envelhecimento acelerado. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Parâmetros	Safra 03	Safra 03/04
Cv (%)	9,21	10,68
σ^2_g	2,93	3,35
σ^2_f	2,96	3,37
h^2 (%)	99,19	98,28

A porcentagem de polimorfismo encontrada pode ser considerada intermediária, quando comparada aos valores de 23% relatados por Resende (2004), 25% por Sibov et al. (2003), 45% por Lopes (2003) e 50% por Ogliari (1999). A porcentagem dos locos de microssatélites que não amplificaram ou apresentaram baixa resolução também foi intermediária comparada aos valores de 10% encontrados por Matiello (2004) e 46% por Sibov et al. (2003). Os 18% dos marcadores que apresentaram problemas com a amplificação podem ser, em parte, devido à falta de otimização da temperatura de anelamento das reações de PCR. Entretanto, mesmo após a otimização da temperatura de anelamento, Sibov et al. (2003) ainda observaram 13% dos *primers* testados sem qualquer produto de amplificação.

Seis dos 342 marcadores SSRs avaliados ainda não possuem região cromossômica definida, não tendo nenhum desses seis marcadores apresentado locos polimórficos entre as linhagens parentais. Os marcadores testados foram distribuídos em 94 dos 100 bins do genoma do milho, não sendo amostrados os bins 1.12, 2.10, 4.02, 8.00, 9.00 e 9.08. No entanto, os 117 locos SSR polimórficos amostraram 67 bins, tendo todos os cromossomos apresentado pelo menos cinco locos polimórficos (Tabela 1A).

TABELA 4 - Distribuição cromossômica do número de locos microsatélites polimórficos, monomórficos, de baixa resolução e não amplificados testados entre as linhagens genitoras e número de locos genotipados na população de mapeamento. UFLA, Lavras, MG. 2005.

Loco marcador	Cromossomo										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Polimórfico	16	15	14	10	12	19	11	8	5	7	117
	40%	36%	38%	30%	35%	43%	32%	35%	21%	28%	
Monomórfico	20	22	17	18	15	20	18	9	8	13	160
	50%	52%	46%	55%	44%	46%	53%	39%	33%	52%	
Baixa resolução	4	3	3	3	5	2	3	5	5	3	36
	10%	7%	8%	9%	25%	5%	9%	22%	21%	12%	
Sem amplificação	0	2	3	2	2	3	2	1	6	2	23
	0%	5%	8%	6%	6%	6%	6%	4%	25%	8%	
Total	40	42	37	33	34	44	34	23	24	25	336
Genotipados	11	10	9	6	8	14	7	4	4	4	77

Pelas Tabelas 1A e 4, observa-se que o maior número e percentagem de locos polimórficos foram localizados no cromossomo 6, especialmente na região compreendida entre os bins 6.04-6.07. A menor percentagem e número de marcadores ocorreu no cromossomo 9, que também apresentou uma alta percentagem de locos com baixa resolução e sem amplificação.

Dos mais de 2.000 microsatélites disponíveis para milho, 183 foram desenvolvidos a partir de seqüências de 118 genes conhecidos (www.agron.missouri.edu/ssr.html). Das 342 seqüências avaliadas nesse estudo, 85 *primers* são derivados de 58 genes, tendo sido observadas diferenças na análise de polimorfismos entre os marcadores derivados de genes com relação aos demais marcadores. Quando se compara o nível de polimorfismo entre os *primers* SSR localizados em regiões não codificantes e aqueles derivados de genes, observa-se que existe uma redução de 38% para 24% do polimorfismo (Figura 3). Entre os 85 *primers* derivados de genes, 33 foram escolhidos por estarem ligados a genes cujos produtos de expressão possuem funções semelhantes aos genes expressos diferencialmente entre sementes de milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem no trabalho de Kollipara et al. (2002). Esses *primers* apresentaram 68% de monomorfismo e 26% de polimorfismo. Tenaillon et al. (2002) observaram que, dentre os 47 microsatélites encontrados no cromossomo 1 do milho, 33 apresentavam-se polimórficos, dos quais 30 estão localizados em regiões não codificadoras desse cromossomo.

Foram detectadas diferenças nos níveis de polimorfismos entre as classes de repetições de nucleotídeos dos microssatélites. Os maiores valores de polimorfismos foram encontrados entre os dinucleotídeos e os penta e hexanucleotídeos. Os tetranucleotídeos e as repetições imperfeitas apresentaram 34% e 33% de locos polimórficos, tendo estes valores sido intermediários aos polimorfismos encontrados para os trinucleotídeos (23%) e dinucleotídeos (41%) e penta ou hexanucleotídeos (40%) (Figura 4). Essas diferenças foram mais acentuadas com os marcadores com repetições de trinucleotídeos, os quais demonstraram um menor valor de polimorfismos e um valor superior de monomorfismo que as demais classes de marcadores. O percentual de microssatélites com baixa qualidade na amplificação e que não amplificaram variou entre 14% e 20% em todas as classes analisadas, sendo o menor valor representado pela classe dos penta ou hexanucleotídeos e o maior valor pela classe dos marcadores imperfeitos.

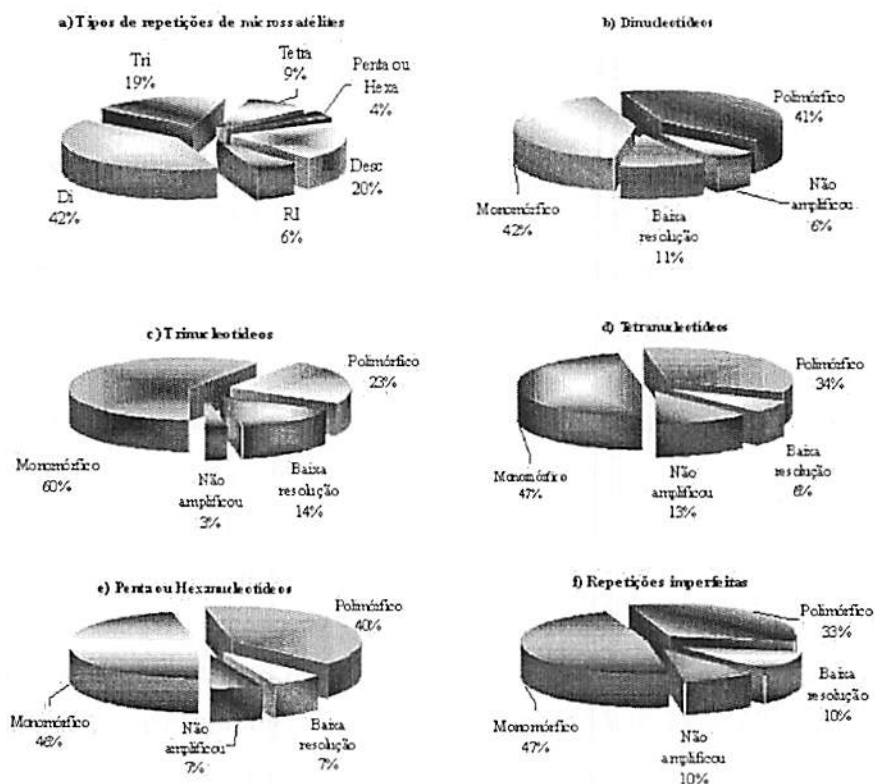


FIGURA 4 – Frequência de distribuição dos resultados de amplificação. (a) Distribuição dos tipos de repetição de nucleotídeos de 342 microssatélites (b – f) resultados das repetições de dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, penta ou hexanucleotídeos e repetições imperfeitas, respectivamente. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Esse baixo percentual de polimorfismo dos trinucleotídeos em relação às demais classes de nucleotídeos pode explicar, em parte, o menor valor de polimorfismo encontrado nos microssatélites derivados de genes, uma vez que essa classe de repetição representa o maior percentual de repetições nucleotídicas encontradas nesses marcadores. Morgante et al. (2002) destacaram que os trinucleotídeos são classes de microssatélites menos frequentes que os dinucleotídeos no genoma total, mas, em regiões codificantes, parece ocorrer o inverso, ou seja, sequências microssatélites formadas por trinucleotídeos são mais comuns do que as outras classes. Segundo os autores, é possível que isso resulte da seleção negativa contra as mutações que alteram a fase de leitura em regiões codificantes. Kantety et al. (2002) observaram que de 983 ESTs de milho que possuíam microssatélites, 534 continham repetições de trinucleotídeos, 291 com dinucleotídeos e 136 repetições eram de tetranucleotídeos. Para diferentes espécies de cereais, a porcentagem de di, tri e tetranucleotídeos repetidos na coleção de ESTs foram de 19%, 72% e 9%, respectivamente.

Além de serem mais frequentes em microssatélites, Chin et al. (1996) afirmam que os dinucleotídeos são também a classe mais polimórfica. Uma das razões para um maior polimorfismo dessa classe seria a maior taxa de alelos por loco que ocorre nos marcadores com esse tipo de repetição. Liu et al. (2003) observaram que locos dinucleotídeos possuem uma significativa maior taxa de alelos (23,9) do que locos com três repetições ou mais repetições (9,9). Entretanto, é interessante observar que, no presente trabalho, os dinucleotídeos apresentaram um valor de polimorfismo similar aos penta ou hexanucleotídeos. Valores similares de polimorfismo entre dinucleotídeos e outras classes de repetições em microssatélites de milho também foram encontradas por Sharopova et al. (2002) e Sibov et al. (2003). Os dinucleotídeos e

pentanucleotídeos de 1.051 marcadores desenvolvidos por Sharopova et al. (2002) apresentaram 74% de polimorfismo e os trinucleotídeos e tetranucleotídeos apresentaram 52% e 81% respectivamente. Sibov et al. (2003) observaram valores de 26%, 20%, 29% e 16% para os dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos e penta ou hexanucleotídeos respectivamente. Observa-se que os valores de polimorfismo das diferentes classes demonstrados na presente pesquisa, são intermediários aos encontrados por esses autores.

À semelhança dos resultados observados por Resende (2004), nenhum par de *primers* revelou polimorfismo entre os *bulks*. Segundo Michelmore et al. (1991), a detecção de QTLs por meio de análises de *bulks* é possível quando os alelos dos marcadores que estão associados aos alelos dos QTLs estão distribuídos de forma desigual. Porém, essa ausência de polimorfismo pode ser um indicativo de que os QTLs estariam a uma distância maior do que 30 cM dos marcadores testados, uma vez que, por meio desse método, não se consegue detectar associações que estejam ligadas a distâncias maiores do que esta (Michelmore et al., 1991). Além disso, no método de análise de *bulks* segregantes não se detecta QTLs de pequeno efeito, pois, na composição dos *bulks*, apenas as regiões com forte influência no caráter estarão sendo amostradas, em detrimento daquelas de pequeno efeito (Lynch & Walsh, 1998). Resultados de falso positivos ou falso negativos na identificação de QTLs podem ocorrer devido à distorção da segregação mendeliana, uma vez que essa pode afetar a composição de DNA nos *bulks*, sendo necessário, assim, o uso de mais indivíduos nos *bulks* quando ocorre uma maior taxa de distorção de segregação (Wang & Paternson, 1994).

Os 117 marcadores polimórficos entre as linhagens foram avaliados em 129 indivíduos dos 250 indivíduos da safra 2003/2004. Esse número de indivíduos foi escolhido devido à adequação do número de amostras possíveis de serem analisadas de uma só vez no sistema de cubas utilizado na presente



pesquisa, como também devido à dificuldade de se obter DNA de boa qualidade extraídos das folhas armazenadas a -80°C . Essa obtenção de DNA de folhas armazenadas com menor qualidade também foi relatada por Ramos (2004). O autor observou que o DNA de sementes estava em melhor estado de conservação em relação ao DNA extraído de folhas armazenadas, sendo, dessa forma, o escolhido para as análises. Segundo o autor, provavelmente a semente, por ser uma estrutura de multiplicação vegetal, oferece maior proteção ao material genético contido no interior de suas células, uma vez que uma de suas funções é garantir a perpetuação da espécie, mesmo em condições de estresse. Assim, o baixo conteúdo de água, a inativação enzimática e o metabolismo desacelerado resultam na menor presença de enzimas oxidativas que aceleram a degradação do DNA.

Dentre os marcadores polimórficos avaliados, 40 apresentaram problemas de resolução ou ausência de amplificação durante a genotipagem, culminando com a análise de 77 marcadores quanto à sua segregação na população (Tabela 4).

Vale ressaltar que a ausência de amplificação que ocorreu em alguns indivíduos da população para alguns *primers* pode ser devido à falta de otimização da temperatura de anelamento das reações de PCR, uma vez que foi utilizado somente um padrão de reação de PCR no presente estudo. Possivelmente uma variação na temperatura de anelamento, de acordo com as especificações para o marcador analisado, permitiria que um maior número de marcadores fosse usado na análise de segregação dos marcadores.

Por meio dos testes de aderência das proporções genotípicas ao modelo de segregação mendeliana dos 77 locos polimórficos, 59 apresentaram a segregação mendeliana esperada de 1:2:1, utilizando a proteção de Bonferroni a 5% de probabilidade (Tabela 6). Esse valor representa 23% de marcadores com

TABELA 6 - Marcadores que apresentaram segregação mendeliana na população F₂, pelo teste de qui-quadrado (χ^2), utilizando a proteção de Bonferroni. A hipótese testada é a segregação 1:2:1. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Marcador	Classes			Qui-quadrado	Prob
	0	1	2		
bnlg105	34	37	23	6.83	3.288
bnlg1182	19	41	24	0.643	72.5112
bnlg131	13	37	35	12.812	0.1652
bnlg1496	23	37	27	2.31	31.5003
bnlg1520	24	60	20	2.769	25.042
bnlg1588	22	42	18	0.439	80.291
bnlg161	30	44	16	4.4	11.0803
bnlg162	32	43	25	2.94	22.9925
bnlg1740	26	53	21	0.86	65.0509
bnlg1811	24	49	12	5.376	6.8001
bnlg2077	30	41	19	3.4	18.2684
bnlg2291	21	61	23	2.829	24.3099
bnlg238	29	50	26	0.41	81.4841
bnlg240	20	40	22	0.146	92.9442
bnlg278	29	43	32	3.288	19.3161
bnlg345	34	54	14	8.196	1.6605
bnlg439	26	57	16	4.293	11.6897
bnlg589	29	43	30	2.529	28.2322
bnlg615	24	38	29	3.022	22.0692
mace01f06	20	40	25	0.882	64.3279
mage05	24	28	31	9.964	0.6861
mmc0041	28	41	23	1.63	44.2543
mmc0071	23	43	27	0.871	64.6952
mmc0231	27	49	20	1.063	58.787
nc003	17	52	25	2.426	29.7374
nc013	31	47	16	4.787	9.1299
phi011	29	46	24	1.0	60.6531
phi014	24	45	21	0.2	90.4837

0: código para representar indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do proveniente genitor intolerante.

1: código para representar indivíduos heterozigóticos

2: código para representar indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do proveniente genitor tolerante.

Prob: não significativo a 5% de probabilidade.

“...Continua...”

"TABELA 6, Cont"

Marcador	Classes			Qui-quadrado	Prob*
	0	1	2		
phi050	34	40	28	5.451	6.5514
phi054	24	30	34	11.182	0.3732
phi059	30	42	21	2.613	27.0779
phi065	25	33	31	6.753	3.417
phi072	40	36	21	13.887	0.0965
phi085	28	47	20	1.358	50.7151
phi116	26	44	22	0.522	77.0381
phi120	26	46	32	2.077	35.3999
phi452693	17	63	22	6.137	4.6485
umc1006	27	36	34	7.454	2.407
umc1007	34	45	24	3.583	16.675
umc1013	26	49	31	1.075	58.4069
umc1014	27	51	22	0.54	76.338
umc1019	30	36	36	9.529	0.8525
umc1025	23	49	22	0.191	90.8696
umc1029	39	41	15	13.905	0.0956
umc1031	31	40	20	3.989	13.6081
umc1033	22	41	26	0.91	63.4412
umc1035	32	34	23	6.775	3.3788
umc1037	24	48	27	0.273	87.2525
umc1066	37	42	14	12.247	0.219
umc1076	16	51	22	2.708	25.8223
umc1320	16	57	30	4.981	8.2886
umc1528	25	39	35	6.475	3.9267
umc1594	32	38	26	4.917	8.5577
umc1635	25	44	28	1.021	60.031
umc1653	17	53	29	3.404	18.2315
umc1805	17	53	18	3.705	15.688
umc1875	24	49	30	0.942	62.4456
umc2030	32	42	14	7.545	2.2989
umc2059	23	49	21	0.355	83.7429

0: código para representar indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do proveniente genitor intolerante.

1: código para representar indivíduos heterozigóticos

2: código para representar indivíduos homozigóticos para o alelo marcador do proveniente genitor tolerante

Prob: não significativo a 5% de probabilidade.

distorção na segregação, o qual é superior ao demonstrado por Resende (2004), que encontrou uma distorção de segregação mendeliana em apenas 11,3% dos marcadores avaliados. Porém, tais valores são inferiores aos observados por Sibov et al. (2003), que encontraram 28% dos marcadores com distorção na segregação mendeliana e bem menores do que os 50% desses marcadores encontrados por Nikaido et al. (2000). Segundo esses últimos autores, uma possível causa dessa distorção foi relatada por Nikaido et al. (1999), que observaram uma sobreposição de bandas entre os parentais avaliados.

A ausência de bandas claramente distinguíveis na população também foi observada no presente trabalho, o que dificultou a correta identificação de fragmentos de microssatélites. Foi possível observar que microssatélites que apresentavam pequenas diferenças de tamanho entre os parentais durante a avaliação inicial dos *primers* e *bulks* dificultaram a avaliação dos mesmos durante a genotipagem da população. Isso se deve ao fato de que as bandas do heterozigoto muitas vezes apareciam como uma só banda, devido à sobreposição de fragmentos de tamanhos bastante semelhantes, dificultando, assim, a visualização e a avaliação das bandas na população.

Segundo Melo (2000), as causas para um marcador não apresentar segregação mendeliana são i) erro tipo I, ou seja, considerar que um marcador não tem segregação mendeliana, quando, na realidade, ele tem; ii) a ausência de bandas devido às falhas nas reações, iii) presença de bandas fantasmas devido a impurezas nos componentes da reação, iv) efeito de seleção sobre a característica a que o marcador está ligado. A seleção pode levar a uma representação diferencial de regiões do cromossomo que causam distorção na taxa de segregação e, segundo Oka (1989), nas gerações F_2 a seleção gamética é o fator que mais influencia na distorção da segregação mendeliana.

Desvios da taxa de segregação devido às falhas de avaliação dos genótipos levam a um erro de distorção em marcadores individuais. Porém, se

essa distorção é causada por um loco que possui distorção da segregação mendeliana, todos os marcadores vizinhos a este loco serão afetados (Vogl & Xu, 2000). A seleção de um ou mais genes na vizinhança deste loco é uma possível explicação para esses agrupamentos com taxas de segregação distorcidas (Sibov et al., 2003).

Observou-se no presente trabalho, que 10 dos 18 marcadores que apresentaram segregação não mendeliana possuíam ausência de bandas de um dos parentais durante a genotipagem dos *bulks* segregantes. Desses 10 marcadores, 3 estão localizados no bin 5.04, com a segregação distorcida em favor do parental feminino.

Locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação, podendo gerar falsos positivos. Assim, é recomendado o descarte desses locos para não comprometer a qualidade do mapa (Yao et al., 1999; Bearzoti, 2000; Liu, 1998 citados por Carneiro & Vieira, 2002). Por essa razão, no presente trabalho, apenas os 59 marcadores com segregação mendeliana foram utilizados na construção do mapa de ligação.

4.4 Construção do mapa genético

Dos 59 marcadores mendelianos, 39 foram agrupados e ordenados, gerando 10 grupos de ligação. No entanto, esses 10 grupos de ligação não estão associados aos cromossomos de milho, uma vez que o cromossomo 6 foi fragmentado em três grupos de ligação e os cromossomos 4 e 10 não foram amostrados no mapa (Figura 5). Com isso, nota-se que os marcadores não foram em número suficiente para saturarem todos os cromossomos do milho. Certamente, o aumento na saturação desse mapa em trabalhos posteriores resultará em uma cobertura mais representativa de todo o genoma do milho.

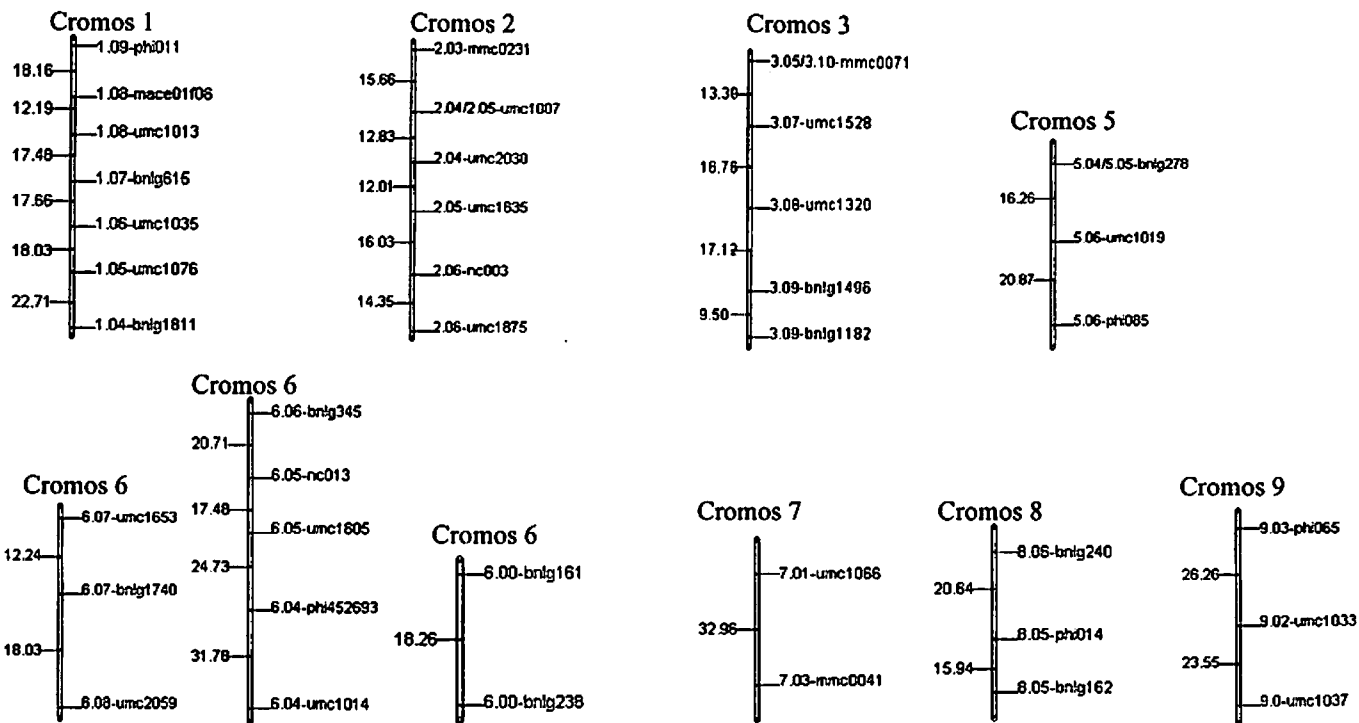


FIGURA 5 – Mapa de ligação mostrando a localização de 39 marcadores microssatélites baseados no cruzamento entre as linhagens 12 e 5. O nome dos locos encontra-se à direita de cada cromossomo, logo após, o bin correspondente ao loco. A distância genética entre marcadores adjacentes, no lado esquerdo do cromossomo, está em centiMorgam, (cM). UFLA, Lavras, MG, 2005.

O número médio de marcadores por grupo de ligação foi de 3,9, variando de dois a sete marcadores por grupo de ligação. O comprimento médio dos grupos de ligação foi de 50,3cM, sendo o menor de 18,3cM e o maior de 106,2cM. Os marcadores ligados cobriram 502,7cM do genoma do milho, com uma média de um marcador a cada 12,9cM. O menor intervalo entre dois marcadores foi de 9,5cM e o maior intervalo foi de 33,0cM. Apesar da deficiência na amostragem de algumas regiões do genoma, o espaçamento entre marcadores foi adequado às análises de mapeamento por intervalo. Nessas condições, essa metodologia se mostra eficiente, uma vez que o maior benefício do mapeamento por intervalo em relação às marcas simples ocorre quando os marcadores estão distanciados entre 20 e 35cM. Para distâncias menores que 20cM, não existe diferença entre as metodologias, ao passo que, para aquelas maiores que 35cM, nem mesmo o mapeamento por intervalo é eficiente (Lander, 1993; Doerge, 1993; citados por Coelho, 2000). A ordem dos marcadores ao longo dos grupos de ligação está perfeitamente de acordo com o mapa consenso *IBM neighbors* publicado no *Maize Genetics and Genomics Database* (2005).

4.5 Identificação de marcadores moleculares associados a QTLs

A metodologia de mapeamento por intervalo composto para a detecção de QTLs permite a análise de cada cM do genoma mapeado, além do controle das interferências de QTLs ligados no mesmo cromossomo. Assim, apenas os marcadores que foram mapeados nos grupos de ligação gerados pelo programa Gqmol foram utilizados nesse processo de mapeamento. Os marcadores que não se ligaram a nenhum grupo foram excluídos dessa análise, o que levou à utilização de somente 39 marcadores na análise de intervalo composto.

A análise de regressão linear simples também foi utilizada para testar a significância da associação entre QTLs e marcadores. Semelhante ao método anterior, o mapeamento de QTLs foi realizado com a utilização do programa

QTL Cartographer para Windows. Assim, os marcadores não ligados puderam ser avaliados pela análise de regressão linear simples. Desses marcadores, somente para o umc1029, localizado no bin 7.04 houve uma associação significativa entre o marcador e QTL. Os demais marcadores significativamente associados à QTLs pela análise de regressão linear simples se encontram agrupados nos grupos de ligação que foram utilizados na análise de intervalo composto.

Por meio do mapeamento por intervalo composto, foram mapeados três QTLs associados com a tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem, sendo estimadas suas contribuições na variância fenotípica, seus efeitos e ação gênica (Tabela 7 e Figura 6). A característica fenotípica usada para avaliar essa tolerância em sementes de milho foi a porcentagem de germinação das sementes após o processo de envelhecimento acelerado. Os gráficos dos valores de LR ao longo dos grupos de ligação nos quais foram identificados QTLs são apresentados na Figura 6.

TABELA 7 - Posição, porcentagem de variância fenotípica (Vf), efeitos e ação gênica dos QTLs associados à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem, por meio do mapeamento de intervalo composto e regressão simples. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Posição	Mapeamento por intervalo composto							Marca simples			Ação gênica
	LR			Vf (R ²)	Efeitos gênicos			F	Prob.	Vf (R ²)	
	Marca	Significância	Máxima		a	d	(d/a)				
6.05	nc0013	11.35	11.79	10.61	-17.62	15.77	0.89	7.75	0.006**	7.63	Dominante
6.08	umc2059	8.72	10.27	10.05	17.69	4.11	0.22	10.26	0.002**	9.97	Aditivo
8.05	phi014	8.64	9.70	14.1	12.21	23.64	1.9	6.27	0.02*	5.36	Sobredominante

** significativo a 1% de probabilidade;

* significativo a 5% de probabilidade;

LR: razão da verossimilhança.

Significância: limite determinado por 1.000 permutações ao acaso dos dados fenotípico para cada cromossomo.

r²: proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL

a: efeito aditivo; d: efeito de dominância; d/[a]: grau de dominância

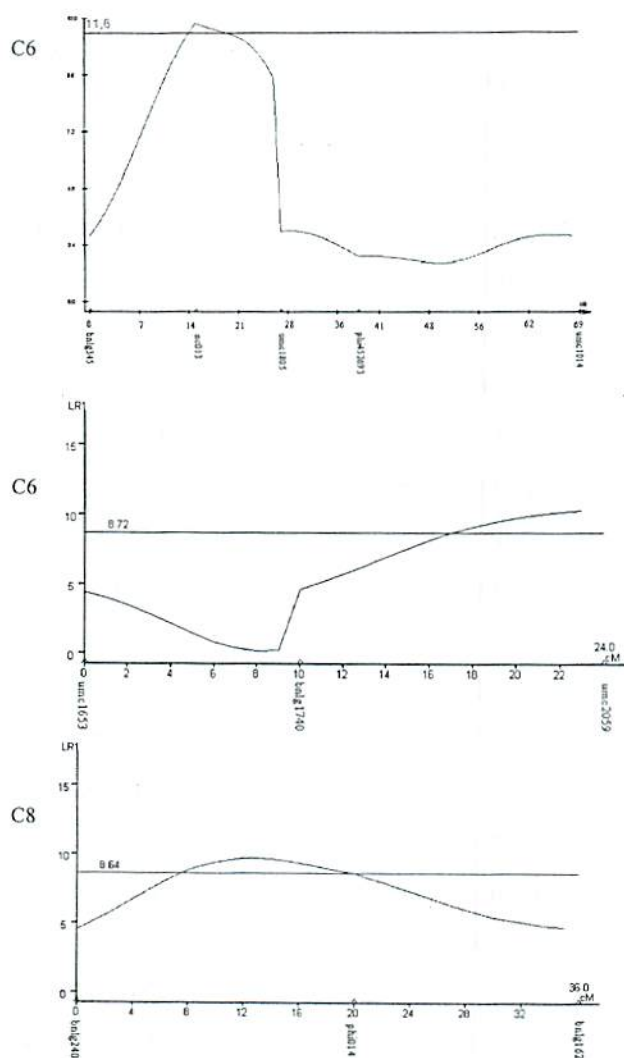


FIGURA 6 - Mapeamento por intervalo composto, indicando a presença de QTLs associados com a tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem nos cromossomos 6 (QTL₁, QTL₂) e 8 (QTL₃). A curva representa os valores de LR calculados para cada cM do cromossomo. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Pela análise de intervalo composto, os QTLs explicaram conjuntamente 39% da variação fenotípica quanto à tolerância à alta temperatura de secagem. Considerando o grau de dominância ($d/[a]$) dos três QTLs detectados, observa-se que foram detectados efeitos aditivos, de dominância e de sobredominância. Tais resultados estão de acordo com José et al. (2004b), que estudaram o controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho utilizando 12 linhagens, incluindo as utilizadas na presente pesquisa. Os autores observaram que os efeitos da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, bem como os efeitos recíprocos, foram significativos para a tolerância à alta temperatura de secagem, indicando a presença de genes de efeitos aditivos e não aditivos no controle genético para a tolerância a essa característica, tendo os efeitos genéticos aditivos sido mais importantes na determinação do caráter.

Em uma interação alélica aditiva cada alelo contribui com um pequeno efeito fenotípico, o qual é somado aos efeitos dos demais alelos. Em um processo de melhoramento em que predomina esta interação, a seleção é facilitada porque um indivíduo ou grupo de indivíduos superiores, quando selecionados, produzirão uma descendência com média superior. Já com o efeito devido à dominância ou à sobredominância, existe o favorecimento ao programa de produção de híbridos, uma vez que as combinações de vários locos favoráveis em heterozigose permite a otimização dos ganhos genéticos (Ramalho et al., 1995; Miranda et al. 2005).

Além disso, segundo Ferreira et al. (2002), na escolha das populações e das combinações híbridas mais promissoras para futuros programas de melhoramento, é importante considerar, além da CGC e da CEC, a existência, ou não, de efeitos recíprocos (ER), já que as respostas podem diferir quando um genitor é, ou não, o doador de pólen.

Assim, em um programa de melhoramento deve-se dar importância aos estudos genéticos dos caracteres agrônômicos como forma de avaliar o potencial genético dos genitores para produzir melhores descendentes, assim como para aumentar a eficiência dos métodos de melhoramento. Informações sobre a magnitude e a contribuição dos efeitos gênicos aditivos e de dominância que controlam as características alvo tornam-se determinantes para o sucesso de qualquer programa de melhoramento genético.

Na posição 6.05 do cromossomo 6, foi identificado um QTL ligado ao marcador nc013, explicando 10,61% da variância fenotípica. Esse QTL apresenta efeito dominante e o sinal negativo do efeito aditivo indica que o alelo favorável foi doado pelo genitor intolerante à alta temperatura de secagem (Tabela 7). No mesmo cromossomo, mas no bin 6.08 ligado ao marcador umc2059, foi identificado um QTL explicando 10,27% da variância fenotípica da característica, com um efeito de dominância para a expressão do fenótipo. O terceiro QTL foi mapeado na posição 8.05, próximo ao marcador phi014. Esse QTL explicou 14,10% da variação fenotípica, possuindo um efeito de sobredominância.

As metodologias de mapeamento por intervalo composto e de análise de marcas simples foram concordantes quanto à identificação desses três QTLs para tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. Por essa última análise, os marcadores nc013 e umc2059, localizados no cromossomo 6, explicaram 7,63% e 9,97% da variação fenotípica, respectivamente. Já o marcador phi014, localizado no cromossomo 8, explicou 5,36% da variação fenotípica da tolerância (Tabela 7). Pelos resultados apresentados, observa-se que os valores da variância fenotípica desses marcadores obtidos pela análise de marca simples foram mais baixos que os observados pela análise de intervalo composto, indicando que essa última análise possui um maior poder de estimativa dos efeitos dos QTLs.

A regressão linear é uma metodologia para a detecção de associações entre marcadores e fenótipo que apresenta baixa sensibilidade e precisão na detecção de QTLs. A vantagem é que não requer informação de mapeamento, podendo ser usada para marcadores não ligados. Várias metodologias têm sido elaboradas para aumentar o poder de detecção e a precisão das estimativas do efeito e da posição dos QTLs. No presente trabalho, todos os QTLs que foram mapeados próximos aos marcadores identificados pela análise de intervalo composto também foram identificados pela análise de regressão simples, evidenciando consistência dos dados e das análises realizadas. No entanto, as estimativas foram superiores quando se utilizou o mapeamento por intervalo composto, como já era esperado.

Nenhum QTL foi associado aos 33 marcadores SSR escolhidos com base nos resultados encontrados por Kollipara et al. (2002). Entretanto, os QTLs presentes no cromossomo 6 estão ligados a *primers* que foram selecionados por estarem localizados próximos a regiões de interesse, como o *primer* umc2059, que foi selecionado por estar próximo ao *primer* phi070, que está ligado a uma LEA proteína no bin 6.07.

Esses marcadores parecem estar efetivamente associados com a característica avaliada, uma vez que todos se encontram mapeados próximos a genes cujos produtos de expressão vêm sendo associados com a tolerância à dessecação das sementes. Na Tabela 8 estão registrados a posição e os genes próximos aos marcadores que estão ligados aos QTLs identificados.

TABELA 8 - Localização genômica de locos próximos aos marcadores ligados aos QTLs identificados. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Marcador ligado	QTL	Genes próximos		Bin
nc013, umc2059	QTL ₁ , QTL ₂	<i>dhn1</i>	deidrinal	6.05
		<i>ncr(sod3a)</i>	superóxido	6.05
			dismutase 3a	
		<i>hsp101</i>	proteína de choque térmico 101	6.06
		<i>mlg3</i>	LEA proteína grupo 3	6.07
phi014	QTL3	<i>act1</i>	actina 1	8.03
		<i>tub2</i>	beta tubulina 2	8.03
		<i>ncr(sod3c)</i>	superóxido	8.03
			dismutase 3c	

Marcador ligado: marcador mais próximo do QTL identificado.

Genes próximos: genes que se encontram na região genômica próxima aos marcadores ligados.

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos.

Fonte: *Maize Genetics and Genomics Database*, 2005; Close et al., 1999.

O QTL₃, que está localizado no bin 8.05, apresenta-se próximo a três genes, o *ncr(sod3c)* que codifica para superóxido dismutase, o *act1*, que codifica para actina e o *tub2*, cujo produto gênico é uma beta tubulina (*Maize Genetics and Genomics Database*, 2005).

A tubulina, que constitui o principal componente dos microtúbulos das células, foi encontrada diferencialmente expressa entre embriões de milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem (Kollipara et al. 2002). Tanto os microtúbulos quanto os microfilamentos de actina compõem o citoesqueleto, estrutura complexa responsável pela forma das células eucarióticas envolvidas no movimento de organelas, cromossomos e núcleos. São os principais componentes dos fusos mitóticos e meióticos, auxiliando o movimento dos cromossomos durante a mitose e a meiose. A organização dos

microtúbulos é sensível a diferentes fatores ambientais, incluindo elevadas temperaturas (Bajer et al., 1993). Em eixos embrionários de sementes, tem sido observado que no estado hidratado de sementes tolerantes e intolerantes à dessecação, os microtúbulos permanecem organizados nas células da ponta radicular. Porém, quando os eixos são desidratados, essa estrutura se torna desorganizada, tanto em sementes tolerantes quanto intolerantes à dessecação. Nessas últimas, diferentemente das tolerantes, o citoesqueleto não se torna novamente organizado com o processo de embebição da semente, causando, então, danos às sementes (Berjak & Pammenter, 2003).

Outro processo que permite que as sementes tolerantes à dessecação passem pela secagem com um dano mínimo é a ação eficiente de sistemas de antioxidante. Dentro da célula, a superóxido dismutase constitui a primeira linha de defesa contra as espécies ativas de oxigênio (EAOs), podendo ocorrer em diferentes compartimentos da célula, incluindo mitocôndrias, cloroplastos e citossol, entre outros (Greene, 2002). Além da região genômica onde está mapeado o QTL₃, outro loco da superóxido dismutase, *ncr(sod3a)*, encontra-se localizado no bin 6.05. Segundo as informações encontradas no *Maize Genetics and Genomics Database* (2005), o produto gênico desse loco encontra-se localizado na mitocôndria. Injúrias na membrana mitocondrial e nas proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons podem resultar na geração de radicais livres. Os radicais livres geralmente causam danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, tendo como primeiro alvo as membranas, o que constitui uma das causas da perda da integridade das mesmas em organismos sensíveis à dessecação quando estão sob condições de estresse hídrico (Hoekstra, 2002; Bewley, 1979; Mundree et al., 2002). Dessa forma, mecanismos antioxidantes constituem parte da adaptação ao estresse térmico e vêm sendo fortemente correlacionados com a aquisição de termotolerância (Maestri et al., 2002). O aumento de radicais livres durante a dessecação explica porque genes que

codificam enzimas ligadas à desintoxicação das EAOs, como é o caso da superóxido dismutase, vêm sendo encontrados com um aumento de expressão em resposta à dessecação, aumentando a tolerância de sementes e plantas a esse tipo de estresse (Ingram & Bartels, 1996).

Os marcadores *nc013* e *umc2059*, ligados aos QTLs 1 e 2 no cromossomo 6, encontram-se mapeados próximo aos locos que codificam a deidrina 1 (*dhn1*), proteína de choque térmico (*hsp101*) e a proteína LEA do grupo 3 (*mlg3*), além da superóxido dismutase, citada anteriormente. Nieto-Soleto et al. (2002) mapearam o marcador *umc132* ligado a uma proteína de choque térmico em milho. Segundo os autores, a região desse marcador, que está localizado no bin 6.07, está envolvida com a sensibilidade à seca e com a concentração de ABA tanto no xilema quanto em folhas.

LEA proteínas do grupo 2 são também conhecidas como deidrina e se acumulam quando há sinal de déficit hídrico, baixas temperaturas, pressão osmótica externa aumentada, dessecação do embrião ou aplicação do hormônio ABA. As prováveis funções dessas proteínas são relacionadas com seqüestro de íons, proteção de membranas, natação de proteínas (chaperonas) e retenção de água e possivelmente, esse grupo de proteínas possui mais de uma simples função (Bray, 1993; Dure, 1992; Zhu et al., 1997; Nepomuceno et al., 2001). Essas proteínas vêm sendo associadas com a maturação e a tolerância à dessecação de sementes (Yang et al., 1997; Baker et al., 1988; Dure et al., 1989).

Thomann et al. (1992) observaram que as LEA proteínas do grupo 3 são polipetídeos responsivos ao ABA e acumulam-se no final da maturação, coincidindo com o início da desidratação de sementes de milho. Koag et al. (2003) observaram que as deidrininas em sementes de milho podem sofrer mudanças na sua conformação na interface entre a membrana e a água, provavelmente visando à estabilização de estruturas internas da membrana, sob condições de estresse.

Apesar de haver uma maior ocorrência de sHSP em plantas (Mansfield & Key, 1987), a proteína choque térmico Hsp101 foi encontrada por Kollipara et al. (2002) com diferenças na expressão entre sementes de milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem e a mesma se encontra entre os locos dos marcadores nc013 e umc2059, mapeados no presente trabalho. As proteínas Hsp, cuja expressão é induzida pelos mesmos tipos de estresse que induzem a expressão de LEAs proteínas, têm sua síntese coincidente com a aquisição da tolerância à dessecação (Hoekstra et al., 2001). A Hsp101 pertence à família das Hsps100, que compreendem proteínas termotolerantes que promovem a reativação de proteínas que agregadas, diferentemente das Hsps70 e Hsps60, que previnem a agregação de proteínas (Queitsch et al., 2000). Esses autores observaram que em sementes de *Arabidopsis*, cujos níveis de expressão de Hsp101 são baixos, a exposição à alta temperatura durante a germinação leva a morte das plântulas. De acordo com Gurley (2000), com o aumento da expressão de uma única proteína, Hsp101, pode-se estender o período de tolerância a altas temperaturas, o que acontece em sementes durante os estágios iniciais de germinação. Ainda em *Arabidopsis*, um gene codificando Hsp101 foi identificado como um dos locos determinantes da capacidade dessa espécie em adquirir termotolerância (Hong & Vierling, 2000). Assim, uma maior síntese dessas proteínas poderia agir na proteção de outras proteínas durante o estresse osmótico que ocorre com a desidratação das células com uma alta temperatura de secagem das sementes.

A alta herdabilidade estimada para o teste de envelhecimento acelerado (98,28%) contra a variação fenotípica explicada pelos marcadores moleculares (39%) sugere que a seleção assistida por marcadores (SAM) não deve ser tão eficiente quanto a seleção fenotípica das sementes tolerantes a alta temperatura de secagem. Entretanto, o uso de SAM pode ser uma alternativa viável para os melhoristas, uma vez que a avaliação fenotípica é demorada e trabalhosa, além

de levar a uma perda do material genético, uma vez que o teste de envelhecimento acelerado é um teste destrutivo realizado no próprio material de propagação, que são as sementes.

Além disso, o mapeamento de QTLs pode contribuir significativamente para aumentar os conhecimentos sobre a herança da característica além de aumentar os conhecimentos da tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem, podendo levar à identificação de genes e à elucidação dos mecanismos envolvidos na expressão da tolerância. Considerando que tantos os efeitos aditivos, dominantes e sobredominantes são importantes no controle da tolerância à alta temperatura de secagem, a escolha de métodos de melhoramento que explorem todas as fontes de variabilidade para essa característica em milho é de fundamental importância.

5 CONCLUSÕES

Dos 342 locos de microssatélites analisados nas linhagens genitoras 12 e 5, selecionadas para tolerância à alta temperatura de secagem, 34% mostraram-se polimórficos.

Foi possível identificar três marcadores microssatélites ligados a QTLs nos bins 6.05, 6.08 e 8.05 para a característica de tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho.

Pela análise de mapeamento por intervalo composto, os QTLs explicaram 39% da variação fenotípica e apresentaram efeitos aditivos, de dominância e sobredominância.

Os marcadores identificados encontraram-se mapeados próximos a genes cujos produtos de expressão vêm sendo associados com a tolerância à dessecação das sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.

ARNHEIM, N.; STARNGE, C.; ERLICH, H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. **Proceeding National Academy of Sciences USA**, v.82, p.6970-6974, 1985.

AYERS, N.M. et al. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germoplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.773-781, 1997.

BAILLY, C. et al. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.52, n.357, p.701-708, Apr. 2001.

BAJER, A.S.; SMIRNOVA, E.A.; MOLE-BAJER, J. Microtubule converging centres - implications for microtubule dynamics in higher plants. In: VIG, B.K. (Ed.). **Chromosome segregation and aneuploidy**. NATO ASI Series, v. H72, Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.225-239.

BAKER, J.C.; STEELE, C.; DURE, L.III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.277-291, 1988.

BAO, J.S.; CORKE, H.; SUN, M. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.), **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.105, p.898-905, 2002.

BARTELS, D.; SINGH, M. SALAMINI, F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta**, v.174, p.485-492, 1988.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z.B. **QTL cartographer**: version 1.14. Raleigh: North Carolina State University, 2000. 139p.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: JORNADA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS: análises de QTL no melhoramento de plantas. 2., 2000, Goiânia. **Trabalhos...** Goiânia: FUNAPE, 2000. p.93-223.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Towards unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, v.8, p.930-932, 1990.

BENTISINK, L. et al. Genetic analysis of seed-soluble oligosaccharides in relation to seed storability of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.124, p.1594-1604, Dec. 2000.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N.W. Orthodox and recalcitrant seeds. In: EDITOR. **Tropical tree seed manual**. [S.l]: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003. Cap. 4, 874p.

BEWLEY, J.D. Desiccation tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.30, p.195-238, 1979.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. 398p.

BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Desiccation tolerance and developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.93, n.4, p.630-638, Apr. 1995.

BLACKMAN, S.A. et al. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, p.868-874, 1991.

BOCHICCHIO, A. et al. Exogenous ABA induces desiccation tolerance and leads to the synthesis of specific gene transcripts in immature embryos of maize. **Maydica**, Bergamo, v.36, p.11-16, 1991.

BOCHICCHIO, A. et al. Acquisition of desiccation tolerance by isolated maize embryos exposed to different condition: the questionable role of endogenous abscisic acid. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.91, p.615-622, Aug. 1994.

BOHNERT, H.J. What makes desiccation tolerable? **Genome Biology**, v.1, n.2, reviews1010.1-1010.4, Aug. 2000. Disponível em: <<http://genomebiology.com>>. Acesso em: 14 de maio de 2004.

BORSATO, A.V. Efeito da secagem intermitente lenta na qualidade de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.240-247, 1999.

BRADFORD, K.J. **Seed production and quality**. 2004. 134p. Disponível em: <<http://veghome.ucdavis.edu/classes/Spring2004/AMR118/syllabus04.pdf>>. Acesso em: 08 de dez. de 2004.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.102, p.1035-1040, 1993.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E.. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1203.

BRENAC, P.; SMITH, M.; OBENDORF, R.L. Raffinose accumulation in maize embryos in the absence of a fully functional *Vp1* gene product. **Planta**, v.203, p.222-228, Oct. 1997.

BROMAN, K.W. **QTL Mapping II**. 2005. Disponível em: <www.biostat.jhsph.edu/~kbroman/>. Acesso em 04 mar. 2005.

BRUNELLI, K.R. **Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* Underw em milho (*Zea mays*)**. 2000. 70p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BUITINK, J.; HEMMINGA, M.A.; HOEKSTRA, F.A. Characterization of molecular mobility in seed tissues: an electron paramagnetic resonance spin probe study. **Biophysical Journal**, Palo Alto, v.76, p.3315-3322, 1999.

BUITINK, J. et al. High critical temperature above Tg may contribute to the stability of biological systems. **Biophysical Journal**, Palo Alto, v.79, p.1119-1128, Aug. 2000.

BURRIS, J.S.; NAVRATIL, R.J. Drying high-moisture seed corn. **Proceedings of Annual Corn Sorghum Research Congress**, v.35, p.116-132, 1980.

CAFFREY, M.; FONSECA, V.; LEOPOLD, A.C. Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.86, p.754-758, 1988.

CAMPBELL, S.A. et al. A ca. 40 KDA maize (*Zea mays* L.) embryo dehydrin is encoded by the *dhn2* locus on chromosome 9. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.417-423, 1998.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v.61, n.2, p.89-100, 2002.

CHEN, Y.; BURRIS, J.S. Role of carbohydrates in desiccation tolerance and membrane behavior in maturing maize seed. **Crop Science**, Madison, v.30, n.5, p.971-975, Sept./Oct. 1990.

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

CLOSE, T.J. et al. The dehydrin multigene family in the Triticeae and maize. In: **MOLECULAR APPROACHES FOR THE GENETIC IMPROVEMENT OF CEREALS FOR STABLE PRODUCTION IN WATER: Limited Environments. Workshop...** Mexico: CIMMYT headquarters, 1999. Disponível em: <http://www.cimmyt.org/ABC/map/research_tools_results/WSMolecular/WorkshopMolecular/WorkshopMolecularcontents.htm>. Acesso em: 13 maio 2005.

COCA, M.A.; ALMOGUERA, C.; JORDANO, J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. **Plant Molecular Biology**, v.25, p.479-92, 1994.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.1-20.

CORBINEAU, F. et al. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v.10, p.329-339, 2000.

CROWE, J.H. et al. Anhydrobiosis: cellular adaptations to extreme dehydration. In DANTZLER, W.H. (Ed.). **Handbook of physiology, section 13: comparative physiology**. Oxford, UK: Oxford University, 1997. v.2, p.1445-1477.

CUMING, A.C. LEA proteins. In: SHEWRY, P.R.; CASEY, R. (Ed.). **Seed proteins**. Kluwer: Academic, 1999. p.753-780.

DASGUPTA, J.; BEWLEY, J.D. Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development of a switch from a development pattern of protein synthesis to a germination pattern. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.70, n.4, p.1224-1227, Oct. 1982.

DEROCHER, A.E.; VIERLING, E. Developmental control of mall heat shock protein expression during pea seed maturation. **Plant Journal**, v.5, p.93-102, 1994.

DOERGE, R.W.; CHRUCHILL, G.A. Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, p.285-294, 1996.

DURE, L. III, CROUCH, M.; HARADA, J.; HO, T-HD, MUNDY, J.; THOMAS, T.; SUNG, Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plantas. **Plant Molecular Biology**, v.12, p.475-486, 1989.

DURE, L. III. The LEA proteins of higher plants. In: **DPS Verma. (Ed.). Control of plant gene expression**. New York: CRC, 1992. p.325-335.

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

FERREIRA, M.A.J.F. Capacidade de combinação em sete populações de melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.3, n.7, p.963-970, jul. 2002.

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

FORNAL, J.; SADOWSKA, J.; KACZYNSKA, B. Damage of faba bean seeds during drying. **Drying Technology**, v.11, n6, p.1293-1309, 1993.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *sod4* and *sod4a*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.177, p.217-224, 1998.

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

GURLEY, W.B. HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. **The Plant Cell**, v.12, p.457-460, 2000.

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

HARADA, J.J. Seed maturation and control of germination. In: LARKINS, B.A.; VASIL, I.K. **Cellular and Molecular biology of Plant Seed Development**, Dordrecht, p.545-592, 1997.

HARRISON, C.M.; WRIGHT, A.H. Seed corn drying experiments. **Agronomy Journal**, v.21, p.299-1000, 1929.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, p.141-153, 1993.

HENDRY, G.A.F. et al. Free radical processes and loss of viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, London, v.122, p.273-279, 1992.

HEPTE, H. GUNDEL, H.

- FROVA, C. Genetic dissection of thermotolerance in maize. In: GRILLO, S.; LEONE, A. (Ed.). **Physical stresses in plants: genes and their products for tolerance**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p.31-38.
- FROVA, C.; SARI-GORLA, M. Quantitative expression of maize HSPs: genetic dissection and association with thermotolerance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.213-220, 1993.
- GALLARDO, K. et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.126, p.835-848, June 2001.
- GARDNER, J. et al. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. **Genetics**, Bethesda, v.134, p.917-930, 1993.
- GODOY, J. et al. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1921-1934, 1994.
- GOLOVINA, E.A.; HOEKSTRA, F.A.; VAN AELST, A.C. The competence to acquire cellular desiccation tolerance is independent of seed morphological development. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.52, n.358, p.1015-1027, May 2001.
- GOYAL, K.; WALTON, L.J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal Immediate Publications**. Jan. 2005 as manuscript BJ20041931. Disponível em: <<http://bj.portlandpress.com/bj/imps/toc.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2005.
- GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: Eucaliptos como modelo. In: NASS, LL. et al. (Ed.). **Recurso genéticos & melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.967-994.
- GRELET, J.; BENAMAR, A.; MACHEREL, D. LEAm, une nouvelle protéine LEA mitochondriale chez le pois (*Pisum sativum* L.). Recherche, innovation, les rencontres du végétal en horticulture, semences et paysage. semences et approches socio-économiques de la filière semences: resumes. Angers, France: Institut National d'Horticulture, 2003.
- GRENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis Book**, v.49, n.1, p.1-20, 2002.

- August, 2002. Disponível em: <<http://www.plantphys.net>>. Acesso em: 12 dez. 2004.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, v.6, p.431-438, 2001.
- HOEKSTRA, F.A. et al. Membrane stabilization in the dry state. **Comp. Biochemical Physiology**, v.117A, p.335-341, 1994.
- HONG, S.W.; VIERLING, E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. **Proceedings of National Academic Science**, v.97, p.4392-4397, 2000.
- IBRAHIM, A. M.H.; QUICK, J.S. Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. **Crop Science**, Madison, v.41, n.5, p.1405-1407, Sept./Oct. 2001.
- INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.47, p.377-403, 1996.
- IN-JEONG, C.; MAYANDI, S.; ROBERT, S. ABA deficiency causes high levels of reactive oxygen species in the growth zone of maize roots under water deficits: increase in ROS precedes breach in plasma membrane integrity. **Plant Biology 2004**. Lake Buena Vista, FL, USA, July 28, 2004. Abstract
- ISMAIL, A.M.; HALL, A.E.; CLOSE, T.J. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling

CROWE, J.H. et al. Anhydrobiosis: cellular adaptations to extreme dehydration. In DANTZLER, W.H. (Ed.). **Handbook of physiology, section 13: comparative physiology**. Oxford, UK: Oxford University, 1997. v.2, p.1445-1477.

CUMING, A.C. LEA proteins. In: SHEWRY, P.R.; CASEY, R. (Ed.). **Seed proteins**. Kluwer: Academic, 1999. p.753-780.

DASGUPTA, J.; BEWLEY, J.D. Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development of a switch from a development pattern of protein synthesis to a germination pattern. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.70, n.4, p.1224-1227, Oct. 1982.

DEROCHER, A.E.; VIERLING, E. Developmental control of mall heat shock protein expression during pea seed maturation. **Plant Journal**, v.5, p.93-102, 1994.

DOERGE, R.W.; CHRUCHILL, G.A. Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, p.285-294, 1996.

DURE, L. III, CROUCH, M.; HARADA, J.; HO, T-HD, MUNDY, J.; THOMAS, T.; SUNG, Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plantas. **Plant Molecular Biology**, v.12, p.475-486, 1989.

DURE, L. III. The LEA proteins of higher plants. In: **DPS Verma. (Ed.). Control of plant gene expression**. New York: CRC, 1992. p.325-335.

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

FERREIRA, M.A.J.F. Capacidade de combinação em sete populações de melancia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.3, n.7, p.963-970, jul. 2002.

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

FORNAL, J.; SADOWSKA, J.; KACZYNSKA, B. Damage of faba bean seeds during drying. **Drying Technology**, v.11, n6, p.1293-1309, 1993.

FROVA, C. Genetic dissection of thermotolerance in maize. In: GRILLO, S.; LEONE, A. (Ed.). **Physical stresses in plants: genes and their products for tolerance**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p.31-38.

FROVA, C.; SARI-GORLA, M. Quantitative expression of maize HSPs: genetic dissection and association with thermotolerance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86, p.213-220, 1993.

GALLARDO, K. et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.126, p.835-848, June 2001.

GARDNER, J. et al. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. **Genetics**, Bethesda, v.134, p.917-930, 1993.

GODOY, J. et al. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1921-1934, 1994.

GOLOVINA, E.A.; HOEKSTRA, F.A.; VAN AELST, A.C. The competence to acquire cellular desiccation tolerance is independent of seed morphological development. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.52, n.358, p.1015-1027, May 2001.

GOYAL, K.; WALTON, L.J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal Immediate Publications**. Jan. 2005 as manuscript BJ20041931. Disponível em: <<http://bj.portlandpress.com/bj/imps/toc.htm>>. Acesso em: 04 abr. 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: Eucaliptos como modelo. In: NASS, LL. et al. (Ed.). **Recurso genéticos & melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.967-994.

GRELET, J.; BENAMAR, A.; MACHEREL, D. LEAm, une nouvelle protéine LEA mitochondriale chez le pois (*Pisum sativum* L.). **Recherche, innovation, les rencontres du végétal en horticulture, semences et paysage. semences et approches socio-économiques de la filière semences: resumes**. Angers, France: Institut National d'Horticulture, 2003.

GRENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis Book**, v.49, n.1, p.1-20, 2002.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *sod4* and *sod4a*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.177, p.217-224, 1998.

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

GURLEY, W.B. HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. **The Plant Cell**, v.12, p.457-460, 2000.

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

HARADA, J.J. Seed maturation and control of germination. In: LARKINS, B.A.; VASIL, I.K. **Cellular and Molecular biology of Plant Seed Development**, Dordrecht, p.545-592, 1997.

HARRISON, C.M.; WRIGHT, A.H. Seed corn drying experiments. **Agronomy Journal**, v.21, p.299-1000, 1929.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, p.141-153, 1993.

HENDRY, G.A.F. et al. Free radical processes and loss of viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, London, v.122, p.273-279, 1992.

HERTER, U.; BURRIS, J.S. Preconditioning reduces the susceptibility to drying injury in corn seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.69, p.775-789, 1989.

HINCHA, D.K.; HAGEMANN, M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. **Biochemical Journal**, v.383, p.277-283, 2004.

HJELLSTROM, M. **Drought stress signal transduction by the HD-Zip transcription factors ATHB6 and ATHB7**. Acta Universitatis Upsaliensis. 2002. Dissertation (Degree of Doctor of Philosophy in Physiological Botany)-Uppsala University, Uppsala.

HOEKSTRA, F.A. Role of respiration in desiccation tolerance. Chapter 11: Respiration and Lipid Metabolism Essay 11.5. **Plant Physiology online**.

August, 2002. Disponível em: <<http://www.plantphys.net>>. Acesso em: 12 dez. 2004.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, v.6, p.431-438, 2001.

HOEKSTRA, F.A. et al. Membrane stabilization in the dry state. **Comp. Biochemical Physiology**, v.117A, p.335-341, 1994.

HONG, S.W.; VIERLING, E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. **Proceedings of National Academic Science**, v.97, p.4392-4397, 2000.

IBRAHIM, A. M.H.; QUICK, J.S. Genetic control of high temperature tolerance in wheat as measured by membrane thermal stability. **Crop Science**, Madison, v.41, n.5, p.1405-1407, Sept./Oct. 2001.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.47, p.377-403, 1996.

IN-JEONG, C.; MAYANDI, S.; ROBERT, S. ABA deficiency causes high levels of reactive oxygen species in the growth zone of maize roots under water deficits: increase in ROS precedes breach in plasma membrane integrity. **Plant Biology 2004**. Lake Buena Vista, FL, USA, July 28, 2004. Abstract

ISMAIL. A.M.; HALL, A.E., CLOSE, T.J. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.120, p.559-566, 1999.

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

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

JOSÉ, S.C.B.R. Tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho. 2003. 149p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JOSÉ, S.C.B.R. et al. Características físicas do pericarpo de sementes de milho associadas com a tolerância a alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, 2005 (no prelo).

JOSÉ, S.C.B.R. et al. Controle genético da tolerância a alta temperatura de secagem de sementes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.3, p.414-428, 2004b.

JOSÉ, S.C.B.R. et al. Tolerância de sementes de linhagens de milho a alta temperatura de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1107-1114, 2004a.

KALICHEVSKY, M.T.; BLANSHARD, J.M.V.; TOKARCZUK, P.F. Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate. **International Journal of Food Science and Technology**, v.28, p.139-151, 1993.

KANTETY, R.V. et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant Molecular Biology**, v.48, 501-510, 2002.

KARLSON, D.T. et al. Novel plasmodesmata association of dehydrin-like proteins in cold – acclimated red-osier dogwood (*Cornus sericea*). **Tree Physiology**, v.23, p.759-767, July 2003.

KERMODE, A.R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.9, p.155-195, 1990.

KERMODE, A.R.; BEWLEY, J.D. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. I. Acquisition of desiccation-tolerance and germinability during development of *Ricinus communis* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.36, n.173, p.1906-1915, Dec.1985.

KOAG, M.C. et al. The binding of maize dhnl to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.131, p.309-316, Jan. 2003.

KOLLIPARA, K.P. et al. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.129, p.974-992, 2002.

- KOORNNEEF, M. et al. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.90, p.463-469, 1989.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, Cambridge, v.12, p.172-175, 1944.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.21, p.1111-1115, 1993.
- LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. **Genetics**, Bethesda, v.12, p.185-199, 1981.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Bethesda, v.121, n.1, p.185-199, 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.
- LEE, G.J. et al. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. **EMBO Journal**, v.16, p.659-671, 1997.
- LEOPOLD, A.C.; SUN, W. Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds: analysis and function. **Seed Science Research**, Wallingford, v.4, p.267-274, 1994.
- LEPRINCE O., HENDRY G.A.F.; MCKERSIE, B.D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.
- LEPRINCE, O.; WALTERS-VERTUCCI, C. A calorimetric study of glass transition behaviors in axes of bean with relevance to storage stability. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.109, p.1471-1481, 1995.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, E.A. Axes and cotyledons of recalcitrant seed of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of

respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.50, p.1515-1524, 1999.

LEPRINCE, O. et al. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize. **New Phytologist**, London, v.116, n.4, p.573-580, Dec. 1990.

LI, Y.C. et al. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, n.6, p.991-1007, Feb. 2004.

LINDSTROM, E.W. A genetic linkage between size and color factors in the tomato. **Science**, Washington, v.60, n.1, p.182-183, 1924.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC, 1998. 611p.

LIU, K. et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, Bethesda, v.165, p.2117-2128, Dec. 2003.

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

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1988. 980p.

MADDEN, R.F.; BURRIS, J.S. Respiration and mitochondrial characteristics of imbibing maize embryos damaged by high temperatures during desiccation. **Crop Science**, Madison, v.35, p. 1661-1667, 1995.

MAESTRI, E. et al. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.667-681, 2002.

MAGARI, R.; KANG, M.S.; ZHANG, Y. Genotype by environment interaction for ear moisture loss rate in corn. **Crop Science**, Madison, v.37, p.774-779, 1997.

MANSFIELD, M.A.; KEY, J.L. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plants. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.84, p.1007-1017, 1987.

MAO, Z. et al. Dehydrin gene expression in normal and viviparous embryos of *Zea mays* during seed development and germination. **Plant Physiology Biochemical**, v.33, p. 649-653, 1995.

MATIELLO, R.R. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: Estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativa de danos na produção.** 2004. 105p.. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

McKERSIE, B.D. **Desiccation stress.** 1996. Disponível em: <<http://cropsoil.psu.edu/Courses/AGRO518/Desiccat.htm#development>>. Acesso em: 25 abr.2005.

MELO, L.C. **Mapeamento de QTLs em feijoeiro, por meio de marcadores RAPD, em diferentes ambientes.** 2000. 148p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, New York, v.88, p.9828-9832, 1991.

MINORSKY, P.V. Raffinose oligosaccharides. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 131, p.1159-1160, Mar. 2003.

MIRANDA, G.V. et al. **Capacidade de combinação de cultivares de milho.** Disponível em: <<http://www.ufv.br/dft/milho/anais.htm>>. Acesso em: 4 jun 2005. Acesso em: 4 jun. 2005.

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, 2002.

MUNDREE, S.G. et al. Physiological and molecular insights into drought tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v.1, n.2, p.28-38, Dec. 2002.

NAVRATIL, R.J.; BURRIS, J.S. Small-scale dryer designer. **Agronomy Journal**, Madison, v.74, n.1, p.159-161, Jan./Feb. 1982.

- NEERAJA, C.M. et al. Characterization of tall landraces of rice (*Oryza sativa* L.) using gene-derived simple sequence repeats **Current Science**, v.88, n.1, p.149-153, Jan. 2005
- NEILL, S.J.; HORGAN, R.; REES, A.F. Seed development and vivipary in *Zea mays* L. **Planta**, v.171, p.358-364, 1987.
- NEPOMUCENO, A.L. et al. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.23, p.12-18, 2001.
- NIETO-SOTELO, J. et al. Maize HSP101 plays important role in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. **The Plant Cell**, v.14, p.1621-1633, July 2002.
- NIKAIDO, A.M. et al. AFLP and CAPS: linkage maps of *Cryptomeria japonica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.6, p.825-831, 2000.
- OGLIARI, J.B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs através do uso de marcadores moleculares microssatélites**. 1999. 114p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- OKA, H.I. Distorted F2 ratios and changes in gene frequency observed for the wx and other three loci. **Rice Genetics Newsletter**, v.86, p.83-85, dec, 1989.
- OTTAVIANO, E. et al. Molecular markers (RFLPs and HSPs) for the genetic dissection of thermotolerance in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.81, p.713–719, 1991.
- PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Uma revisão da fisiologia de sementes recalcitrantes em relação aos mecanismos de tolerância à dessecação. **Seed Science Research**, Wallingford, v.9, p.13-37, 1999.
- PERDOMO, A.; BURRIS, J.S. Histochemical, physiological and ultrastructural changes in maize embryo during artificial drying. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1236-1244, 1998.
- PINTO, L.R. et al. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p.16-19, maio/jun. 2001.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polimorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v.1, n.7, p.215-222, 1996.

PUNTARULO, S. et al. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1074, p.277-283, 1991.

PURDY, J.L.; CRANE, P.L. Influence of pericarp on differential drying rate in "mature" corn. (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v.7, n.4, p.379-381, July/Aug. 1967.

QUEITSCH, C. et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.12, p.479-492, 2000.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo; Lavras:FAEPE, 1995.

RAMOS, N.P. **Determinação da pureza varietal em lotes de sementes de milho através de marcadores morfológicos e microssatélites**. 2004. 104p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

RESENDE, V.F. **Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho**. 2004. 103p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

ROBERTS, J.K. et al. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. **Plant Cell**, v.5, p.769-780, 1993.

ROSA, S.D.V.F. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura**. 2000. 121p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SARI-GORLA, M. et al. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Plant height and flowering. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.99, p.289-295, 1999.

SCARANARI, C. **Retardamento da secagem de espigas e qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 1997. 60p. Dissertação (Mestrado em

Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para resistência ao nematóide de cisto da soja e capacidade de combinação de genitores**. 1999. 85p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica: aplicada a população derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568p.

SENARATNA, T.; MCKERSIE, B.D. Dehydration injury in germinating soybean (*Glycine max* L.) seeds. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.72, p.620-624, 1983.

SEYEDIN, N.; BURRIS, J.S.; FLYNN, T.E. Physiological studies on the effects of drying temperatures on corn seed quality. **Canadian Journal Plant Science**, v.64, p.497-504, July 1984.

SHAROPOVA, N. et al. Development and mapping of SSR markers for maize **Plant Molecular Biology**, v.48, p.463-481, 2002.

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

SILVA, A.R. **Análise genética de caracteres quantitativos em milho com o delineamento III e marcadores moleculares**. 2002. 143p. Tese (Doutorado Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SILVA, H.D. **Aspectos biométricos da detecção de QTLs (Quantitative Trait Loci) em espécies cultivadas**. 2001. 156p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica)-Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

SOUZA JÚNIOR, C.L. Contribuição da genética quantitativa para o melhoramento do milho: passado, presente e futuro. In: **SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS: genética e melhoramento do milho**, 5., 2001. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/gen/eventos/simposios/5simpo/5simpo.htm>>. Acesso em 20 mar. 2004.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.

STUBER, C.W. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. **Plants**, 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, p.639-648, 1987.

SUN, W.; MOTANGU, M.V.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimical Biophysical Acta**, v.1577, p.1-9, 2002.

SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. The glassy state and accelerated aging of soybeans. **Physiology Plantarum**, v.89, p.767-774, 1993.

SUN, W.Q.; LEOPOLD, A.C. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. **Comparative and Biochemical Physiology**, v.117A, n.3, p.327-333, 1997.

SVENSSON, J. **Functional studies of the role of plant dehydrins in tolerance to salinity, desiccation and low temperature**. 2001. 47p. Thesis. (Doctoral Department of Plant Biology)-Swedish University of Agricultural Science, Uppsala.

SWAMY, P.M.; SMITH, B.N. Role of abscisic acid in plant stress tolerance. **Current Science**, v.76, n.9, 10 May 2000.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germoplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, v.29, p.277-287, 1996.

TENAILLON, I.M. et al. Patterns of Diversity and Recombination Along Chromosome 1 of Maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). **Genetics**, Bethesda, v.162, p.1401-1413, Nov. 2002.

THIEL, T. et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) **Theory Applied Genetic**, v.106, p.411-422, 2003.

THOMANN, E.B. et al. Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.99, p.607-614, 1992.

TRACY, W.F.; GALINAT, W.C. Thickness and cell layer number of the pericarp of sweet corn and some of its relatives. **Hort Science**, Alexandria, v.22, n.4, p.645-647, 1987.

VAN DER BEEK, VAN ARENDONK, J.A.M.; 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, p.115-1124, 1995.

VARSHNEY, R.D. et al. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.7, p.537-546, 2002.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.237-271

VIENNE, D. et al. Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress response in maize. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v.50, p.303-309, 1999.

VIERLING, E. The role of heat shock proteins in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology**, v.42, p.579-620, 1991.

VIERLING, E. Roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.579-620, 2001.

VIGH, L.; MARESCA, B.; HARWOOD, J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? **Trends Biochemical Sciences**, v.23, n.10, p.369-374, Oct. 1998.

VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, Bethesda, v.155, p.1439-1447, 2000.

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

- WALSH, P.S.; FILDES, N.J.; REYNOLDS, R. Sequence analyses and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, n.24, p.2807-2812, 1996.
- WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seed. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.7-21, 2000. Edição Especial.
- WALTERS, C. et al. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.11, p.135-148, 2001.
- WANG, B.; BREWBAKER, J.L. Quantitative trait loci affecting pericarp thickness of corn kernels. **Maydica**, Bergamo, v.46, n.3, p.159-165, 2001.
- WANG, G.L.; PATERSON, A.H. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, p.355-361, 1994.
- WANG, Z. et al. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, p.1-6, 1994.
- WATERS, E.R.; LEE, G.J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.325-338, 1996.
- WEHMEYER, N. et al. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.112, p.747-757, 1996.
- WEHMEYER, N.; VIERLING, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.122, n.4, p.1099-1108, Apr. 2000.
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The vitreous state in corn embryos. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.89, p.977-981, 1989.
- WISE, M.J. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. **BMC Bioinformatics**, London, v.4, p.52, Oct. 2003.

WOLKERS, W. F.; VAN KILSDONK, M.G.; HOEKSTRA, F.A. Dehydration-induced conformational changes of poly-L-lysine as influenced by drying rate and carbohydrates. **Biochemical Biophysical Acta**, v.1425, p.127-136, 1998a.

WOLKERS, W.F. et al. Fourier transform infrared microspectroscopy detects changes in protein secondary structure associated with desiccation tolerance in developing maize embryos. **Plant Physiology**, v.116, p.1169-1177, Mar. 1998b.

WONG, F.C. et al. QTL associated with accumulation of tocopherols in maize. **Crop Science**, Madison, v.43, p.2257-2266, 2003.

WONG, F.C. et al. QTL and candidate genes phytoene synthase and z-carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.108, p.349-359, 2004.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphisms and genetic mapping of microsatellites in rice **Molecular General Genetics**, v.241, p.225-235, 1993.

YANG, H. et al. *Arabidopsis thaliana* ECP63 encoding a LEA protein is located in chromosome 4. **Gene**, v.184, p.83-88, 1997.

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

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

ZHU, J. HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, p.253-277, 1997.

ANEXO

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Localização e padrão de amplificação dos <i>primers</i> avaliados entre as linhagens tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem das sementes de milho.....	105

TABELA 1A - Localização e padrão de amplificação dos *primers* avaliados entre as linhagens tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem das sementes de milho. UFLA, Lavra-MG, 2005.

Bins	Loco SSR	Padrão	Bins	Loco SSR	Padrão
1.00	bnlg149	M	1.09	phi 055	M
1.00-1.05	mmc0092	M	1.09	phi 094	M
1.01	bnlg1179	M	1.09	umc 1512	M
1.01	phi056	M	1.10	bnlg 1671	M
1.01	phi 097	M	1.11	bnlg 131	P
1.02	bnlg109	M	1.11	bnlg 667	M
1.02	bnlg147	BR	1.11	phi 120	P
1.02-1.04	mmc0103	BR	1.11	umc 1009	M
1.03	bnlg176	M	2.00-2.04	mmc 0063	NA
1.03	bnlg182	P	2.01	bnlg 1092	M
1.03	bnlg439	P	2.02	bnlg 1017	M
1.03	phi 001	M	2.02	mmc 0111	P
1.03	phi 095	BR	2.02	phi 098	M
1.03	umc1021	M	2.02-2.03	bnlg 125	M
1.03-1.04	umc1452	P	2.03	bnlg 1537	P
1.04	bnlg1811	P	2.03	mmc 0231	P
1.04-1.05	mag.1e07	P	2.04	bnlg 108	M
1.05	umc 1076	P	2.04	bnlg 121	BR
1.06	bnlg 421	M	2.04	bnlg 166	M
1.06	umc 1035	P	3.06	bnlg 1798	P
1.06-1.12	mmc 0011	P	2.04	bnlg 381	M
1.06-1.12	mmc 0031	P	2.04	phi 083	M
1.07	bnlg 615	P	2.04	umc 1003	P
1.07	phi 002	M	2.04	umc 1024	M
1.08	mac.e01f06	P	2.04	umc 1026	M
1.08	phi 038	P	2.04	umc 1448	M
1.08	phi 039	M	2.04	umc 2030	P
1.08	umc 1013	P	2.04-2.05	umc 1007	P
1.08	umc 1848	M	2.05	bnlg 180	M
1.09	bnlg 100	M	2.05	bnlg 371	NA
1.09	bnlg 400	BR	2.05	mag.e05	P
1.09	phi 011	P	2.05	nc 131	M

NA: não polimórfico; BR: baixa resolução; M: monomórfico; P: polimórfico

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos;

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont”

Bins	Loco SSR	Padrão	Bins	Loco SSR	Padrão
2.05	nc 132	M	3.05	bnlg 420	P
2.05	nc 133	M	3.05	phi 073	M
2.05	umc 1028	P	3.05-3.10	mmc 0071	P
2.05	umc 1459	M	3.06	bnlg 1047	M
2.05	umc 1635	P	3.06	bnlg 1449	M
2.05	umc 1884	M	3.06	bnlg 197	BR
2.05-2.06	umc 1065	M	3.07	umc 1489	M
2.06	nc 003	P	3.07	umc 1528	P
2.06	umc 1004	M	3.08	bnlg 1350	M
2.06	umc 1875	P	3.08	mmc 0251	P
2.07	mmc 0271	BR	3.08	phi 046	NA
2.07	umc 1042	P	3.08	phi 088	M
2.07-2.08	bnlg 2077	P	3.08	umc 1320	P
2.07-2.08	mmc 0143	M	3.09	bnlg 1182	P
2.07-2.08	mmc 0191	BR	3.09	bnlg 1496	P
2.08	bnlg 198	M	3.09	mmc 0001	M
2.08	mag.1f03	P	3.09	mttg.h02	BR
2.08	phi 090	M	3.09	phi 047	M
2.09	bnlg 1520	P	3.09	umc 1594	P
3.00	umc 2109	M	3.09-3.10	umc 1010	P
3.01	phi 049	M	4.00	bnlg 372	NA
3.01	umc 1394	M	4.01	bnlg 1434	BR
3.02	bnlg 1647	P	4.01	nc 135	M
3.02	umc 1057	M	4.01	phi 072	P
3.02-3.03	bnlg 1325	M	4.01	umc 1008	P
3.03	bnlg 1523	NA	4.01	umc 1017	M
3.04	bnlg 1904	P	4.01	umc 1022	BR
3.04	mmc 0132	P	4.03	nc 004	M
3.04	mmc 0312	M	4.03	phi 021	M
3.04	nc 030	BR	4.04	bnlg 490	M
3.04	phi 036	NA	4.04	phi 074	M
3.04	phi 099	M	4.04; 5.03	phi 096	M
3.04	umc 1012	M	4.05	nc 005	M
3.04	umc 1025	P	4.05	phi 026	P
3.05	bnlg 1601	M	4.05	umc 1031	P

NA: não polimórfico; BR: baixa resolução; M: monomórfico; P: polimórfico

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos;

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont”

Bins	Loco SSR	Padrão	Bins	Loco SSR	Padrão
4.06	bnlg 2291	P	5.04	bnlg 1208	P
4.06	bnlg 252	P	5.04	bnlg 150	M
4.07	mttg.b02	P	5.04	bnlg 603	BR
4.08	mmc 0321	M	5.04	bnlg 653	M
4.08	phi 066	M	5.04	mace01a03	P
4.08	phi 086	M	5.05	mmc 0081	M
4.08	phi 092	M	5.05	mmc 0282	BR
4.08	phi 093	M	5.05-5.06	bnlg 278	P
4.08	umc 1051	M	5.06	phi 085	P
4.08-4.09	umc 1039	M	5.06	phi 087	P
4.09	phi 079	M	5.06	phi 100	BR
4.10	bnlg 589	P	5.06	phi 101	M
4.10-4.11	umc 1610	M	5.06	umc 1019	P
4.11	phi 006	P	5.07	phi 058	M
4.11	phi 019	M	5.07	phi 128	M
4.11	phi 076	P	5.08	bnlg 118	P
4.11	umc 1058	BR	5.09	bnlg 386	BR
4.11	umc 1255	NA	5.09	bnlg 389	M
5.00	bnlg 1006	M	6.00	bnlg 161	P
5.00	mmc 0151	M	6.00	bnlg 238	P
5.00	nc 130	M	6.00	phi 075	M
5.00	umc 1006	P	6.00	umc 1023	M
5.01	bnlg 143	M	6.01	bnlg 107	M
5.01	nc 007	P	6.01	bnlg 249	P
5.01	phi 024	P	6.01	bnlg 426	M
5.02	bnlg 105	P	6.01	umc 1018	M
5.02	bnlg 565	BR	6.02	umc 1002	M
5.02	mac.e00b03	NA	6.02	umc 1257	M
5.02-5.03	mmc 0261	NA	6.02-6.03	bnlg 2191	P
5.03	bnlg 1063	M	6.03-6.04	umc 1887	BR
5.03	bnlg 557	M	6.04	bnlg 480	M
5.03	mac.t02h12	M	6.04	nc 009	P
5.03	phi 008	P	6.04	nc 010	NA
5.03	umc 1056	M	6.04	phi 031	NA
5.03-5.04	phi 113	P	6.04	phi452693	P

NA: não polimórfico; BR: baixa resolução; M: monomórfico; P: polimórfico

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos;

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont”

Bins	Loco SSR	Padrão	Bins	Loco SSR	Padrão
6.04	umc 1014	P	7.02	bnlg 398	M
6.05	bnlg 1702	BR	7.02	bnlg 657	NA
6.05	mmc 0241	P	7.02	mmc 0162	P
6.05	nc 012	P	7.02	phi 034	M
6.05	nc 013	P	7.02	umc 1016	M
6.05	phi 025	M	7.02	umc 1036	M
6.05	phi 078	M	7.02-7.03	mac.e01c02	M
6.05	phi 081	M	7.02-7.03	mac.e01g01	P
6.05	phi 102	M	7.03	bnlg 155	M
6.05	phi 129	M	7.03	bnlg 339	M
6.05	umc 1020	M	7.03	bnlg 434	M
6.05	umc 1413	M	7.03	bnlg 572	M
6.05	umc 1805	P	7.03	mmc 0041	P
6.05-6.06	umc 1341	M	7.03	phi 091	M
6.06	bnlg 345	P	7.03	umc 1001	P
6.06	mac.t02e01	NA	7.03	umc 1015	P
6.06	umc 1462	M	7.04	bnlg 1892	M
6.06	umc 1859	P	7.04	bnlg 2259	BR
6.07	bnlg 1740	P	7.04	mac.e01f07	NA
6.07	phi 070	M	7.04	umc 1029	P
6.07	phi 123	M	7.05	phi 045	P
6.07	phi 299852	P	7.05	phi 051	BR
6.07	umc 1063	P	7.05	phi 069	BR
6.07	umc 1653	P	7.05	phi 082	M
6.08	phi 089	M	7.06	phi 116	P
6.08	umc 2059	P	8.01	bnlg 1073	M
7.00	bnlg 2132	M	8.02	phi 119	M
7.00	umc 1545	P	8.02-8.03	umc 1034	P
7.00	umc 1546	M	8.03	bnlg 669	P
7.00-7.01	mmc 0171	P	8.03	mac.e01c08	BR
7.01	phi 057	M	8.03	phi 115	M
7.01	phi 112	M	8.03	phi 125	M
7.01	umc 1066	P	8.04	bnlg 119	M
7.01	umc 1577	M	8.04	phi 060	NA
7.02	bnlg 1022	M	8.04	phi 121	BR

NA: não polimórfico; BR: baixa resolução; M: monomórfico; P: polimórfico

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos;

“...Continua...”

“TABELA 1A, Cont”

Bins	Loco SSR	Padrão	Bins	Loco SSR	Padrão
8.04	umc 1858	M	9.07	bnlg 619	BR
8.05	bnlg 162	P	9.07	mag.t01d06	NA
8.05	phi 014	P	10.00	phi 041	P
8.06	bnlg 1031	M	10.00	phi 117	M
8.06	bnlg 240	P	10.00	phi 118	M
8.06-8.07	mmc 0181	BR	10.01	umc 1152	M
8.07	bnlg 1828	P	10.02	phi 052	M
8.07	umc 1055	M	10.02	phi 059	P
8.08	phi 015	BR	10.02	phi 063	P
8.08	umc 1005	P	10.03	bnlg 210	P
8.08	umc 1032	BR	10.03	phi 050	P
8.09	mac e01c01	P	10.03	phi 054	P
8.09	phi 233376	M	10.03	bnlg 640	M
9.01	phi 033	M	10.04	bnlg 1518	BR
9.01	phi 044	M	10.04	mttc.d01	BR
9.01	phi 067	BR	10.04	phi 062	M
9.01	phi 068	NA	10.04	phi 071	M
9.02	phi 017	NA	10.04	phi 084	M
9.02	umc 1037	P	10.04	umc 1053	M
9.02	umc 1033	P	10.04	umc 1054	M
9.03	bnlg 127	M	10.05	bnlg 137	M
9.03	bnlg 430	P	10.06	bnlg 236	NA
9.03	bnlg 469	NA	10.06	bnlg 594	P
9.03	phi 022	BR	10.06	phi 035	BR
9.03	phi 027	BR	10.06-10.07	bnlg 153	NA
9.03	phi 065	P	10.07	bnlg 1677	M
9.03-9.04	mmc 0051	BR	10.07	umc 1038	M
9.04	phi 016	M	?	bnlg 449	M
9.04	phi 032	M	?	mac.e01e07	M
9.04	phi 042	NA	?	mag.d01	BR
9.05	phi 040	M	?	mmc 0211	M
9.06	bnlg 292	M	?	mmc 0291	NA
9.07	bnlg 128	M	?	mttc.g01	BR
9.07	bnlg 1588	P			
9.07	bnlg 279	NA			

NA: não polimórfico; BR: baixa resolução; M: monomórfico; P: polimórfico

Bin: intervalo entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos;