



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA**

**KAIAN ALBINO CORAZZA KAEFER**

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS, MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO E  
CONTROLE GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA ÀS DOENÇAS FOLIARES EM  
MILHO NO OESTE DO PARANÁ**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2017**

**KAIAN ALBINO CORAZZA KAEFER**

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS, MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO E  
CONTROLE GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA ÀS DOENÇAS FOLIARES EM  
MILHO NO OESTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**Orientador:** Professor Dr. Adilson Ricken Schuelter

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

K11c Kaefer, Kaian Albino Corazza  
Caracterização de linhagens, mapeamento por associação e controle genético para resistência às doenças foliares em milho no oeste do Paraná / Kaian Albino Corazza Kaefer. – Marechal Cândido Rondon, 2017.  
110 f.

Orientador: Dr. Adilson Ricken Schuelter

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2017.

1. Milho. 2. Milho – Doenças e pragas. 3. Milho – Melhoramento genético. I. Schuelter, Adilson Ricken. II. Título.

CDD 22.ed. 633.15  
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

## KAIAN ALBINO CORAZZA KAEFER

Caracterização de linhagens, mapeamento por associação e controle genético para resistência às doenças foliares em milho no Oeste do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Sistemas de Produção Vegetal Sustentáveis, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Adilson Ricken Schuelter

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Robson Fernando Missio

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Edmar Soares de Vasconcelos

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Marechal Cândido Rondon, 21 de fevereiro de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e por me aceitar como filho, iluminando meu caminho e me concedendo inúmeras bênçãos.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado, e a Capes, pelo apoio financeiro ao longo do curso.

Ao grupo de professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – UNIOESTE, pelos conhecimentos transmitidos, ensinamentos e colaboração.

Aos meus pais Hardi e Silvana, irmã Kendra, minha noiva Bruna Gheller e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao professor Dr. Adilson Ricken Schuelter, por sua orientação, ensinamentos, compreensão, motivação, dedicação e amizade concedidas nesses anos de convivência, além dos exemplos de competência e ética.

A Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC) e novamente ao Dr. Adilson Ricken Schuelter, que colocaram à disposição a infraestrutura da empresa para a execução do experimento.

Ao pessoal do programa de melhoramento de milho – COODETEC, pela amizade, ensinamentos, convivência e auxílio na condução e avaliações dos ensaios.

Aos meus amigos do mestrado: Jonatas Marcolin, Danimar Dalla Rosa, Gustavo Moratelli e Jeferson Carvalho pela amizade sincera e companheirismo dentro e fora da sala de aula.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa, Dr. Edmar Vasconcelos, a Dra. Tatiane Albuquerque Alves, Dra. Eliane Vendruscolo e o Dr. Robson Missio nas importantes sugestões para o enriquecimento da dissertação.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão do meu curso e que, embora não citados, não deixam de merecer meus agradecimentos.

## RESUMO

KAEFER, Kaian, A. C. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2017. **Caracterização de linhagens, mapeamento por associação e controle genético para resistência às doenças foliares em milho no oeste do Paraná.** Orientador: Adilson Ricken Schuelter.

Os objetivos do trabalho foram caracterizar linhagens de milho comum para resistência às principais doenças foliares e sugerir cruzamentos com base na diversidade genética detectada em marcadores SNP, além de mapear regiões genômicas e estudar o controle genético envolvido nas resistências à mancha branca (MB) e à helmintosporiose (HT). Para a caracterização das 72 linhagens, o experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados com três repetições. Os valores genotípicos para às principais doenças foram preditos empregando-se o procedimento REML/BLUP. Para a diversidade genética, as 72 linhagens foram genotipadas com marcadores SNP empregando-se a Plataforma 650K (Affymetrix®), sendo quantificada utilizando-se os métodos de Tocher e UPGMA. Para o mapeamento por associação, as 72 linhagens genotipadas com marcadores SNP foram associados aos valores genotípicos da MB e HT, utilizando o modelo linear misto (MLM). Para o estudo do controle genético, o experimento foi conduzido no ano de 2016 e foi composto por blocos casualizados com três repetições, sendo as estimativas genotípicas baseadas na análise das variâncias das gerações segregantes e não segregantes. De acordo com os resultados, detectou-se a existência de variabilidade genética entre as linhagens de milho e deste modo, com os dados das distâncias por meio dos marcadores moleculares é possível orientar com maior precisão os cruzamentos, visando obter genótipos mais resistentes às principais doenças foliares. O emprego do mapeamento por associação pode ser uma estratégia eficiente na seleção de genótipos resistentes à MB e à HT, sem a necessidade de cruzamentos. Com os estudos de controle genético, heranças do tipo quantitativa aliadas com as altas herdabilidades restritas de MB e HT, permitem boa eficiência na seleção e ganhos de seleção satisfatórios.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, diversidade genética, resistência genética, desequilíbrio de ligação.

## ABSTRACT

KAEFER, Kaian, A. C. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, February, 2017. **Characterization of lineages, association mapping and genetic control for resistance to leaf diseases in maize in western Paraná.** Academic Advisor: Adilson Ricken Schuelter.

The work aimed to characterize common corn strains for resistance to main leaf diseases and to suggest crosses based on the genetic diversity detected in SNP markers, besides to identify genomic regions and to study of control involved in the resistance of white leaf spot (WLS) and northern leaf blight (NLB). For genetic diversity, the 72 maize lines were genotyped with SNP markers using the 650K Platform (Affymetrix®) and quantified using the Tocher and UPGMA methods. For the characterization, the experiment was conducted in a randomized complete block design with three repetitions. The genotypic values of the main diseases were predicted using by the procedure of REML / BLUP. For association mapping, 72 maize lines genotyped for SNP markers were associated with genotypic values of WLS and NLB. For the study of genetic control, the experiment was conducted in the agricultural year 2016 and it was composed of a randomized block design with three replications, being estimates based on the analysis of the variances of the segregating and non-segregating generations. According to the results, the existence of genetic variability was detected among maize lines and this way, with the data of the distances through the molecular markers, it is possible to orient the crosses accurately, aiming at genetically resistant genotypes to the foliar diseases. The use of association mapping may be an efficient strategy in the selection of WLS and NLB resistant genotypes, without the need for crosses. With genetic control studies, inheritances of the quantitative type allied with the high restricted heritabilities of WLS and NLB, allow good selection efficiency and satisfactory selection gains.

**Keywords:** Zea mays, genetic diversity, genetic resistance, linkage disequilibrium.

## SUMÁRIO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	7
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
1.2.1 Cultura do milho .....	9
1.2.2 Doenças foliares na cultura do milho .....	10
1.2.2.1 Mancha Branca .....	10
1.2.2.2 Helmintosporiose.....	12
1.2.2.3 Cercosporiose .....	14
1.2.2.4 Ferrugem Polissora .....	15
1.2.3 Medidas de Controle para Doenças Foliares .....	16
1.2.4 Melhoramento Genético visando a Resistência às Doenças Foliares.....	17
1.2.4.1 Herança da Reação de Resistência à Mancha Branca, à Helmintosporiose, à Cercosporiose e à Ferrugem Polissora .....	19
1.2.4.2 Marcadores Moleculares com ênfase em SNP .....	21
1.2.4.3 Mapeamento por Associação .....	22
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO E MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA ÀS PRINCIPAIS DOENÇAS FOLIARES EM LINHAGENS DE MILHO .....</b>	<b>36</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	38
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.2.1 Local do Experimento.....	40
2.2.2 Caracterização das Linhagens .....	40
2.2.3 Análise da Diversidade Genética por Marcadores SNP .....	42
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
2.4 CONCLUSÃO .....	52
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

<b>CAPÍTULO 2 – CONTROLE GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA À MANCHA BRANCA E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO EM LINHAGENS DE MILHO ....</b>	<b>56</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	58
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	60
3.2.1 Mapeamento por Associação .....	60
3.2.2 Estudo do Controle Genético .....	61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
3.3.1 Mapeamento por Associação para a Resistência à Mancha Branca .....	64
3.3.2 Herança Genética de Resistência à Mancha Branca .....	69
3.4 CONCLUSÃO .....	78
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 3 – CONTROLE GENÉTICO E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO PARA A RESISTÊNCIA À HELMINTOSPORIOSE DO MILHO .....</b>	<b>82</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	84
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	86
4.2.1 Mapeamento por Associação .....	86
4.2.2 Estudo do Controle Genético .....	87
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
4.3.1 Mapeamento por Associação para a Resistência à Helmintosporiose .....	89
4.3.2 Herança Genética de Resistência à Helmintosporiose .....	94
4.4 CONCLUSÃO .....	102
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>
5. CONCLUSÃO GERAL .....	107

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O melhoramento de plantas nasceu com o início da agricultura há cerca de 10.000 anos, sendo definido como “a ciência e a arte de modificar as plantas em benefício humano” (BORÉM; MIRANDA, 2013). O componente “arte” predominou por muito tempo garantindo a sobrevivência humana, em virtude da domesticação das plantas, ou seja, da capacidade humana em observar e selecionar plantas quanto à cor, forma, tamanho, textura, sabor e à produção de grãos, frutos, folhas, caules, raízes e rizomas (VIEIRA, 2010). A partir do século XIX, o componente “ciência” ganhou maior importância com as “redescobertas” dos trabalhos de Darwin, Mendel e Fischer, possibilitando avanços no melhoramento de plantas, tal como para a cultura do milho (MACHADO, 2014).

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta herbácea anual, monóica díclina, pertence à família Poaceae. Atualmente, é cultivado em diversas regiões do mundo, fornecendo produtos largamente utilizados para a alimentação humana, animal e matérias-primas para a indústria (BORÉM; MIRANDA, 2013). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), estima-se que a produção mundial deva ultrapassar 1,0 bilhão de toneladas na safra 2016/2017, sendo 83,8 milhões destas produzidas pelo Brasil (CONAB, 2017). Muito embora a grande importância socioeconômica do milho implique na realização de pesquisas nos mais diversos campos da ciência, um dos fatores que mais contribuem com a redução de sua produtividade são as doenças (CASELA, 2006).

Diversas doenças foliares afetam a cultura do milho, dentre elas a mancha branca, a helmintosporiose, a cercosporiose e a ferrugem polissora são reconhecidamente importantes, tanto pelos danos significativos ao rendimento e à qualidade dos grãos, quanto pela sua ampla distribuição geográfica no mundo (COSTA et al., 2009). No Brasil, estas doenças têm aumentado suas frequências devido as condições ambientais favoráveis e ao incremento de inoculo, advindas principalmente das mudanças nos sistemas de produção (VIEIRA et al., 2009a).

Nos programas de melhoramento de milho, a resistência às doenças é um dos principais objetivos do melhoramento, devido a sua contribuição ser relativamente expressiva (NIKS; LINDHOUT, 2004). Isto porque o desenvolvimento de cultivares resistentes é o método mais racional e prático que existe, em virtude da redução de

custos de produção e menor agressão ao meio ambiente e ao agricultor (VIEIRA et al., 2009b).

Os trabalhos de introdução de resistência em germoplasma suscetível são mais eficientes quando baseados em estudos preliminares de identificação de genitores promissores, de estimação de parâmetros genéticos e de determinação dos efeitos gênicos (VIEIRA, 2010). Segundo estudos de herança genética, a maioria das doenças foliares são descritas como monogênicas ou qualitativas, porém existem algumas que podem ser caracterizadas como poligênicas ou quantitativas (OGLIARI et al., 2007). O estudo do modo de herança de um caráter permite melhor direcionar e maximizar a exploração da variabilidade genética (SILVA et al., 2001).

Recentemente, vêm sendo desenvolvidos trabalhos de mapeamentos por associação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de reação de resistência, auxiliados pelos marcadores moleculares SNPs, para complementar os estudos sobre herança genética com mapas mais saturados (MOREIRA et al., 2009). Os trabalhos com mapeamentos por associação só foram possíveis com as tecnologias de sequenciamento em altíssima escala, disponibilizando um grande número de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), possibilitando a construção de plataformas para genotipagem simultânea de milhares de marcadores a custos reduzidos (GUIMARÃES et al., 2009a).

Diante do exposto, os objetivos do trabalho foram: (i) caracterizar linhagens de milho comum para resistência às principais doenças foliares e sugerir cruzamentos com base na diversidade genética detectada em marcadores SNP; (ii) mapear regiões genômicas e estudar o controle genético envolvido na resistência à mancha branca; (iii) mapear regiões genômicas e estudar o controle genético envolvido na resistência à helmintosporiose.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta herbácea anual, monóica díclina, que pertence à família Gramíneae, subfamília Panicoideae, tribo Maydeae (VIEIRA, 2010). Seu centro de diversidade genética concentra-se no continente americano, principalmente Américas Latina e Central, tendo origem da domesticação do teosinto (*Euchlaena mexicana*). É um cereal que vem sendo cultivado há pelo menos 5.000 anos, sendo considerado uma das culturas mais antigas do mundo (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Atualmente, o milho é cultivado em diversas regiões do mundo, fornecendo produtos largamente utilizados para a alimentação humana, animal e matérias-primas para a indústria (BORÉM; MIRANDA, 2013). Em algumas regiões do mundo, o milho é extensivamente consumido *in natura*, como exclusiva fonte energética na alimentação humana. O milho pode ser destinado para as indústrias de xarope de glucose, corantes caramelo, maltodextrinas, amidos alimentícios, amidos industriais, dextrinas, pré-gelatinizados e adesivos. Porém, a maior demanda da produção destina-se a utilização de forma indireta, ou seja, à suplementação da nutrição animal, principalmente de aves e suínos (DUARTE et al., 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, superado apenas pelos Estados Unidos e China. Em quantidade, o milho é a terceira commodity mais produzida no país, com aproximadamente 76 milhões de toneladas cultivadas em 15,7 milhões de hectares, na safra de 2015/16 (CONAB, 2016). A produção nacional de milho está distribuída nas regiões Centro-oeste, Sul e Sudeste, com 45,3%, 29,1% e 13%, respectivamente. Os principais estados produtores, Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo, correspondem a 87,5% da produção nacional (MAPA/AGE, 2015).

As projeções de produção de milho no Brasil indicam um aumento de 18,5 milhões de toneladas quando se compara a safra 2015/16 com 2025/26. Em 2024/2025, as estimativas indicam uma produção de 94,7 milhões de toneladas e um consumo de 70 milhões de toneladas. Cerca de 74,5% da produção de milho será destinada ao mercado interno para atender o consumo humano, bem como para fabricação de ração animal, principalmente para aves e suínos. Com relação à

exportação, as projeções indicam que no Brasil ocorrerá um aumento de 52,4%, sendo que isso somente será possível se houver aumento em produtividade, enquanto a área plantada apenas 4,4% (MAPA/AGE, 2016).

Muito embora a relevância socioeconômica do milho implique na realização de pesquisas nos mais diversos campos da ciência, um dos fatores que mais contribuem com a redução de sua produtividade são as doenças. De modo geral, estas doenças têm aumentado de importância nas regiões produtoras do Brasil, sobretudo pela maior intensidade associada ao aumento de inóculo, a escolha da cultivar e as condições climáticas favoráveis (CASELA, 2006). Estas condições ocorrem principalmente em condições de plantio direto, em segunda safra e em áreas irrigadas, situações estas que têm sido frequentes nas últimas décadas na agricultura brasileira.

Dentre as doenças foliares do milho, a mancha branca, a helmintosporiose, a cercosporiose e a ferrugem polissora são reconhecidamente importantes, tanto pelo potencial de redução de rendimento de grãos quanto pela ocorrência generalizada nas regiões produtoras do Brasil e do mundo (COSTA et al., 2009).

## **1.2.2 Doenças foliares na cultura do milho**

### **1.2.2.1 Mancha Branca**

A mancha branca é considerada atualmente, uma das principais doenças foliares da cultura do milho, tanto pelos prejuízos que tem causados às culturas suscetíveis, quanto pela ampla distribuição (COSTA et al., 2009) em praticamente todas as regiões produtoras de milho no Brasil, além de várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (KRAWCZYK et al., 2010; SIBIYA et al., 2011).

A etiologia da mancha branca é ainda controversa junto à comunidade científica e a sua epidemiologia pouco conhecida. Os seus primeiros relatos no Brasil foram inicialmente nos anos 80 no oeste do Paraná (REIS et al., 2004). Primeiramente, a doença foi denominada de mancha de *Phaeosphaeria*, sendo atribuída ao fungo *Phaeosphaeria maydis*, causador de corpos de frutificação encontradas em lesões em estágio avançado da doença (CARSON, 1999).

Posteriormente, em trabalhos isolando uma bactéria Gram-negativa *Pantoea ananatis* formadora de colônia amarelada, de lesões iniciais do tipo anasarcas, Paccola-Meirelles et al. (2001 e 2002) relataram a presença do fungo *P. maydis*

apenas nos estágios finais de desenvolvimento da doença. Os mesmos autores ainda demonstraram que plantas de milho inoculadas com a bactéria apresentavam os mesmos sintomas típicos da doença. Tais resultados foram indicativos de que o fungo não é o agente primário desta doença, como proposto originalmente, e que o mesmo se estabelece após a infecção da bactéria.

Já em outros trabalhos isolando o fungo *Phoma sorghina* de lesões necróticas da doença, Amaral et al. (2005) relataram a existência de diferentes agentes etiológicos da doença, como *Phyllosticta sp.*, *Phoma sorghina* e *Sporormiella sp.*, dependendo do local em que a semeadura for realizada. Deste modo, as condições ambientais poderiam influenciar a predominância de um ou outro agente etiológico (AMARAL et al., 2005; CALI, 2008). Porém, vários outros trabalhos realizados tanto no Brasil (BOMFETI et al., 2008; LANZA, 2009), quanto na Argentina (ALLIPI; LÓPEZ, 2010) e Polônia (KRAWCZYK et al., 2010) reforçaram o papel da bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da mancha branca em milho.

Os sintomas da mancha branca em milho podem ser classificados em quatro estádios de desenvolvimento: (1) lesões aquosas verde-escuras, (2) lesões acinzentadas, (3) lesões necróticas que não apresentam estruturas reprodutivas (picnídios e peritécios) de *P. maydis* e (4) lesões necróticas com estruturas reprodutivas de *P. maydis*. O isolamento da bactéria foi associado com os dois primeiros estádios (1 e 2) enquanto que o fungo foi associado apenas com as lesões em estádios avançados 3 e 4, corroborando com a hipótese de que o *P. ananatis* é o patógeno primário e o *P. maydis* é o patógeno secundário da doença (PACCOLA-MEIRELLES, 2001).

Essas lesões surgem inicialmente nas folhas inferiores, progredindo rapidamente para a parte superior das plantas, sendo os seus sintomas mais evidentes e severos após a fase de pendramento (COSTA et al., 2009). A variável severidade tem sido utilizada como a mais apropriada para quantificar doenças foliares como a mancha branca, referindo-se à porcentagem da área ou do volume de tecido da planta cobertos por sintomas (MALAGI et al., 2011). Folhas com 10 a 20% de severidade da doença apresentam uma redução na taxa fotossintética líquida em torno de 40% em cultivares suscetíveis (GODOY et al., 2001). Essa doença começou a gerar grandes perdas de produção quando passou a antecipar para as fases de florescimento o seu ciclo de desenvolvimento, podendo reduzir a produção de grãos em até 60% (SCHIPANSKI, 2011).

Quanto ao clima, a severidade da mancha branca aumenta em condições de alta umidade relativa (acima de 70%) e temperatura diurna variando de moderada a alta (25 a 30°C), bem como em noites frias com formação de orvalho (SCHIPANSKI, 2011). Em condições desfavoráveis, a doença paralisa seu desenvolvimento, mas este é retomado rapidamente assim que o ambiente volta a ser favorável (CASELA; FERREIRA, 2003). Tais condições são encontradas comumente nas safrinhas da região sul do Brasil.

O aumento da incidência e severidade é favorecido pela semeadura tardia de milho realizados a partir de março, em geral, permitem que a cultura se desenvolva sob altas precipitações pluviométricas, propiciando condições adequadas para o desenvolvimento da doença no Brasil (FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Juntamente com as condições ambientais e ao genótipo, a ausência de rotação de culturas, o cultivo de milho safrinha e principalmente o sistema de plantio direto também contribuem para o aumento da severidade, uma vez que o fungo *P. maydis* é necrotrófico, podendo permanecer em restos culturais de plantas infectadas e incrementando o potencial de inoculo para anos posteriores em áreas de plantio direto (REIS et al., 2004).

O outro agente causal da mancha branca, a bactéria *P. ananatis* não forma esporos, apresentando genes de nucleação por gelo (*ina*), que permitem a produção de gelo em temperaturas que normalmente não poderiam ser formados (ABE et al., 1989). Essa bactéria também tem sido relatada como agente causal de outras doenças em espécies vegetais, como arroz, cebola, eucalipto, melão e sorgo. Porém, é desconhecida a epidemiologia de doenças causadas pela bactéria *P. ananatis* em diferentes hospedeiros, apesar da influência de fatores ambientais na severidade da doença (COUTINHO; VENTER, 2009).

#### 1.2.2.2 Helmintosporiose

A helmintosporiose é considerada uma das doenças mais antigas e importantes relacionadas à cultura do milho, tendo ampla ocorrência no Brasil e nas principais regiões produtoras do mundo (MIRANDA et al., 2002; CARSON, 2006; HARLAPUR et al., 2008; WANG et al., 2010, 2012). As perdas causadas pela doença em condições

ambientais favoráveis e em cultivares suscetíveis podem alcançar até 50% do potencial produtivo da lavoura (SCHIPANSKI, 2011).

A helmintosporiose é causada pelo fungo anamórfico *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs [sinônimo *Helminthosporium turcicum* (Pass.); *Bipolaris turcica* (Pass.) Shoemaker; *Drechslera turcica* (Pass.) Subram. E Jain]. Essa doença também pode ser conhecida como “queima da folha do milho”, “mancha da folha do milho” ou até mesmo “queima de turcicum” (ALVIM et al., 2010).

Os sintomas da doença são caracterizados por lesões necróticas, elípticas e bordos bem limitados, de coloração verde-cinza a marrom. O tamanho das lesões varia de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro, podendo medir de 2,5 a 15 cm de comprimento (COTA et al., 2013). Normalmente o processo de infecção da helmintosporiose é ascendente, iniciando-se o aparecimento das lesões nas folhas inferiores e progredindo posteriormente para as folhas superiores (WHITE, 2000). Sob condições de infecções severas, pode ocorrer a queima completa dos tecidos foliares.

A incidência e a severidade da helmintosporiose dependem, em grande parte, da resistência genética das plantas e das condições ambientais verificadas, as quais fazem com que as epidemias se alterem de ano para ano e de uma localidade para outra (CARSON; VAN DYKE, 1994).

Com relação aos fatores climáticos, as condições ideais para o desenvolvimento de epidemias são a formação de orvalho, chuvas fracas com frequência, temperaturas moderadas, entre 15 e 25 °C, e umidade relativa acima de 90% (SCHIPANSKI, 2011). Estas condições são comumente encontradas nos primeiros plantios, em agosto e setembro, e nos plantios após dezembro, considerados como plantios de safrinha. Nas regiões altas, as chamadas chapadas, estas condições podem ser observadas durante o ano todo.

As epidemias da doença devem-se principalmente pelo aumento da intensidade de *E. turcicum* em áreas cultivadas, resultante da ampla utilização de sistemas de plantio direto (WHITE, 2000). Com isso, os restos de cultura se tornam importantes fontes de inóculo para o desenvolvimento de epidemias (WHITE, 2000; LEVY; PATAKY, 1992). O tempo de sobrevivência do patógeno em restos de cultura é longo, podendo sobreviver na forma de micélio e conídio, ou formar esporos de resistência (clamidósporos) (LEVI; PATAKY, 1992). Os conídios podem ser disseminados a longas distâncias através de dois agentes disseminadores, o vento e

a chuva. Os ciclos secundários da doença são causados por conídios produzidos abundantemente em lesões foliares.

### 1.2.2.3 Cercosporiose

A cercosporiose do milho foi descrita pela primeira vez em 1925, no estado americano de Illinois. No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1953, antes considerada uma doença secundária, porém começou a tomar proporções epidêmicas a partir dos anos 2000, sendo relatada em vários campos de produção agrícola da região centro-sul (BRITO, 2010). Além da ocorrência nos Estados Unidos e no Brasil, a cercosporiose está distribuída por diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo (REIS et al., 2004; CIMMYT, 2010), podendo reduzir o rendimento de grãos em até 65%, dependendo da resistência do hospedeiro, do sistema de produção empregado e das condições climáticas (SCHIPANSKI, 2011). Desde então, a cercosporiose representa uma das principais doenças da cultura na atualidade (KIMATI et al., 2012).

A doença está associada principalmente a ocorrência de duas espécies de fungos: *Cercospora zea-maydis* Tehon & Daniels e *Cercospora zeina* Crous & U. Braun sp. nov. (CROUS et al., 2006). Uma terceira espécie, *C. sorghi* Ellis & Everht f. sp. *maydis* Ellis & Everht, também pode estar associada à cercosporiose, porém considerada de menor importância devido a menor eficiência na colonização dos tecidos foliares, proporcionando sintomas mais brandos (KIMATI et al., 2012).

Os sintomas da doença são geralmente verificados na fase de floração, primeiramente nas folhas inferiores, próximas da fonte de inoculo primário constituídas pelos restos culturais infectados da cultura anterior. O patógeno coloniza o limbo foliar, surgindo lesões que primeiramente aparecem como pequenas manchas de bronzeamento (1 a 3mm), de formato retangular a irregular (KIMATI et al., 2012). Com o progresso da doença, as lesões se alongam formando estrias antes de atingirem a sua forma linear-retangular característica (Figura 3) (CASELA; FERREIRA, 2003). Estas manchas possuem coloração palha e, ou verde-oliva e sob condições de alta umidade, tornam-se cobertas por esporos, quando então adquirem a coloração cinza (BRITO, 2010).

As condições ambientais favoráveis ao patógeno são de temperaturas na faixa de 22 a 30°C e longos períodos de elevada umidade relativa do ar, mas sem acúmulo de água livre na superfície foliar (PAUL; MUNKVOLD, 2005). O período latente é de 14 a 28 dias, sendo considerado longo quando comparado a outros patógenos foliares (KIMATI et al., 2012). Estas espécies de *Cercospora* são fracas competidoras frente aos microrganismos de solo e, desta forma, sobrevivem colonizando o hospedeiro ou restos de cultura, sendo esta última a principal fonte de inóculo. A disseminação ocorre por meio de esporos e restos culturais levados pelo vento e respingos de chuva (CASELA, 2006). Em alguns isolados de *C. zea-maydis* verifica-se o fenômeno de conidiação microcíclica, na qual ocorre a produção de esporos secundários a partir da germinação de um conídio, podendo reproduzir até quatro ciclos germinativos sem que haja uma fase vegetativa intermediária, garantindo a perpetuação do inóculo mesmo em condições desfavoráveis à infecção (KIMATI et al., 2012).

#### 1.2.2.4 Ferrugem Polissora

A ferrugem polissora é considerada a mais destrutiva das ferrugens que afetam o milho, tendo sido relatada em muitas áreas tropicais e subtropicais do mundo onde se cultiva o milho (COSTA et al., 2010). No Brasil, esta ferrugem é uma das mais comuns na cultura, despontado como um problema sério desde o início dos anos 80. Tem sido de grande importância nas regiões tropicais Centro-oeste e Sul brasileiras, predominando em regiões abaixo de 700 metros de altitude e em semeaduras a partir de outubro (VIEIRA, 2010). Relatos mostram perdas de produção de milho por ferrugem polissora de até 50% sob condições favoráveis, sendo considerada uma das principais doenças da cultura (SCHIPANSKI, 2011).

O agente causal desta enfermidade é o fungo Basidiomiceto, *Puccinia polysora* Underwood, um parasita biotrófico. Seus uredósporos são amarelo-dourados, com forma elipsoidal a ovóide, com 4 a 5 poros equatoriais. Os teliósporos são de coloração marrom-castanha, elipsóides ou oblongos, com duas extremidades arredondadas. Mais de 11 raças deste patógeno já foram descritas nos últimos anos no Brasil (KIMATI et al., 2012).

Os sintomas são caracterizados por pústulas pequenas e circulares a elípticas, de coloração amarela a dourada inicialmente observadas nas folhas baixas. Em

fases mais avançadas da doença surgem pústulas marrom-escuras (teliósporos) (VIEIRA, 2010). Pode ser observada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, a qual pode ser confundida com a ferrugem comum, entretanto, com uso de microscópio pode ser identificada sem problemas (KIMATI et al., 2012).

As pústulas podem ocorrer na face superior do limbo e da bainha foliar, nas brácteas das espigas e, em condições de alta severidade, no pendão. As pústulas são caracterizadas pelo rompimento da epiderme da folha, sendo que após o rompimento, são liberados grande quantidade de esporos. Em cultivares suscetíveis, é comum a ocorrência de morte prematura da planta em virtude da destruição foliar, eliminando a sua capacidade fotossintética (KIMATI et al., 2012).

O desenvolvimento da ferrugem polissora é favorecido por condições de alta umidade relativa e temperaturas na faixa de 23 a 28 °C (COSTA et al., 2009). Sob condições favoráveis o fungo produz grande quantidade de inoculo e há extensiva disseminação dos esporos do patógeno de forma anemocórica. Sob temperaturas menos favoráveis, observa-se maior tempo para germinação dos urediniósporos e conseqüente surgimento dos sintomas, diminuindo os danos causados pelo patógeno (FANTINE; DUARTE, 2009).

### **1.2.3 Medidas de Controle para Doenças Foliares**

Embora as doenças na cultura do milho constituírem atualmente um fator de grande preocupação, existem vários métodos que podem ser utilizados para seu controle (MENEHETTI; HOFFMANN, 2007). O manejo mais eficiente para o controle das doenças na cultura do milho pode ser obtido pelo envolvimento de vários mecanismos de controle, como a utilização de rotação de culturas, eliminação de plantas infestantes, escolha da época e local de plantio, aplicação de fungicidas e cultivares resistentes (MACHADO; CASSETARI NETO, 2007).

Apesar da gama existente de métodos de controle, grande destaque tem sido dado ao controle de moléstias através da aplicação de fungicidas, devido à sua facilidade de aplicação e resultados obtidos, verificando-se um aumento acelerado de sua utilização em lavouras comerciais destinadas à produção de grãos (COSTA; COSTA, 2009). O uso de fungicidas para o manejo das doenças foliares é recomendado nas situações de elevada severidade, que são decorrentes da

combinação de um ou mais dos seguintes fatores: condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença, plantio direto sem rotação de culturas, plantio continuado de milho na área e uso de genótipos suscetíveis. Entretanto, alguns fatores devem ser levados em conta para que o benefício do controle da doença com o uso de fungicidas seja superior ao custo da sua utilização, ou seja, sua relação custo/benefício (COTA et al., 2013).

Desta forma, a utilização de cultivares resistentes é considerada a estratégia mais barata e eficaz na redução dos custos de produção e impacto ambiental. Entretanto, o desenvolvimento de cultivares é um trabalho intenso, uma vez que envolve desde a identificação de fontes de resistência e estudo do controle genético, até a elaboração e execução de estratégias eficientes na transferência dos alelos de resistência para as linhagens elites de milho que participam dos híbridos comerciais (SOUZA et al., 2004).

#### **1.2.4 Melhoramento Genético visando a Resistência às Doenças Foliares**

O melhoramento para resistência a doenças é um dos principais objetivos do melhoramento, devido a sua contribuição ser relativamente expressiva (NIKS; LINDHOUT, 2004). Isto porque o desenvolvimento de cultivares resistentes é o método mais racional e prático que existe, além da sua menor agressão ao meio ambiente, ao agricultor e ao consumidor (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

Segundo Michereff (2001), três etapas básicas devem ser ponderadas em qualquer programa de desenvolvimento de cultivares resistentes: 1) Identificar fontes de resistência; 2) Por meio dos métodos de melhoramento, incorporar estes genes em cultivares comerciais; 3) Após a obtenção de um cultivar resistente, escolher a melhor estratégia para que a resistência seja durável em frente as populações patogênicas.

A utilização de cultivares resistentes às doenças foliares tem grande relevância quando soluciona epidemias, como foi o caso na década de 1970 nos EUA com relação a atuação do fungo *Helminthosporium maydis* sobre o milho (ULSTRUP, 1977). Também é de fundamental importância a fim de evitar novas epidemias, como tinha sido previsto para *Phaeosphaeria maydis* nos EUA (CARSON, 1999).

A resistência genética pode ser definida como a habilidade do hospedeiro suportar (parcial ou completamente), o crescimento e desenvolvimento do patógeno.

Envolve vários aspectos como a expressão da resistência (completa, parcial ou residual), a herança da resistência (monogênica ou poligênica), a especificidade da resistência às raças do patógeno, os mecanismos de resistência (hipersensibilidade, pré ou pós haustório) e a durabilidade ao longo dos anos de cultivo (PARLEVLIET, 1997). No entanto, a maioria dos trabalhos publicados utiliza apenas o aspecto da resistência qualitativa ou quantitativa para resumir os tipos de resistência em plantas.

A resistência monogênica ou qualitativa caracteriza-se por ser específica à raça do patógeno (vertical e não durável) e controlada por um ou poucos genes que conferem resistência. Assim, não existem reações intermediárias na ausência de outras fontes de variação genética e é representada pela distribuição descontínua (resistência completa). Já a resistência poligênica ou quantitativa é caracterizada pela não especificidade à raça do patógeno (horizontal e durável), pela presença de vários genes controlando parcialmente a característica e representada pela distribuição contínua de níveis de resistência, ou seja, do tipo incompleta (KIMATI et al., 2012).

A resistência à doença em plantas, quando determinada por poucos genes de grande efeito no fenótipo, exerce grande pressão de seleção sobre a população do patógeno, quebrando a resistência da planta em um curto espaço de tempo. Enquanto que, quando determinada por genes de resistência de pequeno efeito, podem representar um modelo de resistência mais durável, devido a menor pressão sobre a população do patógeno (PARLEVLIET, 1997). Desta forma, genótipos que apresentam genes de resistência de pequeno efeito, devem ser valorizados por apresentar durabilidade aos ataques do patógeno, principalmente quando genes de grande efeito não são efetivos para a resistência (AMARAL et al., 2005).

Os conhecimentos a respeito da herança genética do caráter servem de base para o estabelecimento de estratégias e para otimização das informações dos programas de melhoramento. Com estes estudos, é possível descobrir a herança da resistência (monogênica ou poligênica), qual o tipo de ação gênica prevalente (aditiva ou não-aditiva) e a porcentagem de herdabilidade (alta ou baixa) (AMARAL, 2005).

Para o estabelecimento dos métodos de melhoramento mais apropriados para obtenção de genótipos resistentes, é de extrema importância o conhecimento e a avaliação das informações relacionadas à herança da característica em estudo, como a determinação da significância e da predominância dos efeitos aditivos e não-aditivos (VIEIRA, 2010). Para isso, delineamentos genético-estatísticos baseados em estimativas de médias e variâncias de gerações de cruzamentos com avaliação

fenotípica do caráter alvo têm sido tradicionalmente utilizados em plantas (CRUZ et al., 2012).

Na análise de gerações, fundamentada no estudo combinado das médias e das variâncias de populações (MATHER; JINKS, 1982), são comumente utilizadas as linhagens parentais contrastantes fenotipicamente para o caráter alvo. A partir das linhagens progenitoras, são obtidas as gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e os retrocruzamentos  $RC_{1.1}$  e  $RC_{1.2}$ , as quais são simultaneamente avaliadas fenotipicamente com as linhagens. No entanto, recomenda-se avaliar para cada geração um maior número de indivíduos em virtude da segregação, ou seja, em torno de 100 a 200 plantas na geração  $F_2$ , de 50 a 150 plantas nos retrocruzamentos, e, nas gerações dos parentais e da  $F_1$ , em torno de 12 a 40 plantas, pois não se observam grandes variações dentro dessas. Desta forma, a análise de gerações é de grande importância pela complementaridade das informações, provendo um conhecimento mais profundo do caráter estudado (CRUZ et al., 2012)

#### 1.2.4.1 Herança da Reação de Resistência à Mancha Branca, à Helminthosporiose, à Cercosporiose e à Ferrugem Polissora

Segundo estudos de herança da mancha branca, a característica é descrita como quantitativa, sendo a ação gênica aditiva predominante, ou seja, é governada por um grande número de genes de pequeno efeito (CARSON, 2001; SCHUELTER et al., 2003; DERERA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009a; VIVEK et al., 2010; NIHEI; FERREIRA, 2012). Contudo, alguns desses estudos apresentaram significância dos efeitos não-aditivos, os quais deveriam incluir efeitos de dominância nos modelos, para explicar completamente o modo de herança da resistência à mancha branca (DAS et al., 1989a; 1989b). Apesar de sua herança ser quantitativa, a resistência à mancha branca tem sido relatada como um caráter que apresenta alta herdabilidade (CARSON, 2001; SCHUELTER et al., 2003; LOPES et al., 2007; MOREIRA et al., 2009).

Para a helminthosporiose, o controle genético pode ser feito por resistência qualitativa com ação gênica não aditiva predominante e por resistência quantitativa, advinda de genes de ação aditiva, podendo estas serem encontradas atuando separadamente ou em conjunto (CAMPAÑA; PATAKY, 2005; FERGUSON; CARSON, 2007; OGLIARI et al., 2007). Diversos genes de resistência foram descritos como

dominantes ou parcialmente dominantes Ht1, Ht2, Ht3, HtM, HtN e HtP (ROBBINS; WARREN, 1993; CARSON, 2006; OGLIARI et al., 2007; NIEHI; FERREIRA, 2012; SANTOS, 2016), além de duas formas recessivas, ht4 e rt (CARSON, 1995; OGLIARI et al., 2007). Por outro lado, a resistência quantitativa com o efeito da ação aditiva tem a vantagem de apresentar controle parcial contra praticamente todas as raças, se mostrando importante em alguns estudos de herança da resistência à helmintosporiose (CARSON, 1995; VIVEK et al., 2010). No entanto, a ação dos efeitos aditivos e não-aditivos associados ao caráter estudado também se mostraram de grande importância (WELZ; GEIGER, 2000; OGLIARI et al., 2007; VIEIRA et al., 2009a).

Com relação aos efeitos gênicos associados à cercosporiose, grande parte dos trabalhos publicados têm relatado a predominância de genes de efeitos aditivos (VANEGAS-ANGARITAS et al., 2007; DERERA et al., 2008; VIEIRA et al., 2009a; BRITO et al., 2012; BALESTRE et al., 2012). Entretanto, em alguns trabalhos foi reportado a existência de genes de efeitos não-aditivos na expressão deste caráter, muito embora, tenham sido considerados de pequeno impacto quando comparados aos efeitos aditivos (VANEGAS-ANGARITAS et al., 2007; DERERA et al., 2008; BRITO et al., 2012). Enfim, os genes de efeitos não-aditivos jamais foram superiores em magnitude aos de efeitos aditivos para a resistência a doença em questão (DERERA et al., 2008).

Estudos sobre a herança da reação à ferrugem polissora mostraram a predominância dos genes de efeitos aditivos contribuindo parcialmente para resistência do caráter (FANTIN et al., 1993; SILVA et al., 2001; VIVEK et al., 2010; VIEIRA et al., 2011). Porém, efeitos de genes dominantes ou dominantes incompletos também contribuem para a resistência a doença, o que corrobora com a detecção de genes de raças-específicas Rpp, estudados extensamente na literatura (CHAVES-MEDINA; LOPES, 2007; ZHOU et al., 2007; ZHANG et al., 2010, ZHAO et al., 2013).

A continuidade dos trabalhos sobre herança de doenças foliares do milho agregará informações necessárias para ajudar tanto na condução experimental e nos estudos relacionados ao controle genético de resistência às doenças, como na caracterização desses genes, na transferência para outras populações de interesse e na geração de materiais comerciais resistentes (MOREIRA, 2004).

#### 1.2.4.2 Marcadores Moleculares com ênfase em SNP

No melhoramento genético de plantas, a manipulação assistida por marcadores moleculares vem sendo constantemente utilizados, com o intuito de marcar genes de resistência às doenças, insetos e pragas, avaliação e caracterização de germoplasma, introgressão gênica, desenvolvimento de mapas genéticos, entre outros (PRECZENHAK, 2013). Neste contexto, são ferramentas importantes nos estudos genéticos por detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética das plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009). Atualmente, existe uma grande variedade de marcadores moleculares disponíveis para diferentes espécies de plantas.

Os tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela metodologia empregada na análise, sendo os mais importantes classificados em dois grupos de acordo com a metodologia seguida para identificá-los. Desta forma, temos os marcadores baseados em hibridização e baseados na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de DNA. Os marcadores identificados por hibridização são os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), enquanto que, os marcadores baseados em amplificação por PCR são os do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (BORÉM; MIRANDA, 2013). A escolha do tipo de marcador vai depender do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites substituíram rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente em virtude de serem codominantes, facilmente reproduzíveis, à pequena quantidade de DNA requerida, ao grande poder de resolução (multi-alélicos) e aos altos níveis de polimorfismo. No entanto, apresentam limitação de serem isolados e desenvolvidos unicamente para cada espécie, além de envolver um processo trabalhoso e de alto custo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Com a disponibilização para a comunidade científica de uma nova classe de marcadores moleculares, denominadas SNPs, foi possível a detecção de polimorfismos resultantes da substituição de uma única base em posição específica

no genoma, podendo ser classificados como transição ou transversões, dependendo do tipo de variação do nucleotídeo (FALEIRO, 2011). Outra classe de polimorfismo que tem sido muito explorada é a presença de pequenas inserções e deleções, que variam de um a três nucleotídeos, conhecidas na literatura como InDels (GUIMARÃES et al., 2009). Os SNPs e os InDels são de natureza bi-alélica e abundantes no genoma, podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras como não-codificadoras. Em milho, foi estimado um SNP por substituição a cada 70 bases (principal causa de polimorfismo) e detectado um InDel a cada 160 bases, sendo o segundo caso de ocorrência comum em regiões não-expressas (BORÉM; CAIXETA, 2009). Devido a sua frequência e a distribuição, os SNPs surgem como importantes marcadores que favorecem os estudos de seleção genômica (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

Com o advento das tecnologias de sequenciamento em altíssima escala, das plataformas de genotipagem simultânea de milhares de marcadores SNPs a custos reduzidos e o aumento da capacidade de análises computacionais, tornou-se possível o desenvolvimento de novos métodos de mapeamento genético, entre eles a genética de associação (XU et al., 2009).

#### 1.2.4.3 Mapeamento por Associação

Nos últimos 30 anos, desde o começo da era dos marcadores moleculares em meados de 1980, estudos de diversidade genética em plantas tornaram-se frequentes em grande parte dos programas de melhoramento genético. Um número cada vez maior de metodologias moleculares foi desenvolvido, visando acessar a variabilidade de forma mais precisa, rápida e com custos reduzidos (SPOONER et al., 2005). Indiscutivelmente, estudos originados da caracterização molecular das cultivares de importância agrônômica, tiveram um importante papel no manejo dos recursos genéticos conservados nos bancos e coleções de germoplasma. Entretanto, os frutos da revolução molecular, no sentido de promover o uso da riqueza de alelos conservadas nos bancos de germoplasma, serão provavelmente usufruídos neste século, por meio do mapeamento por associação (GEBHARDT et al., 2004).

O mapeamento por associação, também conhecido como mapeamento por desequilíbrio de ligação, ou mapeamento por desequilíbrio de fase gamética, baseia-se na identificação dos polimorfismos que se correlacionam com a variação fenotípica e, deste modo, cria associações entre marcadores genéticos e fenótipo, permitindo explorar a diversidade genética de cada espécie (MACKAY; POWELL, 2007).

O desequilíbrio de ligação (DL) é a associação não ao acaso de alelos em diferentes *loci*, sendo a correlação entre polimorfismos que é causada pela sua história compartilhada de mutação e recombinação. Inicialmente, o desequilíbrio de ligação está presente em uma população em uma taxa determinada pela distância genética entre os dois *loci* e o número de gerações desde que ele surgiu (FLINT-GARCIA et al., 2003).

A maioria dos processos observados em genética de populações refletem nos padrões do desequilíbrio de ligação, uma vez que a frequência alélica e a recombinação entre *loci* afeta o desequilíbrio de ligação. Vários fatores decorrentes da evolução ocasionam o desequilíbrio de ligação, dentre eles, a mutação, deriva genética, migração e seleção (WRAY; VISSCHER, 2008).

A mutação fornece o material bruto para produzir o polimorfismo que estará em desequilíbrio de ligação. Pode ser originado em populações que sofreram recentemente uma redução no tamanho, o que resulta em deriva genética e, conseqüentemente, poucas combinações alélicas são passadas para as gerações futuras (CASTRO; PEREIRA, 2008).

Já a migração, resultado da introdução de novos indivíduos na população, procede no fluxo de genes entre genótipos de populações geneticamente distintas seguido por intercruzamentos, o que resulta na introdução de cromossomos de diferentes ancestrais, com frequências alélicas distintas (CASTRO; PEREIRA, 2008). Frequentemente o desequilíbrio de ligação resultante da migração se estende por *loci* que não estão ligados, entretanto, esse desequilíbrio é perdido rapidamente com os cruzamentos ao acaso (FLINT-GARCIA et al., 2003).

A recombinação é a principal força que enfraquece o desequilíbrio de ligação, onde os alelos que estão fisicamente ligados nos pais (haplótipos parentais), são transmitidos juntos para a progênie, até que ocorra um evento de recombinação que separe os dois alelos (CASTRO; PEREIRA, 2008). A cada geração, é reduzida na proporção da fração de recombinação pela transferência de alelos fisicamente ligados,

até que seja obtido o equilíbrio de ligação, na qual os haplótipos recombinantes e não recombinantes são igualmente distribuídos na população (GEBHARDT et al., 2007).

Em estudos associativos são adotadas duas estratégias, uma aborda o genoma todo (genome-wide) e a outra é uma abordagem por meio de genes candidatos (candidate gene). Na estratégia genoma todo, é usado na genotipagem da população um grande número de marcadores, distribuídos ao longo do genoma e preferencialmente com posição conhecida em um mapa físico da espécie. Os mesmos indivíduos são fenotipados para os caracteres de interesse, sendo feita a associação com os marcadores através da identificação dos alelos (GEBHARDT et al., 2007). Na estratégia gene-candidato, foca em genotipar regiões do genoma que ancoram os genes candidatos. A análise funcional de genes que atuam na resistência a pestes ou patógenos, ou em qualquer outra rota metabólica importante, sejam estes genes identificados na própria espécie em estudo, ou em espécies modelo, abastecem a oferta de genes-candidatos para estudos associativos (GEBHARDT et al., 2007).

Ambas as estratégias tiram proveito do nível de desequilíbrio de ligação presente na população (MORGANTE; SALAMINI, 2003). Quem determina qual o tipo de estratégia associativa que deve ser adotada é a natureza do desequilíbrio de ligação, onde a razão com que ocorre o DL é em função da distância genética ou física na população em estudo (FLINT-GARCIA et al., 2003). Quando o desequilíbrio de ligação decai em uma distância curta ao longo do cromossomo, o número de marcadores ao acaso necessários para encontrar associações significativas pode ser substancialmente grande (MALOSETTI et al., 2007).

De maneira geral, se o desequilíbrio de ligação na população for pequeno, será necessário um grande número de marcadores para detectar uma associação, obtendo-se um mapa com alta resolução. Inversamente, se o desequilíbrio de ligação na população for grande, será necessário um número menor de marcadores para detectar associações, entretanto, o mapa terá uma resolução inferior (MORGANTE; SALAMINI, 2003).

Além do desequilíbrio de ligação, a estrutura populacional é vista como a segunda principal causa de associação entre marcadores e caracteres fenotípicos (BORÉM; CAIXETA, 2009). Uma população é estruturada se os indivíduos da população não se cruzarem de forma aleatória, ou seja, se desviar do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em função da estrutura populacional, a principal restrição ao uso do

mapeamento por associação em espécies vegetais ocorre em função do grande risco de identificar associações falso-positivas (CASTRO; PEREIRA, 2008).

Existem muitos métodos utilizados para identificar se existe qualquer estrutura numa população com intenção de análise de mapeamento por associação. Formas populares para estimar a estrutura populacional são: a) Distância baseada em métodos filogenéticos; b) Métodos filogenéticos Bayesianos; c) Análise dos componentes principais. O princípio básico é que após remover os efeitos de grupo, apenas as associações causadas pela ligação física entre os alelos é que irão permanecer (MALOSETTI et al., 2007).

Para estabelecer associações entre marcadores e caracteres fenotípicos é necessário calcular o desequilíbrio de ligação entre pares de marcadores. Caso exista desequilíbrio de ligação entre um marcador molecular e um locus que controla um caráter de interesse, os marcadores podem estar associados aos valores fenotípicos mensurados na população de indivíduos (CASTRO; PEREIRA, 2008).

O primeiro estudo associativo em plantas foi realizado em milho, adotando a estratégia gene-candidato proposta por Thornsberry et al. (2001). Neste estudo, foi avaliada a associação entre a variação do gene *dwarf8* (*d8*) com a época de florescimento e estatura de planta em linhagens de milho. A partir de então, várias espécies passaram a ser estudadas visando o mapeamento por associação. Segundo o levantamento feito por Gupta et al. (2005), são relatados estudos associativos em mais de 15 espécies de plantas superiores. Recentemente, trabalhos utilizando essa metodologia estão sendo amplamente utilizados para estudos de resistências às doenças foliares de milho, tais como para a helmintosporiose (POLAND et al., 2011; VAN INGHELANDT et al., 2012; DING et al., 2015) e para cercosporiose (SHI et al., 2014; BENSON et al., 2015).

Desta forma, a estratégia da genética de associação no melhoramento de plantas, desponta como uma importante metodologia para mapear genes de interesse nas mesmas. A crescente facilidade de acesso a técnicas moleculares de grande cobertura do genoma em várias espécies vegetais, faz com que o uso de mapeamento associativo, tenha um papel fundamental nos programas de melhoramento genético por fornecer informações mais relevantes e precisas para seleção de genótipos superiores (CASTRO; PEREIRA, 2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; WATABE, S.; EMORI, Y.; WATANABE, M.; ARAI, S. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.258, p.297-300, 1989.

ALIPPI, A.M.; LÓPEZ, A.C. First report of leaf spot disease of maize caused by *Pantoea ananatis* in Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v.94, p.487, 2010.

ALLARD, R.W. **Princípios do Melhoramento Genético das Plantas**. Rio de Janeiro: Usaid & Edgard Blücher, 1971. 380p.

ALVIM, K.R.; BRITO, C.H.; GOMES, L.S.; BRANDÃO, A.M.; OLIVEIRA, F.H. Severidade e Controle da Helmintosporiose Comum (*Exserohilum turcicum*) em oito Híbridos Comerciais em Jataí-GO. In: **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. p. 2486-2491, Goiânia, 2010.

AMARAL, A.L. do; DAL SOGLIO, F.K.; DE CARLI, M.L; BARBOSA NETO, J.F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to Phaeosphaeria leaf spot of maize in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 44-49, 2005.

AMARAL, A.L. **Etiologia e genética da resistência à mancha branca do milho**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BALESTRE, M.; VON PINHO, R.G.; BRITO, A.H. Bayesian inference to study genetic control of resistance to gray leaf spot in maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 1, p. 17-29, 2012.

BENSON, J.M.; POLAND, J.A.; BENSON, B.M.; STROMBERG, E.L.; NELSON, R.J. Resistance to Gray Leaf Spot of Maize: Genetic Architecture and Mechanisms Elucidated through Nested Association Mapping and Near-Isogenic Line Analysis. **PLoS Genetic**, v. 11, p. 1005-1045, 2015.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Curitiba: UFPR, p. 1-9, 2007. Disponível em: <[www.bespa.agrarias.ufpr.br](http://www.bespa.agrarias.ufpr.br)>. Acesso em: 20/10/2016.

BOMFETI, C.A. SOUZA-PACOLLA, E.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; MARRIEL, I.E.; MEIRELLES, W.F.; CASELA, C.R.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology, Brasília**, v. 33, p.63-66, 2008.

BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2013. 523p.

BRITO, A. H. de. **Controle genético e químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho**. 88p. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BRITO, A.H.; DAVIDE, L.M.C.; VON PINHO R.G.; CARVALHO, R.P.; REIS, M.C. Genetic control of resistance to gray leaf spot of maize in tropical germplasm. **Corn Breeding and Applied Biotecnology**, v. 12, p. 145-150, 2012.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. cap. 2. p. 31-68.

CALI, M.L. **Aspectos etiológicos e epidemiológicos do complexo mancha branca do milho**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAMPAÑA, A.; PATAKY, J. K. Frequency of the Ht1 gene in populations of sweet corn selected for resistance to *Exserohilum turcicum* race 1. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 85-91, 2005.

CARSON M. L. Vulnerability of U.S. maize germplasm to phaeosphaeria leaf spot. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 462-464, 1999.

CARSON, M. L. Response of a maize synthetic to selection for components of partial resistance to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 910-914, 2006.

CARSON, M. L.; VAN DYKE, C. G. Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v. 78, p. 519-522, 1994.

CARSON, M.L. A new gene in maize conferring the chlorotic halo reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v. 79, p. 717-720, 1995.

CARSON, M.L. Inheritance of resistance to Phaeosphaeria leaf spot of maize. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, 798-800, 2001.

CASELA C. R.; FERREIRA, A. S. **A Cercosporiose na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2003. 5p. (Circular técnica, 24).

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

CASELA, C, M. Manejo de doenças necrotróficas na cultura do milho. In: YAMADA, T.; STIPP, S. R. **Estratégias de manejo para alta produtividade do milho**. Sete Lagoas: Embrapa/cnpms, 2006. 8p.

CASTRO, C.M.; PEREIRA, A.S. **Mapeamento por associação em plantas: conceitos básicos e perspectivas de uso no melhoramento de batata.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 30p. (Documentos, 248).

CHÁVEZ-MEDINA, J.A.; LEYVA-LÓPEZ, N.E.; PATAKY, J.K. Resistance to *Puccinia polysora* in maize accessions. **Plant Disease**, v. 91, p. 1489-1495, 2007.

CHEN, C.X.; WANG, Z.L.; YANG, D.E.; YE, C.J.; ZHAO, Y.B.; JIN, D.M.; WENG, M.L.; WANG, B. Molecular tagging and genetic mapping of the disease resistance gene RppQ to southern corn rust. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 108, p. 945-950, 2004.

CIMMYT – International Maize and Wheat Improvement Center. **Gray leaf pot.** Disponível em: <[http://maizedoctor.cimmyt.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=237](http://maizedoctor.cimmyt.org/index.php?option=com_content&task=view&id=237)>. Acesso em: 20, outubro, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, julho 2016** / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2016. 155p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2017** / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2017. 162p.

COSTA, R.V. da; COTA, L.V.; SILVA, D.D. da; PARREIRA, D.F.; ROCHA, I.M.P. da; GUIMARAES, L.J.M.; GUIMARAES, P.E.; PARENTONI, S.N.; MACHADO, J.R. de A. **Epidemias severas da Ferrugem Polissora do milho na Região Sul do Brasil na safra 2009/2010.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 6p. (Circular Técnica, 138).

COSTA, R.V.; COSTA, L.V. **Controle químico de doenças na cultura do milho: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação de fungicidas.** EMBRAPA. Sete Lagoas. Circular Técnica 125. Dezembro, 2009.

COSTA, R.V.; CASELA, C.R.; COTA, L.V. Doenças. In: CRUZ, J.C. (Ed.). **Cultivo de milho.** 6. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Sistemas de produção, 1).

COTA, L.V.; SILVA, D.D.; COSTA, R.V.; PARREIRA, D.F. **Recomendação para o Controle Químico da Helmintosporiose do Sorgo (*Exserohilum turcicum*)** 1. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Circular técnica, 149).

COTA, L.V.; COSTA, R.V.; SILVA, D.D. **Helmintosporiose Causada por *Exserohilum turcicum* na Cultura do Milho.** 1. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. (Circular técnica, 195).

COUTINHO, T.; VENTER, S.N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 325–335, 2009.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; GROENEWALD, M.; CALDWELL, P.; BRAUN, U., HARRINGTON, T.C. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 189-197, 2006.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. v. 2. 514p.

DAS, S.N.; PRODHAN, H.S.; KAISER, S.A.K.M. Further studies on the inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Journal of Mycological Research**, Calcutta, v. 27, p. 127-130, 1989a.

DAS, S.N.; SINHAMAHAPATRA, S.P.; BASAK, S.L. Inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Annual Agricultural Research**, Nadia, v. 10, p. 182-184, 1989b.

DERERA, J.; TONGOONA, P.; VIVEK, B.S.; VAN RIJ, N.; LAING, M.D. Gene action determining *Phaeosphaeria* leaf spot disease resistance in experimental maize hybrids. **South African Journal of Plant and Soil**, v.24, p.138-144, 2007.

DERERA, J.; TONGOONA, P.; KEVIN, V. P.; VIVEK, B.; LAING, M. D.; RIJ, N. C. V. Gene action controlling gray leaf spot resistance in Southern African Maize Germplasm. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 1, p. 93-98, 2008.

DING, J.; ALI, F.; CHEN, G.; LI, H.; MAHUKU, G.; YANG, L.N.; MAGAROKOSHO, C.; MAKUMBI, D.; YAN, J. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. **BMC Plant Biology**, v. 15, p.206, 2015.

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOS, M.J. **Sistema de produção de milho e sorgo**. 6. Ed. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Sistemas de Produção, 1).

DUDIENAS, C.; FANTIN, G.M.; DUARTE, A.P.; TICELLI, M.; BÁRBARO, I.M.; FREITAS, R.S.; LEÃO, C.P.L.; CAZENTINI FILHO, G.; BOLONHEZI, D.; PÂNTANO, A.P. Severidade de ferrugem polissora em cultivares de milho e seu efeito na produtividade. **Summa phytopathol.**, v. 39, n.1, p.16-23, 2013.

EMBRAPA. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. (Manual técnico).

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464p.

FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Eds). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. cap 2, p. 31-54.

FANTINE, G.M.; DUARTE, A. **Manejo de doenças na cultura do milho safrinha**. Campinas: Instituto Agrônomo. 99p. 2009.

FANTIN, G.M.; SILVA, H.P.; BALMER, E.; MIRANDA FILHO, J.B. de. Herança da resistência à ferrugem causada por *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 332-333, 1993.

FERGUSON, L.M.; CARSON, M.L. Temporal variation in *Setosphaeria turcica* between 1974 and 1994 and origin of races 1, 23, and 23N in the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 1501-1511, 2007.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais moléstias na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 80 p.

FLINT-GARCIA, S.A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 357-374, 2003.

GALINAT, W.C. The origin of maize: grain of humanity. **New York Botanical Garden Journal**, New York, v. 44, p. 03-12, 1995.

GEBHARDT, C. Molecular markers, maps and population genetics. In.: VREUGDENHIL, D. (Ed.). **Potato biology and biotechnology advances and perspectives**. Amsterdam: Elsevier, p. 77-89, 2007.

GEBHARDT, C.; BALLVORA, A.; WALKEMEIER, B.; OBERHAGEMANN, P.; SCHULER, K. Assessing genetic potential in germplasm collection of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 13, p. 93-102, 2004.

GODOY, C.V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infectadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.209-215, 2001.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 24-33, 2009a.

GUIMARÃES, P.S.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; DUDIENAS, C.; LÜDERS, R.R.; GALLO, P.B. Capacidade combinatória para resistência à mancha branca em linhagens endogâmicas de milho. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.35, p.282-287, 2009b.

GUPTA, P.K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P.L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, p. 461-485, 2005.

HARLAPUR, S.I.; KULKARNI, M.S.; WALI, M.C.; SRIKANT, K.; YASHODA, H.; PATIL, B.C. Status of turcicum leaf blight of maize in Karnataka. **Karnataka Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 21, p. 55-60, 2008.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**: Doenças das Plantas Cultivadas. 4<sup>o</sup> ed. São Paulo: Ceres, v. 2, 2012. 663p.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, v.92, p.807-811, 2010.

LANZA, F.E. **Mancha branca do milho**: etiologia e resistência de genótipos. 2009. 32 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LEVY, Y.; PATAKY, J.K. Epidemiology of northern leaf blight on sweet corn. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 20, p. 53-66, 1992.

LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P. da; MATIELLO, R.R.; CAMARGO, L.E.A. Controle genético da resistência à mancha-de-Phaeosphaeria em milho. **Ciência Rural**, v.37, p.605-611, 2007.

MACHADO, A.Q.; CASSETARI NETO, D. Mais produtividade. **Revista Cultivar – Grandes Culturas**. Caderno Técnico. n.100, p.05-07. 2007.

MACHADO, A.T. Construção histórica do melhoramento genético de plantas: do convencional ao participativo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 9, n. 1, p. 35-50, 2014.

MACKAY, I.; POWEL, W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, p. 57-63, 2007.

MALAGI, G.; SANTOS, I.; CAMOCHENA, R.C.; MOCCELLIN, R. Elaboração e validação da escala diagramática para avaliação da mancha branca do milho. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.42, n.3, p.797-804, 2011.

MALOSETTI, M.; van der LINDEN, C.G.; VOSMAN, B.; van EEUWIJK, F.A. A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. **Genetics**, Pittsburgh, v. 175, p. 879-889, 2007.

MENEGHETTI, R.C.; HOFFMANN, L.L. Pústulas do prejuízo. **Revista Cultivar Grandes Culturas**. Pelotas. v.9, n.101, p.08-09. 2007.

MATHER, S.K.; JINKS, J.L. **Biometrical genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 396p.

MICHEREFF, S.J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001. 150 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Projeções do agronegócio**: Brasil 2015/16 a 2025/26. Julho 2016, Brasília: Mapa, 2016. 138p.

MIRANDA, G.V.; SOUZA, L.V.; FIDELIS, R.R.; GODOY, C.L.; COIMBRA, R.R.; MELO, A.V. de; GUIMARÃES, L.J.M. Reação de cultivares de milho-pipoca à helmintosporiose. **Revista Ceres**, v. 49, n. 285, p. 513-521, 2002.

MOREIRA, J.U.V.; BENTO, D.A.V.; SOUZA, A.P. de; SOUZA JÚNIOR, C.L. de. QTL mapping for reaction to *Phaeosphaeria* leaf spot in a tropical maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.119, p. 1361-1369, 2009.

MOREIRA, J.U.V. **Mapeamento de QTLs para à reação a doença mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2004. 102f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2004.

MORGANTE, M.; SALAMINI, F. From plant genomics to breeding practice. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 214-219, 2003.

NIHEI, T.H.; FERREIRA, J.M. Análise dialélica de linhagens de milho com ênfase na resistência a doenças foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.369-377, 2012.

NIKS, R.E.; LINDHOUT, W.H. **Curso sobre Mejoramento para Resistencia a Enfermedades y Plagas**. 3 ed. Wageningen: Wageningen University, 2004. 216p.

OGLIARI, J. B.; GUIMARÃES, M.A.; GIRALDI, I.O.; CARMARGO, L.E.A. New resistance genes in the *Zea mays*: *Exserohilum turcicum* pathosystem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 435-439, 2007.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; FERREIRA, A.S.; MEIRELLES, W.F.; MARRIEL, I.E.; CASELA, C.R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopatology**, v. 149, p. 275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; MEIRELLES, W.F.; PARENTONI, S.N.; MARRIEL, I.E.; FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananatis*, isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Plant Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, p. 587- 590, 2002.

PARLEVLIT, J.E. Present Concepts in Breeding for Disease Resistance Private. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, suplemento, p.7-15, 1997. Palestra apresentada no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30., 1997, Poços de Caldas, MG.

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

POLAND, J.A.; BRADBURY, P.J.; BUCKLER, E.S.; NELSON, R.J. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. **Proceeding of the National Academy of Sciences United State of America**, v. 108, n. 17, p. 6893–6898, 2011.

PRECZENHAK, A.P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate.** 2013. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

REIS, E.M., CASA, R.T.; BRESOLIN, A.C.R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho.** 2.ed. Lages SC. Graphel. 2004.

ROBBINS, W.A.; WARREN, H.L. Inheritance resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, "Mayorbela" variety of maize. **Maydica**, v.38, p. 209-213, 1993.

SANTOS, J.S. **Análise dialélica completa e recíproca na estimação da capacidade combinatória da incidência e severidade de *bipolaris maydis* e *exserohilum turcicum* em milho-pipoca em diferentes épocas de cultivo.** 2016. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2016.

SHI, L.; LV, X.; WENG, J.; ZHU, H.; LIU, C.; HAO, Z.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; LI, M.; CI, X.; LI, X.; ZHANG, S. Genetic characterization and linkage disequilibrium mapping of resistance to gray leaf spot in maize (*Zea mays* L.). **The Crop Journal**, v. 2, p. 132 – 143, 2014.

SCHIPANSKI, Carlos André. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho.** 3. ed. Castro: Fundação ABC, 2011. 126 p.

SCHUELTER, A.R.; SOUZA, I.P.; TAVARES, F.F.; SANTOS, M.X.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, C.T. Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.2, p. 46-52, 2003.

SIBIYA, J.; TONGOONA, P.; DERERA, J.; VAN RIJ, N.; MAKANDA, I. Combining ability analysis for *Phaeosphaeria* leaf spot resistance and grain yield in tropical advanced maize inbred lines. **Field Crops Research**, v. 120, n. 1, p. 86-93, 2011.

SILVA, H.P.; BARBOSA, M.P.M.; NASS, L.L.; CAMARGO, L.E.A. Capacidade de combinação e heterose para resistência a *Puccinia polysora* Underw. em milho. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 777-783, 2001.

SPOONER, D.; van TREUREN, R.; VICENTE de, M.C. **Molecular markers for genebank management.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2005. 126 p. (IPGRI. Technical bulletin, 10).

THORNSBERRY, J.M.; GOODMAN, M.M.; DOEBLEY, J. KRESOVICH, S.; NIELSEN, D.; BUCKLER, E.S. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. **Nature Genetics**, Inglaterra, v. 28, p. 286-289, 2001.

VAN INGHELANDT, D.; MELCHINGER, A.E.; MARTIANANT, J.P.; STICH, B. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm set. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 56-71, 2012.

VANEGAS-ANGARITAS H.; LEÓN, C.; LÉON, L.N. Análisis genético de la tolerancia a *Cercospora* spp. en líneas endogâmicas de maíz tropical. **Agrociencia**, v. 41, p. 35-43, 2007.

VIEIRA, R.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T.; SOUTO, E.R.; MESQUINI, R.M. Resistência de híbridos de milho-pipoca a *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.5, p.391-395, 2009a.

VIEIRA, R.A.; SCAPIM, C.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T. Diallel analysis of leaf disease resistance in inbred Brazilian popcorn cultivars. **Genetics and Molecular Research**, v. 08, n. 04, p. 1427-1436, 2009b.

VIEIRA, R.A.; SCAPIM, C.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T. Diallel analysis of yield, popping expansion and Southern rust resistance in popcorn lines. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, p. 774-780, 2011.

VIEIRA, R.A. **Melhoramento genético da resistência à helmintosporiose comum, cercosporiose e ferrugem polissora em milho-pipoca**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

VIVEK, B.; ODONGO, O.; NJUGUNA, J.; IMANYWOHA, J.; BIGIRWA, G.; DIALLO, A.; PIXLEY, K. Diallel analysis of grain yield and resistance to seven diseases of African maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Euphytica**, v.172, p.329-340, 2010.

XU, Y.; SKINNER, D. J.; WU, H.; PALACIOS-ROJAS, N.; ARAUS, J. L.; YAN, J.; GAO, S.; WARBURTON, M. L.; CROUCH, J. H. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. **International Journal of Plant Genomics**, Philadelphia, v. 2009, p. 1-30, 2009.

WANG, H.; XIAO, Z.X.; WANG, F.G.; XIAO, Y.N.; ZHAO, J.R.; ZHENG, Y.L.; QIU, F.Z. Mapping of HtNB, a gene conferring nonlesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 2523-2533, 2012.

WANG, P.; SOUMA, K.; KOBAYASHI, Y.; IWABUCHI, K.; SATO, C.; MASUKO, T. Influences of Northern Leaf Blight on corn silage fermentation quality, nutritive value and feed intake by sheep. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 81, p. 487-493, 2010.

WELZ, H. G.; GEIGER, H. H. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, p. 1-14, 2000.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. 78 p.

WRAY, N.R.; VISSCHER, P.M. Population genetics and its relevance to gene mapping. In: NEALE, B.N.M.; FERREIRA, M.A.R.; MEDLAND, S.E.; POSTHUMA, D. (Ed.). **Statistical genetics: Gene mapping through linkage and association**. New York: Taylor & Francis Group, p. 87-112, 2008.

ZHANG, Y.; XU, L.; ZHANG, D.; DAI, J.; WANG, S. Mapping of southern corn rust-resistant genes in the W2D inbred line of maize (*Zea mays* L.). *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 25, n. 3, p. 433-439, 2010.

ZHAO, P.; ZHANG, G.; WU, X.; LI, N.; SHI, D.; ZHANG, D.; JI, C.; XU, M.; WANG, S. Fine Mapping of RppP25, a Southern Rust Resistance Gene in Maize. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 55, n. 5, p. 462-472, 2013.

ZHOU, C.J.; CHEN, C.X.; CAO, P.X. Characterization and fine mapping of RppQ, a resistance gene to southern corn rust in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 278, p. 723-728, 2007.

## CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO E MELHORAMENTO PARA RESISTÊNCIA ÀS PRINCIPAIS DOENÇAS FOLIARES EM LINHAGENS DE MILHO

### RESUMO

O trabalho teve como objetivo caracterizar linhagens de milho comum para resistência à mancha branca, helmintosporiose, cercosporiose e ferrugem polissora, e sugerir cruzamentos com base na diversidade genética detectada em marcadores SNP. Para a caracterização das 72 linhagens, o experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados com três repetições. Os valores genotípicos das 72 linhagens para severidade às principais doenças foram preditos empregando-se o procedimento REML/BLUP. Para a avaliação da diversidade genética, as 72 linhagens foram genotipadas com marcadores SNP empregando-se a Plataforma 650K (Affymetrix®). A diversidade genética foi quantificada utilizando-se os métodos de Tocher e UPGMA. Pela análise dos resultados, observa-se a existência de variabilidade genética entre as linhagens de milho, sendo possível classifica-la em três grandes grupos. Considerando o bom desempenho das linhagens CD37, CD 49 e CD50 como fontes de resistência às doenças estudadas, recomenda-se a utilização como doadoras de genes em programas de melhoramento de milho. Aliando as informações da distância genética com as altas herdabilidades encontradas para as doenças foliares, recomenda-se o retrocruzamento de materiais aparentados com diferentes níveis de resistência, decorrentes do grupo I. As correlações genéticas de baixa magnitude entre as doenças estudadas indicam a possibilidade de seleção para cada doença sem comprometer as demais.

**Palavras-chave:** Resistência genética, *Pantoea ananatis*, *Exserohilum turcicum*, *Cercospora zea-maydis*, *Puccinia polysora*.

# IDENTIFICATION AND BREEDING TO RESISTANCE TO MAIN LEAF DISEASES IN MAIZE LINES

## ABSTRACT

The aim of this work was to characterize common corn strains for resistance to white spot, northern leaf blight, gray leaf spot and southern rust, and to suggest crosses based on the genetic diversity detected in SNP markers. For the characterization of the 72 maize lines, the experiment was conducted in a randomized complete block design with three repetitions. The genotypic values of the 72 maize lines for severity of the main diseases were predicted using by the procedure of REML / BLUP. For the evaluation of genetic diversity, genotyping of the 72 maize lines with SNP markers was performed with the 650 K Platform (Affymetrix®). Genetic diversity was evaluated using the Tocher and UPGMA methods. For the analysis of the results, it was observed the existence of genetic variability among maize, being possible to classify it into three large groups. Considering the good performance of the CD37, CD49 and CD50 maize lines as sources of resistance to the leaf diseases studied, it is recommended to use as gene donors in breeding programs. Combining genetic distance information with the high heritabilities found for foliar diseases, it is recommended the backcrossing of related materials with different levels of resistance, resulting from group I. The genetic correlations of low magnitude among the diseases studied indicate the possibility of selection for each disease without compromising the others.

**Keywords:** Genetic resistance, *Pantoea ananatis*, *Exserohilum turcicum*, *Cercospora zea-maydis*, *Puccinia polysora*.

## 2.1 INTRODUÇÃO

As doenças de plantas consistem em uma interação dinâmica entre três componentes principais, um patógeno virulento, um hospedeiro suscetível e um ambiente favorável. Deste modo, satisfazendo essas condições, a interação ocorrerá, culminando no aparecimento dos sintomas da doença (BRITO, 2012). O dano imediato das doenças foliares na cultura do milho após o aparecimento dos sintomas é a redução da capacidade fotossintética das plantas, em virtude da habilidade do patógeno colonizar grandes áreas dos tecidos foliares das mesmas (BRITO et al., 2008).

Nas duas últimas décadas foi detectado um aumento expressivo na frequência de doenças de milho, principalmente as foliares. Este aumento da incidência e severidade das doenças está altamente relacionado às modificações ocorridas no sistema de produção do milho, que por um lado resultaram no aumento de produtividade da cultura, mas por outro lado também foram responsáveis por promover modificações na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no surgimento de novos problemas referente à ocorrência de doenças (SILVA et al., 2015).

Dentre as doenças foliares do milho, a mancha branca, a helmintosporiose, a cercosporiose e a ferrugem polissora são reconhecidamente importantes, tanto pelo potencial de redução de rendimento de grãos, quanto pela ocorrência generalizada nas regiões produtoras do Brasil e do mundo (COSTA et al., 2009). Além disso, são relatados outros problemas, como a ineficiência de fungicidas para controle da mancha branca (JULIATTI et al., 2004); ao fato da ocorrência da helmintosporiose predispor a planta à patógenos causadores de podridão do colmo (COTA et al., 2010); a deterioração do colmo e o acamamento da planta causado pela cercosporiose, sob altas severidades (CASELA; FERREIRA, 2003); e pela alta variabilidade que apresenta o patógeno da ferrugem polissora, o que permite rápida adaptação aos materiais resistentes disponíveis no mercado (DUDIENAS et al., 2013).

A despeito dos meios de controle de doenças e da tecnologia disponível no setor agrícola, o uso de cultivares geneticamente resistentes é a principal medida de controle, uma vez que reduz custos de produção e diminui os riscos à atividade e ao meio ambiente (VIEIRA et al., 2009). Neste aspecto, informações genéticas advindas de estudos de caracterização e diversidade genética do germoplasma possibilitam

orientar as ações dos programas de melhoramento, sobretudo, na identificação de fontes de resistência e quantificação da variabilidade genética da população, fornecendo informações essenciais aos melhoristas para a predição de genótipos superiores e de cruzamentos que otimizem a heterose (CRUZ et al., 2012).

No que diz respeito ao desenvolvimento de cultivares geneticamente resistentes, tendo como base investigações de fontes de resistência às principais doenças foliares da cultura do milho, as pesquisas realizadas são bem restritas a comunidade científica. Deste modo, foram encontrados apenas os trabalhos desenvolvidos por Arnhold (2008), Vieira et al. (2009) e Kurosawa (2015).

A quantificação da diversidade genética pode fundamentar-se em informações agronômicas, morfológicas, bioquímicas, moleculares, dentre outras (GONÇALVES et al., 2008; LEAL et al., 2009). Em estudos preditivos da divergência genética com base em marcadores moleculares é uma ferramenta de fundamental importância, por direcionar com maior precisão os cruzamentos que possibilitarão a maior probabilidade de obtenção de genótipos superiores, através da formação de grupos (FERNANDES et al., 2015). Este método tem sido comumente utilizado em análises de divergência genética de genótipos de milho (ADEYEMO et al., 2011; ROTILLI et al., 2012; GRASSI et al., 2015; FERNANDES et al., 2015)

Diante do exposto, os objetivos do trabalho foram caracterizar linhagens de milho comum para resistência à mancha branca, helmintosporiose, cercosporiose e ferrugem polissora, e sugerir cruzamentos com base na diversidade genética detectada em marcadores SNP.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Local do Experimento

Os experimentos foram realizados no campo experimental e no laboratório de Biotecnologia da empresa COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (24°53'8.54"S; 53°32'4.72"W; 678 m de altitude), em Cascavel – PR.

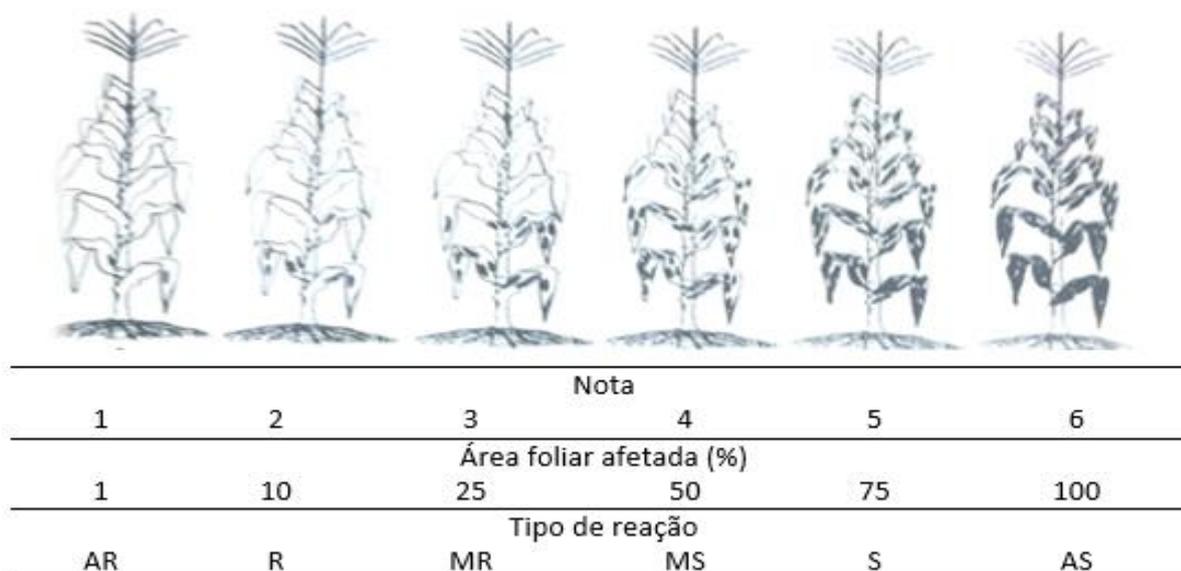
### 2.2.2 Caracterização das Linhagens

Foi realizada a caracterização de 72 linhagens COODETEC, sendo denominadas de CD01 a CD72. Tais linhagens são constituídas de diferentes níveis de resistência às doenças foliares (mancha branca, helmintosporiose, cercosporiose e ferrugem polissora) do milho.

O experimento foi conduzido em condições de campo, empregando o delineamento em blocos casualizados com três repetições, sendo cada repetição estabelecida como um ano agrícola (safrinha 2013, 2014 e 2015). A unidade experimental constituiu-se de quatro fileiras de cinco metros, com 20 plantas por fileira e espaçamento entre linhas de 0,76 m. Como bordadura, utilizou-se quatro fileiras de um híbrido altamente suscetível às doenças foliares, a fim de aumentar a pressão de doenças no experimento. Os tratos culturais foram efetuados conforme as recomendações da cultura, com exceção da aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2010).

As linhagens foram infectadas naturalmente em campo e posteriormente, avaliadas quanto às lesões foliares na fase de enchimento de grãos, ou seja, realizada aos 32 dias após o florescimento, por ser indicada por Lopes et al. (2007) como a mais prática e usual em programas de melhoramento e por apresentar alta correlação (99%) com a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença).

A avaliação da severidade das doenças foi feita por meio de estimativa visual da área foliar afetada pela doença com o auxílio da escala diagramática variando de 1 a 6, de acordo com a porcentagem da área foliar total da planta afetada (Figura 1).



**Figura 1.** Escala diagramática para avaliação de doenças foliares do milho.

AR- alta resistência, R – resistente, MR - mediana resistência, MS – mediana suscetibilidade, S - suscetível, AS – alta suscetibilidade. Fonte: Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) - <http://panorama.cnpms.embrapa.br/marcos/avaliacao-de-doencas-do-milho>.

As notas de mancha branca, helmintosporiose, cercosporiose e ferrugem polissora atribuídas as linhagens foram submetidos à análise genotípica pelo procedimento de REML/BLUP (máxima verossimilhança residual ou restrita/ melhor predição linear não viciada), que conduzem a estimação e predição mais precisas de parâmetros genéticos e valores genéticos, respectivamente (RESENDE, 2008). Por haver dados desbalanceados, os efeitos do modelo precisaram ser testados via testes F da Análise de Deviance.

A estimação dos parâmetros genéticos utiliza o valor fenotípico ( $y$ ) conhecido, para a predição dos valores genéticos (VG) e dos valores genotípicos (VGp), que são variáveis aleatórias desconhecidas (RESENDE, 2002). O valor fenotípico pode ser expresso por  $y = \mu + a + d + e$ , em que  $y$  é o valor fenotípico temporário,  $\mu$  é a média geral,  $a$  é o efeito aditivo,  $d$  é o efeito de dominância,  $e$  é o efeito de ambiente,  $\mu + a$  é o valor genético aditivo, e  $\mu + a + d = \mu + g$  é o valor genotípico.

Os parâmetros e valores genotípicos foram obtidos considerando o modelo 21 do software SELEGEN-REML/BLUP, adequado para seleção de genótipos com várias repetições e observações de médias, em único local, conforme modelo:  $y = Xr + Zg + e$ , em que  $y$  é o vetor de dados,  $r$  é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral,  $g$  é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como

aleatórios) e  $e$  é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos (RESENDE, 2008).

A partir dos valores genotípicos obtidos pelo procedimento de REML/BLUP, foi estimado o coeficiente de correlação genotípica através da análise de correlação simples de Pearson. A significância dos coeficientes de correlação foi avaliada pelo teste t, em 1% e 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do software estatístico Genes (CRUZ, 2006).

### 2.2.3 Análise da Diversidade Genética por Marcadores SNP

Discos foliares de 72 linhagens de milho no estágio V5 foram coletados, devidamente acondicionadas e levadas até o Laboratório de Biotecnologia da COODETEC, para realização do processo de extração do DNA. O DNA genômico foi obtido empregando-se o protocolo Doyle e Doyle (1990). As amostras foram quantificadas e a pureza foi verificada em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c).

As amostras de DNA genômico foram enviadas para a Companhia Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), que realizou a genotipagem com marcadores SNP com a Plataforma 650K. Do total de 616.201 marcadores SNP avaliados, 418.287 marcadores foram polimórficos e com alta resolução.

Para a análise dos resultados, o cálculo da distância genética entre duas populações (I e J) foi estimado de acordo com Yao et al. (2007), a partir do coeficiente de coincidência simples obtido pela expressão:

$$CS = 2 \frac{N_{ij}}{N_i + N_j} \quad (1)$$

em que  $N_{ij}$  é o número de alelos comuns a ambas as populações para determinado *primer*,  $N_i$  é o número total de alelos SNP na população i e  $N_j$  o número total de alelos na população j. O complemento do coeficiente de coincidência simples entre pares de itens foi portanto estimada por:

$$D_{ij} = 1 - CS = 1 - \left\{ 2 \left[ 2 \frac{N_{ij}}{N_i + N_j} \right] \right\} \quad (2)$$

Com base nas distâncias, foi construída uma matriz de valores  $D_{ij}$ , a qual deu origem à matriz de dissimilaridade genética.

A diversidade genética entre os acessos foi avaliada utilizando-se o método de otimização de Tocher e pelo método da ligação média entre grupos ou UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), conforme sugerido por (CRUZ et al., 2012). O ponto de corte no dendrograma foi baseado na seguinte fórmula: Ponto de corte = Média + (Desvio padrão x valor referencial do corte) (CRUZ, 2008). Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2008).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de caracterização de linhagens apresentou acurácias relativamente altas (acima de 86%) (Tabela 1), obtendo excelente precisão experimental, pois mede a correlação entre os valores genéticos preditos e os valores observados (RESENDE, 2008).

Os valores genotípicos preditos das linhagens para a reação às doenças foliares foram: MB variaram de  $1,33 \pm 0,93$  a  $5,32 \pm 1,09$ ; HT de  $2,18 \pm 0,90$  a  $5,30 \pm 1,03$ ; CZ de  $2,2 \pm 0,77$  a  $5,6 \pm 0,89$ ; e PP de  $1,48 \pm 1,03$  a  $5,71 \pm 1,01$  (Tabela 1). Estes resultados evidenciam a existência de grande variabilidade genética para as características estudadas em linhagens de milho. Além disso, indicam que existem fontes de resistência que podem ser utilizados com o intuito de melhorarem a tolerância à mancha branca (CD 02, 13, 15, 18, 22, 23, 28, 49, 50, 56, 57, 62, 64), à helmintosporiose (CD 07, 28, 30 e 41), à cercosporiose (CD 49) e à ferrugem polissora (CD 02, 10, 11, 12, 15, 19, 21, 26, 28, 31, 40, 41, 43, 46, 49, 50, 51, 58 e 59) (Tabela 1). Considerando o bom desempenho das linhagens CD37, CD 49 e CD50 como fontes de resistência, sugere-se a utilização como doadoras de genes em programas de melhoramento de milho.

**Tabela 1.** Valores genotípicos preditos (VG) com os limites inferiores (INF) e superiores (SUP), e parâmetros genéticos para os caracteres de resistência à mancha branca (MB), à helmintosporiose (HT), à cercosporiose (CZ) e à ferrugem polissora (PP) estimados pelo REML/BLUP (SELEGEN, Modelo 21) avaliados em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safrinha 2013, 2014 e 2015).

LIN.	MB			HT			CZ			PP		
	VG	INF	SUP									
CD01	3,42	2,48	4,35	3,81	2,91	4,71	3,60	2,83	4,70	3,59	2,57	4,60
CD02	1,46	0,37	2,55	2,25	1,22	3,28	4,82	3,93	5,71	1,91	0,88	2,93
CD03	3,42	2,48	4,35	3,06	2,16	3,96	4,44	3,67	5,20	4,36	3,49	5,23
CD04	2,81	1,72	3,90	2,75	1,72	3,78	3,07	2,18	3,97	4,46	3,43	5,48
CD05	4,11	3,18	5,05	4,19	3,29	5,08	4,86	4,09	5,62	2,95	1,94	3,96
CD06	3,83	2,90	4,77	4,06	3,16	4,96	3,60	2,83	4,37	3,18	2,16	4,21
CD07	4,67	3,73	5,60	2,18	1,28	3,08	3,60	2,83	4,37	2,53	1,51	3,54
CD08	3,83	2,9	4,77	2,68	1,79	3,58	5,00	4,23	5,76	2,31	1,30	3,33
CD09	3,83	2,9	4,77	3,44	2,54	4,33	4,44	3,67	5,20	3,59	2,57	4,60
CD10	4,67	3,73	5,60	4,19	3,29	5,08	5,42	4,65	6,18	1,89	0,88	2,90
CD11	4,67	3,73	5,60	4,19	3,29	5,08	5,42	4,65	6,18	1,89	0,88	2,90
CD12	2,75	1,66	3,84	3,25	2,22	4,28	2,49	1,60	3,38	1,89	0,88	2,90

continua..

LIN.	MB			HT			CZ			PP		
	VG	INF	SUP									
CD13	1,89	0,95	2,82	2,43	1,54	3,33	5,42	4,65	6,18	2,53	1,51	3,54
CD14	3,00	2,06	3,93	2,43	1,54	3,33	4,86	4,09	5,62	3,59	2,57	4,60
CD15	1,61	0,67	2,54	2,31	1,41	3,21	3,60	2,83	4,37	1,89	0,88	2,90
CD16	4,67	3,73	5,60	4,56	3,67	5,46	4,24	3,35	5,13	4,22	3,21	5,24
CD17	4,67	3,73	5,60	4,19	3,29	5,08	4,82	3,93	5,71	3,59	2,57	4,60
CD18	1,61	0,67	2,54	3,44	2,54	4,33	4,44	3,67	5,20	3,59	2,57	4,60
CD19	2,58	1,65	3,52	2,68	1,79	3,58	3,07	2,18	3,97	1,89	0,88	2,90
CD20	4,67	3,73	5,60	4,56	3,67	5,46	3,18	2,41	3,95	3,16	2,15	4,18
CD21	4,25	3,32	5,19	3,06	2,16	3,96	3,66	2,76	4,55	1,89	0,88	2,90
CD22	1,61	0,67	2,54	2,31	1,41	3,21	4,44	3,67	5,20	4,22	3,21	5,24
CD23	1,90	0,81	2,99	3,13	2,10	4,16	3,63	2,74	4,52	4,87	3,85	5,89
CD24	3,00	2,06	3,93	3,06	2,16	3,96	2,76	1,99	3,53	2,53	1,51	3,54
CD25	3,83	2,9	4,77	2,43	1,54	3,33	3,07	2,18	3,97	2,95	1,94	3,96
CD26	2,58	1,65	3,52	2,81	1,91	3,71	4,02	3,25	4,78	1,89	0,88	2,90
CD27	4,67	3,73	5,60	3,06	2,16	3,96	3,60	2,83	4,37	2,53	1,51	3,54
CD28	1,89	0,95	2,82	2,18	1,28	3,08	3,60	2,83	4,37	1,89	0,88	2,90
CD29	2,72	1,79	3,66	3,44	2,54	4,33	3,60	2,83	4,37	3,59	2,57	4,60
CD30	3,00	2,06	3,93	2,18	1,28	3,08	3,60	2,83	4,37	3,59	2,57	4,60
CD31	2,16	1,23	3,10	2,68	1,79	3,58	5,42	4,65	6,18	1,89	0,88	2,90
CD32	3,00	2,06	3,93	2,68	1,79	3,58	4,30	3,53	5,06	2,53	1,51	3,54
CD33	4,59	3,51	5,68	5,30	4,27	6,33	5,18	4,29	6,08	4,01	3,00	5,02
CD34	2,58	1,65	3,52	3,06	2,16	3,96	5,42	4,65	6,18	5,71	4,70	6,72
CD35	4,25	3,32	5,19	3,44	2,54	4,33	4,44	3,67	5,20	2,53	1,51	3,54
CD36	3,33	2,24	4,42	3,37	2,34	4,40	4,79	3,90	5,69	5,71	4,70	6,72
CD37	2,16	1,23	3,19	3,06	2,16	3,96	2,76	1,99	3,53	2,31	1,30	3,33
CD38	2,58	1,65	3,52	3,06	2,16	3,96	4,02	3,25	4,78	2,53	1,51	3,54
CD39	3,39	2,30	4,48	3,25	2,22	4,28	4,82	3,93	5,71	3,18	2,16	4,21
CD40	2,58	1,65	3,52	2,68	1,79	3,58	3,60	2,83	4,37	1,91	0,88	2,93
CD41	3,42	2,48	4,35	2,18	1,29	3,08	2,76	1,99	3,53	1,89	0,88	2,90
CD42	2,58	1,65	3,52	3,44	2,54	4,33	3,60	2,83	4,37	4,22	3,21	5,24
CD43	2,72	1,65	3,52	3,44	2,54	4,33	4,44	3,67	5,20	1,89	0,88	2,90
CD44	2,58	1,65	3,52	4,56	3,67	5,46	4,24	3,35	5,13	3,18	2,16	4,21
CD45	3,39	2,30	4,48	4,25	3,22	5,28	4,82	3,93	5,71	3,18	2,16	4,21
CD46	3,00	2,06	3,93	2,68	1,79	3,58	4,44	3,67	5,20	1,89	0,88	2,90
CD47	3,00	2,06	3,93	4,19	3,29	5,08	5,42	4,65	6,18	4,86	3,85	5,87
CD48	3,00	2,06	3,93	2,68	1,79	3,58	3,18	2,41	3,65	2,95	1,94	3,96
CD49	1,61	0,67	2,54	2,31	1,41	3,21	2,2	1,43	2,97	1,89	0,88	2,90
CD50	1,89	0,95	2,82	3,06	2,16	3,96	2,76	1,99	3,53	1,89	0,88	2,90
CD51	3,44	2,35	4,53	3,63	2,60	4,66	4,79	3,90	5,69	1,48	0,45	2,50
CD52	4,87	3,78	5,96	5,04	4,01	6,07	5,18	4,29	6,08	5,71	4,70	6,72
CD53	3,42	2,48	4,35	2,68	1,79	3,58	3,60	2,83	4,37	4,86	3,85	5,87
CD54	4,25	3,32	4,19	3,06	2,16	3,96	4,44	3,67	5,20	4,86	3,85	5,87
CD55	1,33	0,39	2,26	2,41	1,39	3,44	4,24	3,35	5,13	3,18	2,16	4,21

continua..

LIN.	MB			HT			CZ			PP		
	VG	INF	SUP									
CD56	3,97	2,88	5,05	4,25	3,22	5,28	3,60	2,83	4,37	4,86	3,85	5,87
CD57	1,33	0,39	2,26	3,75	2,72	4,78	3,60	2,83	4,37	4,86	3,85	5,87
CD58	2,30	1,37	3,24	2,75	1,72	3,78	4,86	4,09	5,62	1,89	0,88	2,90
CD59	2,30	1,37	3,24	2,41	1,39	3,44	5,42	4,65	6,18	1,89	0,88	2,90
CD60	2,16	1,23	3,10	2,92	1,89	3,95	4,86	4,09	5,62	4,86	3,85	5,87
CD61	2,23	1,14	3,32	4,25	3,22	5,28	4,82	3,93	5,71	4,46	3,43	5,48
CD62	1,61	0,67	2,54	2,92	1,89	3,95	5,42	4,65	6,18	4,22	3,21	5,24
CD63	2,16	1,23	3,10	4,69	3,79	5,59	3,07	2,18	3,97	2,53	1,51	3,54
CD64	1,61	0,67	2,54	3,81	2,91	4,71	3,60	2,83	4,37	2,53	1,51	3,54
CD65	3,42	2,48	4,35	3,25	2,22	4,28	3,60	2,83	4,37	4,65	3,64	5,66
CD66	2,58	1,65	3,52	3,25	2,22	4,28	3,60	2,83	4,37	4,65	3,64	5,66
CD67	2,23	1,14	3,32	3,25	2,22	4,28	4,82	3,93	5,71	3,18	2,16	4,21
CD68	3,39	2,30	4,48	3,25	2,22	4,28	3,66	2,76	4,55	4,46	3,43	5,48
CD69	5,32	4,23	6,40	4,25	3,22	5,28	5,60	4,71	6,49	5,31	4,28	6,33
CD70	2,23	1,14	3,32	3,25	2,22	4,28	3,66	2,76	4,55	3,18	2,16	4,21
CD71	2,23	1,14	3,32	2,25	1,22	3,28	3,66	2,76	4,55	3,18	2,16	4,21
CD72	3,39	2,30	4,48	3,25	2,22	4,28	4,82	3,93	5,71	3,18	2,16	4,21
Acur.		0,91			0,86			0,91			0,94	
Média		3,02			3,25			4,14			3,24	
Vg		1,28			0,80			0,88			1,63	
Ve		0,76			0,80			0,50			0,58	
Vf		2,04			1,61			1,39			2,21	
h <sup>2</sup> g		0,62			0,50			0,63			0,73	
h <sup>2</sup> média		0,83			0,75			0,83			0,89	
CVgi%		37,49			27,6			22,73			39,42	
CVe%		28,92			27,47			17,23			23,52	

Acur = acurácia; Vf = variância fenotípica; Vg = variância genotípica; Ve = variância residual; h<sup>2</sup>g = herdabilidade genética no sentido amplo; h<sup>2</sup>média = herdabilidade média das linhagens no sentido amplo; CVgi% = coeficiente de variação genotípica; CVe% = coeficiente de variação residual.

Os valores genotípicos preditos para a resistência à mancha branca (MB), à helmintosporiose (HT), à cercosporiose (CZ) e à ferrugem polissora (PP) foram de 3,02 e 3,25, 4,14 e 3,24, respectivamente (Tabela 1). Observa-se que a constituição genética forneceu a maior contribuição para a expressão da resistência às doenças foliares ( $Vg_{MB} = 1,28$ ,  $Vg_{CZ} = 0,88$  e  $Vg_{PP} = 1,63$ ), visto que o ambiente teve uma menor influência, com valores de 0,76, 0,50 e 0,58, respectivamente. Para a expressão da resistência à helmintosporiose, a constituição genética apresentou a mesma contribuição do que a ambiental ( $Vg = 0,8$  e  $Ve = 0,8$ ). A elevada influência da variação ambiental sobre a característica de interesse pode ser um fator de agravante na

avaliação de linhagens, pois dificulta a identificação dos genótipos, quando baseadas apenas no fenótipo observado (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

A herdabilidade fundamenta-se na proporção da variância fenotípica que está sob controle genético, através da estimativa da razão entre a variação genética e a variância total (BORÉM; MIRANDA, 2013). A herdabilidade média das linhagens no sentido amplo observada para a reação às quatro doenças foliares foram elevadas (acima de 75%) (Tabela 1), evidenciando a possibilidade de se obter genótipos superiores através de estratégias simples de melhoramento, como o retrocruzamento (CRUZ et al., 2012).

O método de retrocruzamento permite transferir um ou poucos genes de um dos genitores, denominado genitor doador (GD), para o genitor recorrente (GR), sendo muito utilizado para a transferência de genes de resistência a doenças (BORÉM; MIRANDA, 2013). A recuperação do genoma do genitor recorrente é gradativa, ou seja, quanto maior a divergência genética entre os dois genitores, maior será o número de retrocruzamentos necessários para restaurar o genoma do recorrente (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007). Com isso, existe maior eficiência no processo se a distância genética for a menor possível entre o genitor recorrente e o genitor doador.

Com os dados de diversidade genética, verifica-se a existência de variabilidade entre as linhagens, visto que a maior distância genética registrada foi de 0,3186 (CD01 x CD17) e a menor distância 0,0015 (CD18 x CD56), sendo a distância média de 0,1771. Estes valores de distância entre linhagens foram semelhantes e considerados de baixa magnitude por Aguiar et al. (2008), Adeyemo et al. (2011) e Fernandes et al., (2015), em virtude de o número de marcadores serem relativamente menores (99, 75 e 44, respectivamente), quando comparados ao estudo realizado (418.287 marcadores).

Com a variabilidade encontrada entre as linhagens, a avaliação da divergência genética por meio de marcadores moleculares se torna uma ferramenta de fundamental importância, por sugerir possíveis cruzamentos, através da formação de grupos (FERNANDES et al., 2015). Pelo método de agrupamento de Tocher, foi possível reunir as linhagens em três grandes grupos com os respectivos subgrupos (Tabela 2). O grupo I foi composto pela maior parte do germoplasma de milho, abrangendo 91,6% das linhagens avaliadas. Com relação aos subgrupos, o subgrupo I apresentou 77% das 72 linhagens, seguido pelos subgrupos II, III, IV, IX e X que

constituíram de duas linhagens cada. Já os subgrupos V, VI, VII, VIII, XI e XII foram representados de maneira isolada pelas linhagens CD51, CD46, CD69, CD27, CD34 e CD17, respectivamente.

Para análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, o nível de corte arbitrário foi estabelecido no tamanho relativo dos níveis das fusões (distâncias) no dendrograma, sendo definido o ponto de corte na distância 0,30. Desta forma, assim como no agrupamento de Tocher, a análise de agrupamento UPGMA, obtida com base na matriz de dissimilaridade genética, mostrou-se a divisão das linhagens em três grandes grupos (Figura 2).

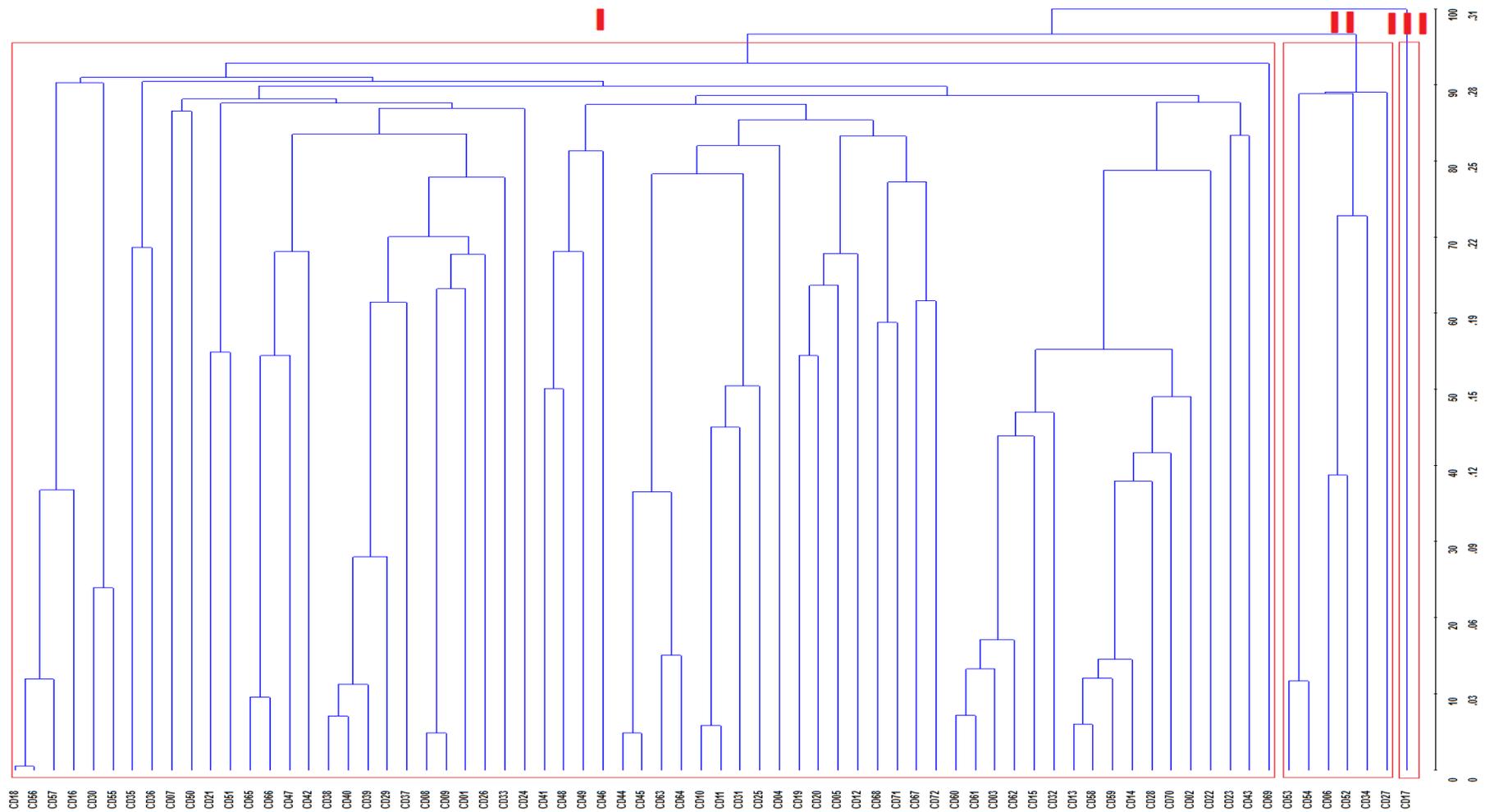
**Tabela 2.** Tabela 2. Agrupamento pelo método de Tocher com base na distância do complemento de coincidência simples obtida através de marcadores moleculares SNP, em linhagens de milho (Cascavel/PR, 2016).

GRUPO	SUBGRUPO	LINHAGENS													
I	I	18	56	57	16	43	9	8	26	37	29	38	39	40	1
		33	42	65	66	47	68	71	72	44	45	64	63	4	5
		19	20	12	67	31	10	11	25	70	21	24	28	15	58
		13	59	14	32	3	60	62	61	2	22	23	49	41	48
	II	30	55												
	III	35	36												
	IV	7	50												
	V	51													
VI	46														
VII	69														
VIII	27														
II	IX	53	54												
	X	6	52												
	XI	34													
III	XII	17													

Dentre os métodos de análise multivariada preditivos, os métodos de Tocher e do UPGMA tem merecido destaque por serem extensivamente utilizados em estudos de divergência genética de milho comum (PAIXÃO et al., 2008; COIMBRA et al., 2010; ADEYEMO et al., 2011; FERNANDES et al., 2015), pois permite agrupar genótipos com maior similaridade, de forma com que haja homogeneidade dentro de cada grupo

e heterogeneidade entre os grupos (CARGNELUTTI FILHO et al., 2008). Deste modo, fornecem informações essenciais para a escolha de genitores, possibilitando uma maior probabilidade de sucesso em cruzamentos posteriores (ROTILLI et al., 2012).

Aliando as informações da distância genética com as altas herdabilidades encontradas para as doenças foliares, recomenda-se o cruzamento de materiais aparentados com diferentes níveis de resistência, ou seja, materiais decorrentes do mesmo grupo (Grupo I, Figura 2), por meio do método de retrocruzamento. Neste sentido, possíveis retrocruzamentos podem ser sugeridos, como os das linhagens CD37 (GD) x CD 33 (GR), CD49 (GD) x CD69 (GR) e CD50 (GD) x CD16 (GR), a fim de elevar a resistência aos patógenos estudados e recuperar o mais rápido possível o genoma do genitor recorrente.



**Figura 2.** Dendrograma do agrupamento pelo método UPGMA de 72 linhagens de milho, com base na distância do complemento de coincidência simples obtida através de marcadores moleculares SNP (Cascavel/PR, 2016).

Para facilitar a seleção de genótipos promissores, utiliza-se a estimativa de coeficientes de correlação genotípica entre características de interesse, por envolver uma associação de natureza herdável (CRUZ et al., 2012). Neste trabalho, foi observada uma correlação genotípica altamente significativa ( $p < 0,01$ ) e positiva de 0,38 para a seleção simultânea de genótipos resistentes a MB x HT e de 0,33 para HT x PP (Tabela 3). Além disso, observa-se uma correlação genotípica significativa ( $p < 0,05$ ) e positiva de 0,24 para HT x CZ. Corroborando com os resultados, Arnhold et al. (2008) estudando a seleção para resistência a doenças foliares em famílias S1 de milho-pipoca, verificaram correlações genotípicas para a mancha branca x ferrugem comum de 0,24, helmintosporiose x ferrugem comum de 0,35 e mancha branca x helmintosporiose de -0,59.

**Tabela 3.** Valores dos coeficientes de correlações genéticas obtidos para resistência à mancha branca (MB), à helmintosporiose (HT), à cercosporiose (CZ) e à ferrugem polissora (PP), estimados pela correlação simples de Pearson. (Cascavel/PR, safrinha 2016).

	MB	HT	CZ	PP
MB	-			
HT	0,38**	-		
CZ	0,21 <sup>ns</sup>	0,24*	-	
PP	0,10 <sup>ns</sup>	0,33**	0,21 <sup>ns</sup>	-

\*\*Significativo a 1% de probabilidade; \*Significativo a 5%; <sup>ns</sup> não significativo.

Segundo Lopes et al. (2002), há uma tendência entre os melhoristas de plantas de se valorizar mais o sinal (positivo ou negativo) e a magnitude dos valores na interpretação aplicada das correlações do que a significância das mesmas, valorizando desta forma estimativas de correlações acima de  $\pm 0,5$ . Desta forma, as correlações genéticas de baixa magnitude entre as doenças estudadas indicam a possibilidade de seleção para cada doença sem comprometer as demais.

## 2.4 CONCLUSÃO

Existe variabilidade genética entre as linhagens de milho, sendo possível classificá-la em três grandes grupos. Considerando o bom desempenho das linhagens CD37, CD 49 e CD50 como fontes de resistência às doenças estudadas, recomenda-se a utilização como doadoras de genes em programas de melhoramento de milho.

Aliando as informações da distância genética com as altas herdabilidades encontradas para as doenças foliares, recomenda-se o retrocruzamento de materiais aparentados com diferentes níveis de resistência, decorrentes do grupo I.

As correlações genéticas de baixa magnitude entre as doenças estudadas indicam a possibilidade de seleção para cada doença sem comprometer as demais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMO, O.; MENKIR, A.; MELAKU, G.; OMIDIJI, O. Genetic diversity assessment and relationship among tropical-yellow endosperm maize inbred lines using SSR markers. **Maydica**, v. 56, p. 17-23, 2011.

AGUIAR, C.G.; SCHUSTER, I.; AMARAL, A.T.JR.; SCAPIM, C.A.; VIEIRA, E.S. Heterotic groups in tropical maize germplasm by test crosses and simple sequence repeat markers. **Genet. Mol. Res**, v. 7, p.1233-1244, 2008.

ARNHOLD, E. Seleção para resistência a doenças foliares em famílias S1 de milho pipoca. **Revista Ceres**, v. 55, p. 89-93, 2008.

BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Curitiba: UFPR, 2007. Disponível em: <[www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo](http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo)>. Acessado em: 25/02/2017.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2013. 523p.

BRITO, A.H.; PEREIRA, J.L.A.R.; PINHO, R.G.V.; BALESTRE, M. Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 11, p. 49-59, 2012.

BRITO, A.H.; PINHO, R.G.V.; SOUSA FILHO, A.X.; ALTOÉ, T.F. Avaliação da severidade da cercosporiose e rendimento de grãos em híbridos comerciais de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 07, p. 19-31, 2008.

CARGNELUTTI FILHO, A.; RIBEIRO, N.D.; REIS, C.P.; SOUZA, J.R.; JOST, E. Comparação de métodos de agrupamento para o estudo da divergência genética em cultivares de feijão. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2138-2145, 2008.

CASELA C.R.; FERREIRA, A.S. **A Cercosporiose na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2003. 5p. (Circular técnica, 24).

COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; CRUZ, C.D.; MELO, A.V.; ECKERT, F.R. Caracterização e divergência genética de populações de milho resgatadas do sudeste de Minas Gerais. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 159-166, 2010.

COSTA, R.V.; CASELA, C. R.; COTA, L.V. Doenças. In: CRUZ, J.C. (Ed.). **Cultivo de milho**. 6. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Sistemas de produção, 1).

COTA, L.V.; SILVA, D.D.; COSTA, R.V.; PARREIRA, D.F. **Recomendação para o Controle Químico da Helmintosporiose do Sorgo (*Exserohilum turcicum*)** 1. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Circular técnica, 149).

CRUZ, C.D. **Programa Genes** - Estatística Experimental e Matrizes. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. v. 1. 285 p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes** - Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. v. 2. 514p.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p.13-15, 1990.

DUDIENAS, C.; FANTIN, G.M.; DUARTE, A.P.; TICELLI, M.; BÁRBARO, I.M.; FREITAS, R.S.; LEÃO, C.P.L.; CAZENTINI FILHO, G.; BOLONHEZI, D.; PÂNTANO, A.P. Severidade de ferrugem polissora em cultivares de milho e seu efeito na produtividade. **Summa phytopathol.**, v. 39, n.1, p.16-23, 2013.

EMBRAPA. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. (Manual técnico).

FERNANDES, E.H.; SCHUSTER, I.; SCAPIM, C.A.; VIEIRA, E.S.N.; COAN, M.M.D. Genetic diversity in elite inbred lines of maize and its association with heterosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 6509-6517, 2015.

GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C.P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1289-1297, 2008.

GRASSI, P.G.M.; ANDRADE, J.A.C.; SILVA, C.L.S.P.; MORAES, M.L.T.; CERESINI, P.T. Divergência genética entre linhagens de milho utilizando microssatélites e correlação com desempenho de híbridos simples. **Revista Cultura Agrônômica**, v. 24, n. 1, p. 1-16, 2015.

JULIATTI, F.C.; APPELT, C.C.N.S.; BRITO, C.H.; GOMES, L.S.; BRANDÃO, A.M.; HAMAWAKI, O.T.; MELO, B. Controle da feosféria, ferrugem comum e cercosporiose pelo uso da resistência genética, fungicidas e épocas de aplicação na cultura do milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.20, n.3, p.45-54, 2004.

KUROSAWA, R.N.F. **Fontes de resistência a doenças foliares, podridões de espiga e divergência genética entre genótipos de milho pipoca**. 2015. 117p. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento de plantas) – Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

LEAL, A.A.; MANGOLIN, C.A.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; SCAPIM, C.A.; MOTT, A.S.; ELOI, I.B.O.; CORDOVÉS, V.; SILVA, M.F.P. Efficiency of RAPD versus SSR markers in determination of genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 225-229, 2009.

LOPES, A.C.A.; VELLO, N.A.; PANDINI, F.; ROCHA, M.M.; TSUTSUMI, C.Y. Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.2, p.341-348, 2002.

LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P. da; MATIELLO, R.R.; CAMARGO, L.E.A. Controle genético da resistência à mancha-de-Phaeosphaeria em milho. **Ciência Rural**, v.37, p.605-611, 2007.

PAIXÃO, S.L.; CAVALCANTE, M.; FERREIRA, P.V.; MADALENA, J.A.S.; PEREIRA, R.G. Divergência genética e avaliação de populações de milho em diferentes ambientes no Estado de Alagoas. **Revista Caatinga**, v. 21, p.191-195, 2008.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa, 2002. 975 p.

RESENDE, M.D.V. **Genômica quantitativa e seleção no melhoramento de plantas perenes e animais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

ROTILI, E.A.; CANCELLIER, L.P.; DOTTO, M.A.; PELUZIO, J.M.; CARVALHO, E.V. Divergência genética em genótipos de milho, no estado do Tocantins. **Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 516-521, 2012.

SILVA, D.D.; COTA, L.V.; COSTA, R.V. Doenças. In: SILVA, D.D.; COTA, L.V.; COSTA, R.V. **Cultivo de milho**. 9. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. (Sistemas de produção, 1).

VIEIRA, R.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T.; SOUTO, E.R.; MESQUINI, R.M. Resistência de híbridos de milho-pipoca a *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.5, p.391-395, 2009.

YAO, Q.; YANG, K.; PAN, G.; RONG, T. Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, p. 851-860, 2007.

## CAPÍTULO 2 – CONTROLE GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA À MANCHA BRANCA E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO EM LINHAGENS DE MILHO

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi identificar regiões genômicas associadas com a resistência à mancha branca (MB) em linhagens de milho comum e estudar o controle genético envolvido na resistência por meio da análise de médias e variâncias. Para o mapeamento por associação, 72 linhagens foram previamente genotipadas para marcadores SNP na plataforma 650K (Affymetrix®), e os seus respectivos valores genotípicos foram preditos pelo REML/BLUP para à MB. A fim de evitar associações espúrias entre marcadores SNPs e o caráter estudado, realizou-se inicialmente a análise de estrutura da população. A análise de associação entre os marcadores SNPs e a MB foi realizada utilizando-se modelo linear misto (MLM). Para o estudo do controle genético, o experimento foi conduzido no ano de 2016 e foi composto por blocos casualizados com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelos genitores (1 e 2) e suas gerações  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$  e  $RC_2$ . Por meio das notas atribuídas às linhagens e as suas respectivas gerações, foram extraídos os dados genotípicos relacionado à herança da doença estudada. As estimativas dos parâmetros genéticos e ambientais, foram baseadas na análise das variâncias das gerações segregantes e não segregantes. De acordo com as análises, foram encontrados QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 10 para à MB do milho, podendo aumentar, reduzir ou até mesmo anular o efeito desse atributo. No entanto, as regiões genômicas para busca de alelos que promovem o aumento da resistência à mancha branca com o uso de marcadores SNP, encontram-se nos cromossomos 2, 4 e 8. O controle genético da resistência à MB é quantitativo para os parentais empregados no estudo, sendo os efeitos aditivos mais importantes na determinação do caráter. A herdabilidade restrita das notas de resistência à MB foi elevada (74%), permitindo boa eficiência de seleção de genótipos superiores e ganhos por seleção satisfatórios.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, *Pantoea ananatis*, resistência genética, desequilíbrio de ligação.

# GENETIC CONTROL FOR WHITE LEAF SPOT RESISTANCE AND MAPPING BY ASSOCIATION IN MAIZE LINES

## ABSTRACT

The aim of this work was to identify genomic regions associated with white leaf spot (WLS) resistance in common maize lines and to study of control involved in the resistance by the analysis of means and variances. For association mapping, 72 maize lines were previously genotyped for SNP markers on the 650K platform (Affymetrix®), and their respective genotypic values were predicted by REML/BLUP for WLS. In order to avoid spurious associations between SNPs markers and the studied character, the analysis of population structure was initially performed. The analysis of association between the SNPs and WLS markers was carried out using a linear mixed model (LMM). For the study of genetic control, the experiment was conducted in 2016 and was composed of randomized blocks with three replicates, the treatments consisting of the parents (1 and 2) and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub> and RC<sub>2</sub> generations. By means of the notes attributed to the lines and their respective generations, the genotypic data related to the inheritance of the studied disease were extracted. Estimates of genetic and environmental parameters were based on the analysis of the variances of the segregating and non-segregating generations. According to the analyzes, QTLs were found on chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 10 for WLS of maize, which may increase, reduce or even override the effect of this attribute. However, the genomic regions for the search for alleles that promote the increase of resistance to white leaf spot with the use of SNP markers, are found in chromosomes 2, 4 and 8. The genetic control of resistance to WLS is quantitative for the parents employed in the study, with the additive effects being more important in the character determination. The restricted heritability of WLS resistance scores was high (74%), allowing good selection efficiency of superior genotypes and satisfactory selection gains.

**Keywords:** *Zea mays*, *Pantoea ananatis*, genetic resistance, linkage disequilibrium.

### 3.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as maiores causas da descontinuidade do plantio de híbridos comerciais de milho devem-se às epidemias de novas doenças ou ainda, de novas raças de patógenos pré-existentes, antes consideradas sem importância econômica. Isso acontece principalmente pelo cultivo de híbridos suscetíveis, monocultivo, melhoramento sem seleção para doenças e mudanças nos sistemas de produção, como plantio direto e plantios safrinha (SILVA et al., 2015). Tal foi o caso da mancha branca, de ocorrência endêmica na forma de pequenas e esparsas lesões foliares, começou a assumir proporções epidêmicas a partir do ano 1990, em várias regiões do país (SCHIPANSKI, 2011).

A mancha branca é considerada atualmente, uma das principais doenças foliares da cultura do milho, tanto pelos prejuízos que tem causados às culturas suscetíveis (até 60% da produção), quanto pela ampla distribuição (COSTA et al., 2009) em praticamente todas as regiões produtoras de milho no Brasil, além de várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (SIBIYA et al., 2011; KRAWCZYK et al., 2010). Os sintomas da doença são caracterizados por lesões foliares irregulares a elípticas, inicialmente aquosas verde-claro que evoluem para lesões necróticas.

Algumas medidas de controle podem auxiliar na diminuição do inoculo e nos danos causados por doenças, como o plantio antecipado, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (SILVA et al., 2015). No entanto, a baixa eficiência dos fungicidas no controle da mancha branca, deve-se ao envolvimento da etiologia bacteriana para a doença, pois estes não apresentam ação secundária contra doenças bacterianas (COSTA et al., 2012).

O método mais racional e eficaz que existe para controle de doenças em plantas cultivadas é a resistência genética, sendo expressivo sua contribuição para o melhoramento genético, com o desenvolvimento de cultivares geneticamente resistentes (VIEIRA et al., 2009). Entretanto, o desenvolvimento de cultivares é um trabalho intenso, uma vez que envolve desde a identificação de fontes de resistência e estudo do controle genético, até a elaboração e execução de estratégias eficientes na transferência dos alelos de resistência para as linhagens de milho que participam dos híbridos comerciais (SCHUELTER et al., 2003).

A condução de qualquer programa de melhoramento é facilitada, se houver informações sobre as fontes de resistência e o controle genético do caráter. Isso

porque possibilita aos melhoristas a escolha da estratégia mais adequada para direcionar os trabalhos de introdução de genes em germoplasmas suscetíveis e maximizar a exploração da variabilidade genética (FALCONER; MACKAY, 1996).

Segundo estudos de herança da mancha branca, a característica é descrita como quantitativa, sendo a ação gênica aditiva predominante, ou seja, é governada por um grande número de genes de pequeno efeito (DERERA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009; VIVEK et al., 2010; NIHEI; FERREIRA, 2012). Apesar de sua herança ser quantitativa, a resistência à mancha branca tem sido relatada como um caráter que apresenta alta herdabilidade (LOPES et al., 2007; MOREIRA et al., 2009).

Recentemente, vêm sendo desenvolvidos trabalhos de mapeamento por associação para caracteres qualitativos e quantitativos (*Quantitative Trait Loci* - QTL), auxiliados pelos marcadores moleculares SNPs, para complementação dos estudos sobre herança genética com mapas mais saturados (MOREIRA et al., 2009). Por definição, mapeamento por associação, também conhecido como mapeamento por desequilíbrio de ligação, ou mapeamento por desequilíbrio de fase gamética, baseia-se na identificação dos polimorfismos que se correlacionam com a variação fenotípica e, deste modo, cria associações entre marcadores genéticos e fenótipo, explorando a diversidade genética (MACKAY; POWELL, 2007). Esse método pode ser aplicado a uma série de populações experimentais ou não experimentais, despontando como uma importante metodologia para mapear genes de interesse (CASTRO; PEREIRA, 2008).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi identificar regiões genômicas associadas com a resistência à mancha branca em linhagens de milho comum e estudar o controle genético envolvido na resistência por meio da análise de médias e variâncias.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Mapeamento por Associação

Para à análise de associação, o trabalho foi conduzido em duas etapas, sendo a primeira realizada a genotipagem das linhagens e a segunda, a fenotipagem para resistência às doenças foliares.

A genotipagem procedeu-se da análise das regiões genômicas associadas para à mancha branca em 72 linhagens de milho da COODETEC. A extração, quantificação e purificação do DNA genômico das linhagens, seguiu o mesmo protocolo utilizado para a análise de diversidade genética (Tópico 2.2.2). Realizou-se a genotipagem com marcadores SNP com a Plataforma 650K (Affymetrix®). Do total de 616.201 marcadores SNP, foram empregados 418.287 marcadores que apresentaram resultados de alta resolução e polimórficos nas amostras utilizadas, para a realização das análises.

A partir dos dados de marcadores moleculares SNP obtidos, foi realizada inicialmente a análise de estrutura populacional, a fim de evitar associações falso-positivas entre marcadores e a característica alvo. Assim sendo, utilizou-se o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para o modelo bayesiano generalizado, por meio do software InStruct (GAO et al., 2007). A vantagem da utilização do algoritmo implementado no software InStruct é que não pressupõe o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população.

Para se obter uma boa convergência dos dados, foram estimadas as frequências alélicas para cada número de subpopulações simuladas ( $k$ ) e na sequência, estimou-se a probabilidade da linhagem  $i$  pertencer a uma população  $k$ . Deste modo, foram empregados burn-in de 5000 simulações com 50 mil repetições (Run Length Periods), testando-se oito possibilidades de sub-agrupamentos. O melhor valor de  $k$  é o que apresenta o maior valor de  $\ln \Pr(x|k)$  entre todos os valores de  $k$  simulados.

A fenotipagem consistiu da análise visual para à mancha branca em 72 linhagens COODETEC, sendo o experimento conduzido nos anos de 2013 a 2015. Deste modo, a fenotipagem baseou-se da predição dos valores genotípicos derivadas das notas de resistência para à mancha branca, de acordo com o estudo da

caracterização de linhagens (Tópico 2.2.3). Os valores genotípicos foram obtidos considerando o modelo 21 do software SELEGEN-REML/BLUP (RESENDE, 2008).

A análise de associação entre os marcadores SNPs e o caráter alvo (MB), foi realizada empregando o modelo linear misto (MLM), por meio do software estatístico TASSEL versão 5.2.12 (BRADBURY et al., 2007).

O MLM é representado pela fórmula  $\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Q}\mathbf{v} + \mathbf{Z}\mathbf{u} + \mathbf{e}$ , onde  $\mathbf{y}$  é o vetor dos valores fenotípicos,  $\mathbf{X}$  é o vetor que representa os valores genotípicos de SNP,  $\boldsymbol{\beta}$  é o vetor dos efeitos fixos dos genótipos,  $\mathbf{Q}$  é a matriz estimada com a análise de estrutura da população,  $\mathbf{v}$  é o vetor de efeitos fixos decorrentes das populações,  $\mathbf{Z}$  é matriz identidade,  $\mathbf{u}$  é o vetor de efeitos aleatórios relacionados ao background genético e  $\mathbf{e}$  é o vetor de erros aleatórios.

A significância das associações entre os marcadores SNP e o atributo fenotípico MB, foi determinada por meio da identificação dos maiores valores de  $-\text{Log}_{10}(P)$ . Os  $-\text{Log}_{10}(P)$  foram utilizados para a obtenção dos gráficos do tipo Manhattan Plot.

### 3.2.2 Estudo do Controle Genético

Para o estudo do controle genético, o experimento foi conduzido na safrinha de 2016, utilizando duas linhagens oriundas do estudo da caracterização das linhagens, do programa de melhoramento de milho da COODETEC. Tais linhagens foram selecionadas por diferirem na resistência à mancha branca, ou seja, uma linhagem altamente resistente (CDL 15 – genitor 1) e a outra altamente suscetível à doença em estudo (CDL 69 – genitor 2) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Altura (ALT), número total de folhas, florescimento masculino (FL. M) e feminino (FL. F), resistência à mancha branca (MB) das linhagens utilizadas no estudo do controle genético.

LINHAGEM	ALT <sub>(m)</sub>	Nº FOLHAS	FL. M <sub>(DAS)</sub>	FL. F <sub>(DAS)</sub>	MB
CDL 15	1,20	16	78	79	AR
CDL 69	1,6	9	51	53	AS

m: metros; DAS: dias após a emergência da plântula; AR: altamente resistente; AS: altamente suscetível.

Empregando-se os procedimentos de polinização controlada, as sementes das linhagens genitoras, bem como as gerações  $F_1$ , foram obtidas na safrinha de 2015 e na safra seguinte, correspondendo à safra de 2015/16, a geração  $F_2$  e os retrocruzamentos,  $RC_{1.1}$  ( $F_1 \times P_1$ ) e  $RC_{1.2}$  ( $F_1 \times P_2$ ).

Os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental composto por blocos casualizados com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelas gerações. A semeadura foi realizada no dia 7 de março de 2016, correspondendo à safrinha 2016. Cada parcela foi representada por duas fileiras de 5m para as gerações genitoras ( $P_1$  e  $P_2$ ) e  $F_1$ , quatro fileiras de 5m para as gerações  $RC_{1.1}$  e  $RC_{1.2}$  e oito fileiras de 5m para a geração  $F_2$ , sendo cada fileira constituída de 20 plantas, com espaçamento de 0,25m entre plantas e 0,5m entre fileiras. Como bordadura, utilizou-se quatro fileiras de híbrido altamente suscetível às doenças foliares. Além disso, colocaram-se entre as linhas restos culturais de milho com lesões foliares da doença em questão, a fim de aumentar a fonte de inóculo dos patógenos no experimento.

Dentro do experimento, foi realizada a marcação individual das plantas para cada geração, para que posteriormente fossem avaliadas. Em virtude da segregação ser diferente em cada geração, foram marcadas 12 plantas para cada geração genitora ( $P_1$  e  $P_2$ ) e  $F_1$ , 48 plantas para cada retrocruzamento ( $RC_{1.1}$  e  $RC_{1.2}$ ) e 150 plantas para o  $F_2$ , de acordo com as recomendações de Cruz et al. (2012). Os tratamentos culturais foram efetuados conforme as recomendações da cultura, com exceção da aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2010).

As linhagens foram infectadas naturalmente em campo e posteriormente, avaliadas quanto às lesões foliares na fase de enchimento de grãos, ou seja, 32 dias após o florescimento (DAF), com o auxílio de uma escala diagramática com notas de 1 a 6 (Figura 5).

Por meio das notas atribuídas às linhagens e as suas respectivas gerações, foram extraídos os dados genotípicos relacionado à herança da doença estudada.

Os estudos genéticos sobre a herança da resistência à mancha branca, com base nas médias e variâncias das populações, foram realizados conforme descrito por Mather & Jinks (1982). As estimativas dos parâmetros genéticos e ambientais, baseada na análise das variâncias das gerações segregantes e não segregantes,

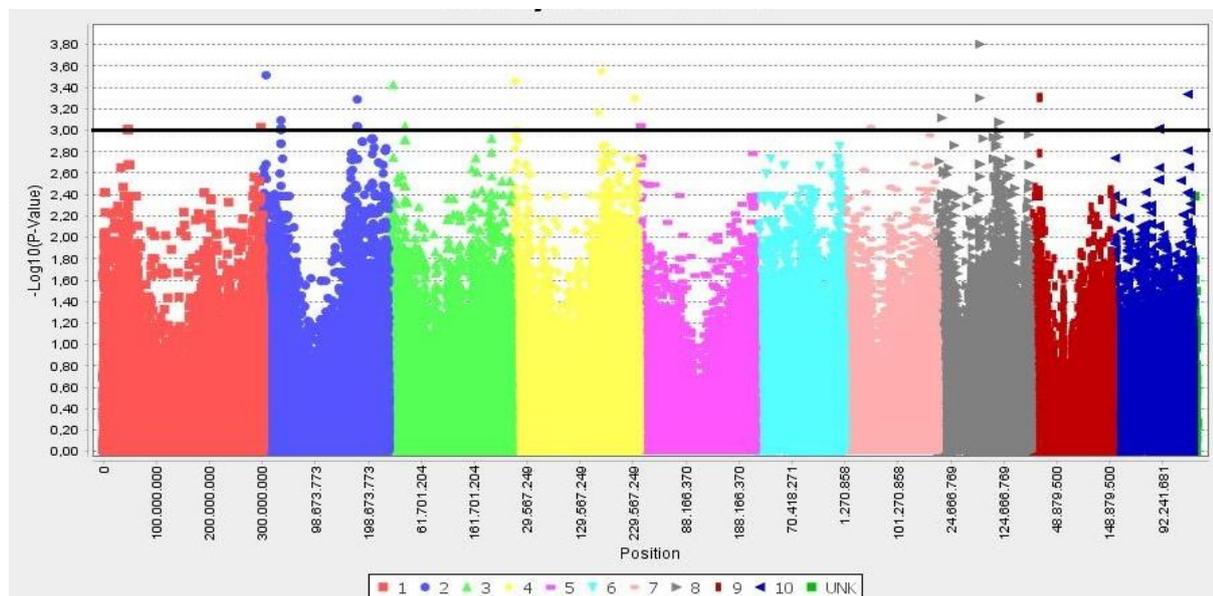
foram realizadas segundo Cruz et al. (2012). As médias das gerações segregantes e não segregantes foram utilizadas para estimar os efeitos envolvidos na determinação da resistência genética à mancha branca, utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados (MATHER; JINKS, 1982; CRUZ et al., 2012). Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Mapeamento por Associação para a Resistência à Mancha Branca

Pela análise de associação por MLM para resistência à mancha branca, foram detectadas 75 associações ( $p \leq 0,05\%$ ), distribuídos nos 10 cromossomos ( $n = 10$ ) do milho, com exceção do cromossomo 6 do milho. Houve maior predominância das associações no cromossomo 2 (47 associações), seguidas dos cromossomos 8 e 10 (6 associações), cromossomo 1 (5 associações), cromossomo 4 (4 associações), cromossomos 3, 5 e 9 (2 associações) e cromossomo 7 (1 associação).

Com os valores estimados de  $-\log_{10}(P\text{-valor})$  para cada marcador SNP associados à MB pelo método MLM, constata-se uma ampla variação de valores de probabilidade (P-valor), sendo a maioria derivado de associações falso-positivas ao longo do genoma das linhagens estudadas (Figura 3). Deste modo, considerando um P-valor mínimo de 0,05%, destacado no gráfico denominado Manhattan plot, por uma linha paralela ao eixo x, observa-se visualmente uma tendência para fortes associações nos cromossomos 2, 4, 8 e 10 (Figura 3).



**Figura 3.** Manhattan plot resultante das associações para à mancha branca nos cromossomos de milho (Cascavel/PR, 2016).

**Tabela 5.** Associação de marcadores SNP com à mancha branca do milho que apresentam os maiores coeficientes de determinação genotípicos em cada cromossomo (Cascavel/PR, 2016).

MARC.	CROM.	POSIÇÃO	DISTÂNCIA (Kb)	F	PROB.	R <sup>2</sup> (%)	EFEITO A	EFEITO B
SNP18918	1	46406731	0	11,94	0,0010	17,7	-19,60	0,00
SNP18920	1	46406900	0,16	11,94	0,0010	17,7	19,60	0,00
SNP18922	1	46407120	0,38	11,94	0,0010	17,7	19,60	0,00
SNP18923	1	46407281	0,55	11,94	0,0010	17,7	19,60	0,00
SNP95451	1	297565603	251.158,87	7,82	0,0009	23,2	-1,40	-2,42
SNP111830	2	33767002	0	7,62	0,0010	23,0	-0,83	0,58
SNP111843	2	33776183	9,18	7,76	0,0010	23,0	-0,83	0,58
SNP147881	2	177752277	143.985,28	7,83	0,0009	23,3	-0,05	-12,40
SNP147882	2	177752313	143.985,31	7,84	0,0009	23,3	-12,40	-0,06
SNP147888	2	177762691	143.995,69	8,57	0,0005	25,5	-1,25	-0,08
SNP173337	3	8597915	0	14,12	0,0037	21,0	-19,60	0,00
SNP180089	3	31104219	22.506,30	7,84	0,0009	23,3	-17,60	-0,52
SNP243104	4	6386706	0	14,31	0,0035	21,2	-1,44	0,00
SNP283613	4	163848152	157.141,44	8,2	0,0007	24,4	-18,30	-0,31
SNP285201	4	169971492	163.584,78	14,79	0,0028	22,0	-18,30	0,00
SNP306757	4	232943325	226.556,61	13,46	0,0005	20,0	-16,10	0,00
SNP312862	5	2927205	0	12,13	0,0009	18,0	-10,50	0,00
SNP312866	5	2927790	0,58	12,13	0,0009	18,0	10,50	0,00
SNP442289	7	50454268	0	7,82	0,0009	23,2	-2,91	-18,70
SNP481415	8	7676451	0	12,51	0,0008	18,6	11,50	0,00
SNP497607	8	79424095	71747,64	8,61	0,0005	25,6	-31,00	-2,24
SNP497619	8	79431525	71755,07	10,12	0,0016	30,1	-31,00	-2,09
SNP506468	8	115414356	107737,91	1,23	0,0008	18,3	-10,60	0,00
SNP506469	8	115414631	107738,18	1,23	0,0008	18,3	10,60	0,00
SNP534246	9	16342148	0	13,50	0,0005	20,0	0,18	0,00
SNP534253	9	16427106	84,96	13,50	0,0005	20,0	-18,50	0,00
SNP595058	10	85768435	0	11,97	0,0010	17,8	1,80	0,00
SNP595059	10	85768565	0,13	11,97	0,0010	17,8	1,80	0,00
SNP595073	10	85835396	66,96	1,19	0,0010	17,8	-1,80	0,00
SNP595076	10	85839544	70,98	1,19	0,0010	17,8	-1,80	0,00
SNP611306	10	139735193	53966,76	0,87	0,0005	25,9	-0,70	0,49

MARC. = Marcadores SNP; CROM. = Cromossomo; Kb = Kilobase; F = valor tabelado de F; PROB. = probabilidade; R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; EFEITO A = Efeito do alelo A; EFEITO B = efeito do alelo B.

Os coeficientes de determinação para cada marcador SNP no cromossomo com associação significativa pelo MLM explicaram de 17,7 a 30,1% da variação para resistência à mancha branca (Tabela 5). Com relação à distância entre os SNPs, constata-se marcadores muito próximos no cromossomo 1 (SNP18920, SNP18922,

SNP18923), no cromossomo 2 (SNP111830 e SNP111843) e no cromossomo 10 (SNP595058 e SNP595059; SNP595073 e SNP595076). Esses marcadores possuem os mesmos efeitos alélicos por estarem atuando sobre uma mesma região genômica, resultando em informações redundantes. Em espécies alógamas, como é o caso do milho, a extensão do desequilíbrio de ligação é relativamente curta (0,4 a 2,0 Kb) e declina rapidamente, atingindo algumas centenas de pares de bases quando as amostras são derivadas de variedades tradicionais e de linhagens, no entanto, varia de região para região no genoma (BORÉM; CAIXETA, 2009). Enfim, a utilização de apenas um marcador SNP por região genômica descritas nos cromossomos 1, 2 e 10 seja suficiente na seleção para resistência à mancha branca.

Pela seleção dos vinte marcadores SNP com maiores coeficientes de determinação para à MB, verifica-se as maiores magnitudes no cromossomo 8 e 10, com  $R^2$  de 0,301 e 0,259, respectivamente (Tabela 6). Contudo, detectou-se 13 associações significativas no cromossomo 2, sendo que parte dos marcadores SNP atuam sobre uma mesma região genômica, tais como: grupo A (SNP111830, SNP111843 e SNP111846); grupo B (SNP111855, SNP111894, SNP111895, SNP111900 e SNP111905) e grupo C (SNP147882, SNP147885, SNP147887 e SNP147888). Com exceção dos alelos *A* e *B* dos respectivos grupos B e A, responsáveis pelo aumento da suscetibilidade à mancha branca do milho (sinal com carga positiva), todos os demais alelos de marcadores associados com à MB promovem acréscimo diferencial da magnitude para esse atributo fenotípico (marcadores com sinais negativos).

Analisando conjuntamente o gráfico de Manhattan (Figura 3) e a tabela com os vinte maiores coeficientes de determinação (Tabela 6), constata-se que as regiões genômicas que promoveram o aumento da resistência à mancha branca, foram um QTL do grupo C (SNP147882, SNP147885, SNP147887 e SNP147888) localizado no cromossomo 2, um QTL (SNP283613) no cromossomo 4, um QTL (SNP442289) e um QTL (SNP497607 e SNP497619) no cromossomo 8. Nesses mesmos cromossomos, MOREIRA et al. (2009) e LANA et al. (2012) também identificaram QTLs relacionados com resistência à mancha branca por meio de análise de mapeamento por ligação gênica.

Moreira et al. (2009) mapearam seis QTLs, com um QTL nos cromossomos 1, 3, 4, 6 e dois QTLs no cromossomo 8, explicando 41,62% da variância fenotípica da mancha por *Phaeosphaeria*. Do mesmo modo, Lana et al. (2012) mapearam QTLs de

resistência à *Pantoea ananatis* em progênies de milho, encontrando 8 QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4 e 8, explicando aproximadamente 90% da variância genotípica da resistência à mancha branca em dois ambientes.

Relacionando as cinco linhagens mais resistentes e suscetíveis à MB do milho com os vinte marcadores com maiores coeficientes de determinação, nota-se a existência de regiões genômicas que partilham alelos de resistência em comum, tal como o grupo C localizado no cromossomo 2 e os marcadores (SNP497607 e SNP497619) no cromossomo 8 (Tabela 6). Levando em consideração o nível de resistência, observa-se que as linhagens resistentes apresentaram valores genômicos negativamente altos (acima de -108), já os suscetíveis mostraram baixos valores genômicos negativos (abaixo de -65), evidenciando a diferença de composição alélica de materiais tolerantes e sensíveis à mancha branca (Tabela 6). Os valores genômicos foram derivados da soma dos efeitos dos alelos presentes nos vinte marcadores com maior  $R^2$  para cada linhagem.

**Tabela 6.** Análise de associação com os vinte maiores coeficientes de determinação genotípicos para as cinco linhagens mais resistentes e suscetíveis à mancha branca do milho (Cascavel/PR, 2016).

MARC.	CROM.	POSIÇÃO	DIST. (Kb)	F	PROB.	R <sup>2</sup> (%)	EFEITO A	EFEITO B	LINHAGENS RESISTENTES					LINHAGENS SUSCETÍVEIS				
									2	15	49	55	57	10	17	20	52	69
SNP95451	1	297565603	0	7,82	0,0009	23,2	-1,40	-2,42	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	AA
SNP111830	2	33767002	0	7,76	0,0010	23,0	-0,83	0,58	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP111843	2	33776183	9	7,76	0,0010	23,0	-0,83	0,58	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP111846	2	33776628	10	7,76	0,0010	23,0	-0,83	0,58	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP111855	2	33779970	13	7,76	0,0010	23,0	0,58	-0,83	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP111894	2	33800419	33	7,76	0,0010	23,0	0,58	-0,83	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP111895	2	33800595	34	7,76	0,0010	23,0	0,58	-0,83	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP111900	2	33801017	34	7,76	0,0010	23,0	0,58	-0,83	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP111905	2	33802177	35	7,76	0,0010	23,0	0,58	-0,83	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA	AA
SNP147881	2	177752277	143985	7,83	0,0009	23,0	-0,05	-12,40	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	AA	BB	AA
SNP147882	2	177752313	143985	7,84	0,0009	23,3	-12,40	-0,06	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB
SNP147885	2	177752504	143986	7,84	0,0009	23,3	-12,43	0,00	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	AA
SNP147887	2	177762213	143995	7,84	0,0009	23,3	-1,24	-0,08	BB	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB	BB	AA
SNP147888	2	177762691	143996	8,57	0,0005	25,5	-1,25	-0,08	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB
SNP180089	3	31104219	0	7,84	0,0009	23,3	-17,60	-0,52	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP283613	4	163848152	0	8,2	0,0007	24,4	-18,30	-0,31	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP442289	7	50454268	0	7,82	0,0009	23,2	-2,91	-18,70	BB	AA	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB
SNP497607	8	79424095	0	8,61	0,0005	25,6	-31,00	-2,24	AA	BB	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB
SNP497619	8	79431525	7	10,1	0,0016	30,1	-31,00	-2,09	AA	BB	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB
SNP611306	10	139735193	0	0,87	0,0005	25,9	-0,70	0,49	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB
VALOR GENÔMICO									-143	-125	-108	-108	-132	-38	-38	-65	-34	-37

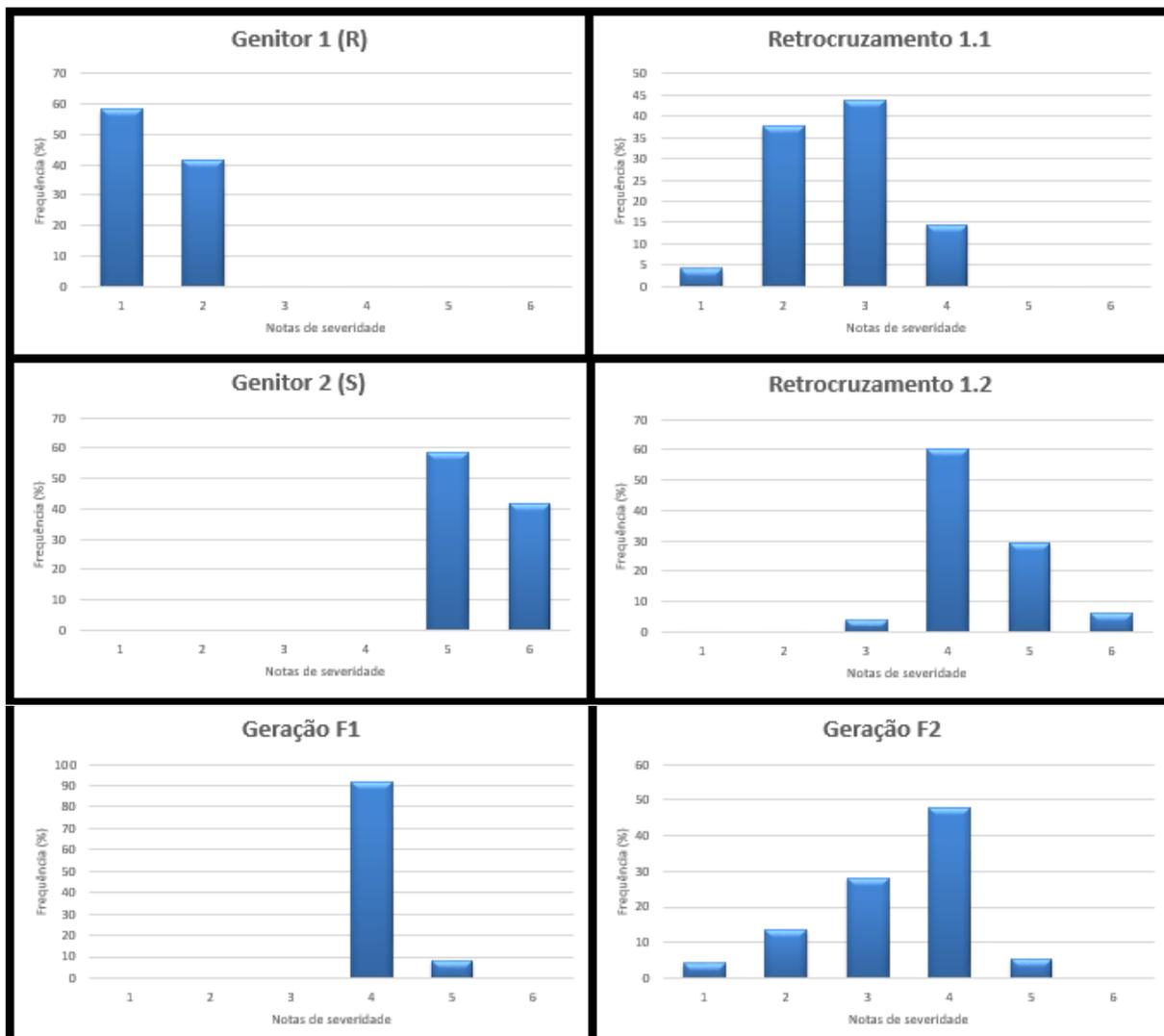
MARC. = Marcadores SNP; CROM. = Cromossomo; Kb = Kilobase; F = valor tabelado de F; PROB. = probabilidade; R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; EFEITO A = Efeito do alelo A; EFEITO B = efeito do alelo B.

A partir das informações obtidas pela análise de associação, é possível a realização de estudos de controle genético, a fim de se conhecer a magnitude da variabilidade e os efeitos gênicos envolvidos no caráter estudado. Desta forma, para estudos de herança genética baseados na análise de gerações, é fundamental a escolha de materiais altamente contrastantes, como é o caso das linhagens CD15 e CD69 (CRUZ et al., 2012).

### **3.3.2 Herança Genética de Resistência à Mancha Branca**

O estudo foi conduzido sob condições ambientais favoráveis, a fim de propiciar a infestação natural de doenças foliares na cultura do milho. Desta forma, houve alta incidência e severidade da doença em toda a área experimental, com amplitude máxima de 0 a 100% da área foliar do terço médio-superior (notas variaram de 1 a 6), possibilitando uma discriminação fidedigna dos níveis de resistência. Esta amplitude de severidade foi igual ou superior aos estudos da mancha branca sob infestações naturais (AMARAL, 2005; NIHEI; FERREIRA, 2012).

A distribuição das frequências de severidade das doenças é uma simplificação da frequência relativa do número de plantas utilizando-se os limites de classificação da escala diagramática. A distribuição comportou-se de maneira não-normal para todas as gerações, típica de características em que poucos genes estão envolvidos (Figura 4). Apesar da distribuição não-normal na geração segregante  $F_2$ , constata-se que 76% das plantas apresentou resistência moderada para a mancha branca (notas 3 e 4) e 92% na geração  $F_1$ , sendo um forte indício da presença de efeitos gênicos aditivos na expressão do caráter.



**Figura 4.** Distribuição das frequências de notas de severidade para a mancha branca, nas gerações genitoras ( $P_1$  e  $P_2$ ),  $F_1$ ,  $F_2$  e RC's (RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>) (Cascavel/PR, safrinha 2016).

Analisando-se as médias dos genitores (Tabela 7), pode-se observar que os  $P_1$  e  $P_2$  foram o mais resistente e o mais suscetível à mancha branca, respectivamente, evidenciando que são suficientemente contrastantes (Tabela 7 e Figura 4). Este resultado é um indicativo que os genitores possuem genes e alelos diferentes de resistência à mancha branca, o que é primordial para a realização de estudos genéticos (CRUZ et al., 2012). As gerações  $F_1$  e  $F_2$  apresentaram médias intermediárias aos genitores e as médias dos retrocruzamentos tenderam a aproximar-se das médias das linhagens utilizadas como genitor recorrente (Tabela 7). Tanto as médias das gerações quanto a distribuição das frequências das notas de severidade pressupõem efeitos aditivos atuando no controle genético da resistência à mancha branca.

Com relação as variâncias das populações de MB (Mancha branca) (Tabela 7), observa-se que as gerações P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e F<sub>1</sub> apresentaram os menores valores. Esses menores valores ocorrem devido às respectivas gerações possuírem o mesmo genótipo, sendo que qualquer variação que ocorre entre as plantas é de natureza ambiental. As demais gerações segregantes (RC<sub>1.1</sub>, RC<sub>1.2</sub> e F<sub>2</sub>), apresentam os maiores valores de variância (Tabela 7). Neste caso, além da variância ambiental estar influenciando as respectivas gerações, também está presente a variância genética (RAMALHO et al., 2008).

**Tabela 7.** Número de plantas avaliadas fenotipicamente, médias da severidade (sev), variâncias ( $\sigma^2$ ) e das variâncias médias da severidade V(sev) para resistência à mancha branca.

GERAÇÃO	Nº DE PLANTAS	MÉDIA(sev)	VARIÂNCIA( $\sigma^2$ )	V(sev)
P <sub>1</sub>	12	5,4166	0,2651	0,0220
P <sub>2</sub>	12	1,4166	0,2651	0,0220
F <sub>1</sub>	12	4,0833	0,0833	0,0069
F <sub>2</sub>	144	3,3888	0,8407	0,0058
RC <sub>1</sub>	48	4,3750	0,4521	0,0094
RC <sub>2</sub>	48	2,6875	0,6023	0,0125

As estimativas de parâmetros genéticos podem fornecer informações essenciais tanto para a seleção e definição do programa de melhoramento de uma população, quanto sobre a natureza e magnitude da ação gênica na herança dos caracteres (CRUZ, et al., 2012). Observa-se que a constituição genética forneceu a maior contribuição para a expressão da resistência à mancha branca ( $\hat{\sigma}_g^2 = 0,7573$ ), visto que o ambiente teve uma baixa influência ( $\hat{\sigma}_e^2 = 0,0833$ ) (Tabela 8). Verifica-se também que o componente genético aditivo é responsável pela maior contribuição para a variância genotípica ( $\hat{\sigma}_a^2 = 0,6269$ ), enquanto que os desvios de dominância representam uma menor importância ( $\hat{\sigma}_d^2 = 0,1308$ ), representando apenas 17,2% da variância genotípica.

A variância aditiva em quantidade suficiente promove o controle genético da resistência à mancha branca, constituindo um indicativo efetivo de seleção de

genótipos superiores, sendo assim, uma condição favorável ao melhoramento genético (LOPES et al., 2007).

Constata-se que as herdabilidades no sentido amplo e restrito para a resistência à mancha branca foram de 90,08% e 74,56% (Tabela 8), respectivamente, sendo uma importante ferramenta utilizada no melhoramento, uma vez que quantifica a proporção da variância genética que pode ser transmitida para a próxima geração (BORÉM; MIRANDA, 2013). Os valores de herdabilidade obtidos no trabalho são considerados altos, quando comparados com a da literatura, indicando que a seleção será eficiente baseando-se no fenótipo. Resultados de magnitudes de herdabilidade semelhantes foram encontradas para a resistência à mancha branca, variando de 61 a 88% (LOPES et al., 2007; MOREIRA et al., 2009; JULIATTI et al., 2013).

O controle genético da resistência à mancha branca é quantitativo para os genitores empregados no estudo (Tabela 8), sendo que o grau médio de dominância evidencia a existência de dominância parcial (valor estimado 0,6451). O grau médio da dominância expressa a relação entre o valor genotípico codificado do heterozigoto (d) e do homozigoto (a), sendo o valor estimado menor que 1 ( $d < a$ ). Corroborando com os resultados encontrados, segundo estudos de herança da mancha branca, a característica é descrita como quantitativa, ou seja, é governada por vários genes controlando parcialmente a característica e caracterizada pela não especificidade à raça do patógeno (GUIMARÃES et al., 2009; VIVEK et al., 2010).

Os resultados indicam a existência de aproximadamente 3,2 genes atuando no controle genético da mancha branca (Tabela 8). Resultado similar foi encontrado por Carson (2001), o qual encontrou de três a quatro genes de grande efeito na resistência. No entanto, relatos já identificaram: até três genes (LOPES et al., 2007) e pelo menos dois genes (PEGORARO et al., 2002; SCHUELTER et al., 2003). Diante disso, a resistência à mancha branca pode ser tanto de herança simples quanto de herança complexa, principalmente pelo envolvimento de genes de resistência parcial (AMARAL, 2005).

As expressões utilizadas para a predição da estimativa do número de genes são baseadas em uma série de pressuposições e, por esta razão, devem ser interpretadas com certa prudência, devido as mesmas poderem fornecer estimativas com valores diferentes. Apesar disso, as estimativas do número de genes são úteis como indicadores da natureza oligogênica ou poligênica da característica em questão (CRUZ et al., 2012).

**Tabela 8.** Estimativa das variâncias fenotípica, genotípica, aditiva, decorrentes de dominância e de ambiente, da herdabilidade no sentido amplo e restrito, do grau médio de dominância e da estimativa do número de genes para a característica resistência à mancha branca (MB).

PARAMÊTROS GENÉTICOS DA POPULAÇÃO F <sub>2</sub>	
PARAMÊTRO	MB
Variância fenotípica ( $\hat{\sigma}_f^2$ )	0,8407
Variância genotípica ( $\hat{\sigma}_g^2$ )	0,7573
Variância aditiva ( $\hat{\sigma}_a^2$ )	0,6269
Variância por dominância ( $\hat{\sigma}_d^2$ )	0,1304
Variância de ambiente ( $\hat{\sigma}_e^2$ )	0,0833
Herdabilidade no sentido amplo ( $\hat{h}_a^2$ )	0,9008
Herdabilidade no sentido restrito ( $\hat{h}_r^2$ )	0,7456
Grau médio da dominância (baseado em variâncias)	0,6451
Número de genes	3,19

As estimativas e a significância da hipótese de nulidade de cada parâmetro genético do modelo completo indicam que apenas a média geral ( $m$ ) e os efeitos aditivos ( $a$ ), contribuem para a determinação da resistência à mancha branca, enquanto que os demais modelos não apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9). Outros relatos encontraram predominância do modelo aditivo explicando as bases genéticas envolvidas na resistência à mancha branca (SCHUELTER et al., 2003; AMARAL, 2005; LOPES et al., 2007).

**Tabela 9.** Estimativas da média geral (m) e de efeitos gênicos aditivos (a), devidos aos desvios de dominância (d), epistáticos do tipo aditivo-dominante (ad) e epistáticos do tipo dominante-dominante (dd), obtidos pela análise das médias de seis gerações (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub>, RC<sub>2</sub>) avaliadas quanto a resistência à mancha branca.

PARAMÊTRO	ESTIMATIVA	VARIÂNCIA	T	PROB. %
m	2,8472	0,1923	6,4921	0,0000001 **
a	2,0000	0,011	19,0277	0,0 **
d	0,9305	1,2709	0,8254	58,5086 <sup>ns</sup>
aa	0,5694	0,1812	1,3374	17,8825 <sup>ns</sup>
ad	-0,6250	0,1320	-1,7198	8,4238 <sup>ns</sup>
dd	0,3055	0,5168	0,4250	64,4727 <sup>ns</sup>

\*\*Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo.

**Tabela 10.** Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d, aa, ad, dd), pelo método de eliminação de Gauss da característica resistência à mancha por branca.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	R <sup>2</sup> (%)
m/ a, d, aa, ad, dd	1	42,1481	10,28
a/ m, d, aa, ad, dd	1	362,0571	88,34
d/ m, a, aa, ad, dd	1	0,6813	0,16
aa/ m, a, d, ad, dd	1	1,7886	0,43
ad/ m, a, d, aa, dd	1	2,9577	0,72
dd/ m, a, d, aa, ad	1	0,1806	0,04
TOTAL	6	409,8136	

A prevalência da aditividade é comprovada quando se analisa a decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (Tabela 10). Conclui-se que os efeitos aditivos apresentam maior importância na determinação da resistência à mancha branca, pois explicam 88,34% da variabilidade do caráter estudado. Corroborando com os valores encontrados, Schuelter et al., (2003) estudando a herança da reação de resistência à *P. maydis* pela análise de média de gerações do cruzamento entre as linhagens contrastantes, encontraram valores de efeito aditivo de (R<sup>2</sup>) 87,64% da variabilidade da resistência à mancha branca.

A variabilidade genética da característica estudada com predominância dos efeitos aditivos representa a possibilidade de obtenção de genótipos resistentes, mais duradoura e estável, por meio de estratégias simples de melhoramento (CRUZ et al., 2012). Dentre eles, os métodos mais indicados são baseados em seleção recorrente, pois os alelos desejados são concentrados no decorrer das gerações. Outra alternativa é a utilização de retrocruzamentos, entretanto, com algumas modificações no procedimento (VIEIRA, 2010).

Por outro lado, quando os efeitos não-aditivos predominam, recomenda-se estratégias fundamentadas em sucessivas autofecundações ou por obtenção de plantas duplo-haplóide. Em condições relevantes de genes de resistência com efeitos aditivos e não-aditivos, uma opção eficiente é a utilização dos métodos de seleção recíproca entre parentais (VIEIRA, 2010).

De acordo com Cruz et al. (2012), apesar de o uso do modelo completo (Tabela 9) ser extremamente importante, já que fornece informações mais abrangentes sobre as causas e magnitudes dos componentes genéticos que controlam o caráter, se torna necessário também avaliar o modelo reduzido aditivo-dominante (Tabela 11). Este modelo tem sido comumente utilizado no melhoramento, por fornecer informações indispensáveis na avaliação dos métodos empregados e do êxito do mesmo, além de ser um modelo mais simples.

Por meio da análise do modelo aditivo-dominante, observa-se alta significância ( $p < 0,01$ ) para a mancha branca pelo teste t para os parâmetros da média, dos efeitos aditivos e de dominância (Tabela 11). Ainda, verifica-se que o modelo aditivo-dominante possibilita a obtenção de médias preditas que se correlacionam com as médias observadas em magnitude de 0,99, o que equivale um coeficiente de determinação de ( $R^2$ ) 98,17%. Pelos resultados conclui-se que o uso do modelo é satisfatório para explicar o comportamento da média das gerações.

Tais resultados para a MB foram igualmente encontrados por Schuelter et al., (2003), os quais observaram o modelo aditivo-dominante como adequado, devido ao fato de o mesmo explicar ( $R^2$ ) 63% do comportamento das médias das gerações. Diferindo dos resultados, Pegoraro et al. (2002) verificaram que o modelo aditivo-dominante não foi adequado para explicar as bases genéticas da resistência, o que sugere que os efeitos de aditividade são de maior significância, porém com desvios de dominância e epistasia também participando na manifestação fenotípica do caráter.

**Tabela 11.** Teste de significância da nulidade de modelos menos parametrizados dos parâmetros genéticos média geral (m), efeitos gênicos aditivos (a) e de dominância (d) obtidos das médias de seis gerações (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub>, RC<sub>2</sub>) para a característica resistência à mancha branca.

PARAMÊTRO	ESTIMATIVAS	VARIÂNCIA	t	PROB. %
m	3,1937	0,0068	38,5243	0,0 **
a	1,8904	0,0073	22,1002	0,0 **
d	0,7494	0,0174	5,6790	0,0000281 **
R <sup>2</sup>	98,17			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade.

**Tabela 12.** Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d), pelo método de eliminação de Gauss da característica resistência à mancha branca.

PARAMÊTRO	GL	SQ	R <sup>2</sup> (%)
m/ a, d	1	1484,1227	74,02
a/ m, d	1	488,4199	24,36
d/ m, a	1	32,2519	1,6
TOTAL	3	2004,7946	

Os resultados mostram que a média e o efeito gênico aditivo apresentaram as estimativas de maior magnitude na resistência à MB (Tabela 12). Com isso, tanto as análises das médias quanto das variâncias evidenciam que a variabilidade aditiva presente na geração F<sub>2</sub> é relativamente superior à atribuída aos desvios da dominância. Vários trabalhos com mancha branca já constataram a ação gênica aditiva como predominante (DERERA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009; VIVEK et al., 2010; NIHEI; FERREIRA, 2012).

A variabilidade genética da resistência à MB é conferida em maior magnitude pelos efeitos aditivos, o que representa não apenas a facilidade de seleção de genótipos superiores, mas também ganhos de seleção satisfatórios (CRUZ et al., 2012). Uma das contribuições da genética quantitativa ao melhoramento de plantas é a possibilidade de os melhoristas predizerem as estimativas dos ganhos de seleção (RAMALHO et al., 1993). Considerando que a seleção fosse realizada na geração F<sub>2</sub>

e com uma intensidade de seleção de 20% ( $i = 1,39$ ), foi estimado ganho estimado de 4,34% para o primeiro ciclo após a seleção, correspondendo aproximadamente a 28% de ganho por ciclo para a MB. Tal ganho seria em torno de dez vezes superior aos obtidos no trabalho de Arnhold (2008).

Diante do exposto, nos programas de melhoramento de plantas, primeiramente deve ser realizada a caracterização de suas fontes de resistência para que o processo de seleção seja eficiente, pois o controle genético do caráter pode variar entre diferentes fontes de resistência (LOPES et al., 2007).

### 3.4 CONCLUSÃO

Foram detectadas associações significativas para mancha branca em todos os cromossomos do milho, com exceção do cromossomo 6, podendo aumentar, reduzir ou até mesmo anular o efeito desse atributo. Esses resultados indicam o potencial de uso de marcadores significativos na obtenção de germoplasma com a resistência requerida em programas de melhoramento para a cultura.

As regiões genômicas para busca de alelos que promovem o aumento da resistência à mancha branca com o uso de marcadores SNP, encontram-se nos cromossomos 2, 4 e 8.

O controle genético da resistência à mancha branca é quantitativo para os parentais empregados no estudo, sendo os efeitos aditivos mais importantes na determinação do caráter.

A herdabilidade restrita para resistência à mancha branca do milho foi elevada (74%), permitindo boa eficiência de seleção de genótipos superiores e ganhos por seleção satisfatórios, baseadas em avaliações fenotípicas.

## REFERÊNCIAS

ALLARD, R.W. **Princípios do Melhoramento Genético das Plantas**. Rio de Janeiro: Usaid & Edgard Blücher, 1971. 380p.

AMARAL, A.L. **Etiologia e genética da resistência à mancha branca do milho**. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ARNHOLD, E. Seleção para resistência a doenças foliares em famílias S1 de milho pipoca. **Revista Ceres**, v. 55, p. 89-93, 2008.

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2013. 523p.

BRADBURY, P.J.; ZHANG, Z.; KROON, D.E.; CASSTEVENS, T.M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E.S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Oxford Journals Science & Mathematics Bioinformatics**, Okfords, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.

CARSON, M.L. Inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, 798-800, 2001.

CASTRO, C.M.; PEREIRA, A.S. **Mapeamento por associação em plantas: conceitos básicos e perspectivas de uso no melhoramento de batata**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 30p. (Documentos, 248).

COSTA, R.V.; CASELA, C. R.; COTA, L.V. Doenças. In: CRUZ, J.C. (Ed.). **Cultivo de milho**. 6. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Sistemas de produção, 1).

COSTA, R.V.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.; MEIRELLES, W.S.; LANZA, F.E. Viabilidade técnica e econômica da aplicação de estrobilurinas em milho. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p. 246-254, 2012.

CRUZ, C.D. **Programa Genes** - Biometria. 1st ed. Viçosa: UFV, 2006.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. v. 2. 514p.

DERERA, J.; TONGOONA, P.; VIVEK, B.S.; VAN RIJ, N.; LAING, M.D. Gene action determining *Phaeosphaeria* leaf spot disease resistance in experimental maize hybrids. **South African Journal of Plant and Soil**, v.24, p.138-144, 2007.

EMBRAPA. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. (Manual técnico).

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464p.

GAO, H.; MCDONNELL, A.; HARRISON, D.A.; MOORE, T.; ADAM, S.; DALY, K.; ESMONDE, L.; GOLDHILL, D.R.; PARRY, G.J.; RASHIDIAN, A.; SUBBE, C.P.; HARVEY, S. Systematic review and evaluation of physiological track and trigger warning systems for identifying at-risk patients on the ward. **Intensive Care Medicine**, Brussels, v. 33, n. 4, p. 667-6679, 2007.

GUIMARÃES, P.S.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; DUDIENAS, C.; LÜDERS, R.R.; GALLO, P.B. Capacidade combinatória para resistência à mancha branca em linhagens endogâmicas de milho. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.35, p.282-287, 2009.

JULIATTI, F.C.; PEDROSA, M.G.; JULIATTI, B.C.M; BELOTI, I.F.; FIGUEIRÓ, A.A. Identificação de QTLs associados à resistência parcial à mancha branca do milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1163 -1178, 2013.

KRAWCZYK, K.; KAMASA, J.; ZWOLINSKA, A.; POSPIESZNY, H. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. **Journal of Plant Pathology**, v.92, p.807-811, 2010.

LANA, U.G.P.; GOMES, E.A.; SILVA, D.D.; COSTA, R.V.; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; SOUZA, I.R.P.; GUIMARÃES, C.T. Detection and molecular diversity of *Pantoea ananatis* associated with white spot disease in Maize, Sorghum and Crabgrass in Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 441-448, 2012.

LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P. da; MATIELLO, R.R.; CAMARGO, L.E.A. Controle genético da resistência à mancha-de-Phaeosphaeria em milho. **Ciência Rural**, v.37, p.605-611, 2007.

MACKAY, I.; POWEL, W. Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, p. 57-63, 2007.

MATHER, S.K.; JINKS, J.L. **Biometrical genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 396p.

MOREIRA, J.U.V.; VIEIRA, D.A; SOUZA, B.A.P; SOUZA JÚNIOR, C.L. QTL mapping for reaction to Phaeosphaeria leaf spot in a tropical maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.119, p. 1361-1369, 2009.

NIHEI, T.H.; FERREIRA, J.M. Análise dialélica de linhagens de milho com ênfase na resistência a doenças foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.369-377, 2012.

PEGORARO, D.G.; BARBOSA NETO, J.F.; DAL SOGLIO, F.K.; VACARO, E.; NUSS, C.N.; CONCEIÇÃO, L.D.H. Herança da resistência à mancha foliar de feosféria em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.329-336, 2002.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; ZIMMERMANN, M.J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas**: aplicações ao melhoramento genético do feijoeiro. Goiânia: UFG, 1993. 271p.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras: Ed. Universidade Federal de Lavras, 2008. 464 p.

RESENDE, M.D.V. **Genômica quantitativa e seleção no melhoramento de plantas perenes e animais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

SCHIPANSKI, C. A. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho**. 3. ed. Castro: Fundação ABC, 2011. 126 p.

SCHUELTER, A.R.; SOUZA, I.P.; TAVARES, F.F.; SANTOS, M.X.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, C.T. Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.2, p. 46-52, 2003.

SIBIYA, J.; TONGOONA, P.; DERERA, J.; VAN RIJ, N.; MAKANDA, I. Combining ability analysis for *Phaeosphaeria* leaf spot resistance and grain yield in tropical advanced maize inbred lines. **Field Crops Research**, v. 120, n. 1, p. 86-93, 2011.

SILVA, D.D.; COTA, L.V.; COSTA, R.V. Doenças. In: SILVA, D.D.; COTA, L.V.; COSTA, R.V. **Cultivo de milho**. 9. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. (Sistemas de produção, 1).

VIEIRA, R.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T.; SOUTO, E.R.; MESQUINI, R.M. Resistência de híbridos de milho-pipoca a *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.5, p.391-395, 2009.

VIEIRA, R.A. **Melhoramento genético da resistência à helmintosporiose comum, cercosporiose e ferrugem polissora em milho-pipoca**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

VIVEK, B.; ODONGO, O.; NJUGUNA, J.; IMANYWOHA, J.; BIGIRWA, G.; DIALLO, A.; PIXLEY, K. Diallel analysis of grain yield and resistance to seven diseases of African maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Euphytica**, v.172, p.329-340, 2010.

## CAPÍTULO 3 – CONTROLE GENÉTICO E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO PARA A RESISTÊNCIA À HELMINTOSPORIOSE DO MILHO

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi identificar regiões genômicas associadas com a resistência à helmintosporiose (HT) em linhagens de milho comum e estudar o controle genético envolvido na resistência. Para o mapeamento por associação, 72 linhagens foram previamente genotipadas para marcadores SNP na plataforma 650K (Affymetrix®), e os seus respectivos valores genotípicos foram preditos pelo REML/BLUP para à HT. Para evitar associações espúrias entre marcadores SNPs e o caráter estudado, realizou-se inicialmente a análise de estrutura da população. A análise de associação entre os marcadores SNPs e a HT foi realizada utilizando-se modelo linear misto (MLM). Para o estudo do controle genético, o experimento foi conduzido no ano de 2016 e foi composto por blocos casualizados com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelos genitores (1 e 2) e suas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub> e RC<sub>2</sub>. Por meio das notas atribuídas às linhagens e as suas respectivas gerações, foram extraídos os dados genotípicos relacionado à herança da doença estudada. As estimativas dos parâmetros genéticos e ambientais, foram baseadas na análise das variâncias das gerações segregantes e não segregantes. Analisando os resultados, foram encontrados QTLs nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 e 10 para à HT do milho, podendo aumentar, reduzir ou até mesmo anular o efeito desse atributo. Dentre os QTLs encontrados, cinco regiões genômicas foram detectadas para o aumento da resistência à helmintosporiose com o uso de marcadores SNP, encontradas nos cromossomos 3, 6, 8, 9 e 10. O controle genético da resistência à helmintosporiose é quantitativo, sendo os efeitos aditivos mais importantes na determinação do caráter. Além disso, apresenta alta herdabilidade restrita (88%), o que permite boa eficiência na seleção e nos ganhos de seleção.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*, resistência genética, desequilíbrio de ligação.

# GENETIC CONTROL FOR NORTHERN LEAF BLIGHT RESISTANCE AND MAPPING BY ASSOCIATION IN MAIZE LINES

## ABSTRACT

The aim of this work was to identify genomic regions associated with northern leaf blight (NLB) resistance in common maize lines and to study of control involved in the resistance. For association mapping, 72 maize lines were previously genotyped for SNP markers on the 650K platform (Affymetrix®), and their respective genotypic values were predicted by REML/BLUP for NLB. In order to avoid spurious associations between SNPs markers and the studied character, the analysis of population structure was initially performed. The analysis of association between the SNPs and NLB markers was carried out using a linear mixed model (LMM). For the study of genetic control, the experiment was conducted in 2016 and was composed of randomized blocks with three replicates, the treatments consisting of the parents (1 and 2) and their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub> and RC<sub>2</sub> generations. By means of the notes attributed to the lines and their respective generations, the genotypic data related to the inheritance of the studied disease were extracted. Estimates of genetic and environmental parameters were based on the analysis of the variances of the segregating and non-segregating generations. Analyzing the results, QTLs were found on chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 and 10 for NLB of maize, which may increase, reduce or even override the effect of this attribute. Among the QTLs found, five genomic regions were detected for increased resistance to NLB with the use of SNP markers, found in chromosomes 3, 6, 8, 9 and 10. The genetic control of resistance to NLB is quantitative, with the additive effects being more important in the character determination. In addition, it presents high restricted heritability (88%), which allows good selection efficiency and selection gains.

**Keywords:** *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*, genetic resistance, linkage disequilibrium.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho no Brasil começou a enfrentar sérios problemas de doenças a partir da década de 90, tanto pelo aumento de suas frequências, quanto pelos severos danos qualitativos e quantitativos à produção (NIHEI; FERREIRA, 2012). Este aumento das doenças está altamente relacionado às modificações ocorridas no sistema de produção desta cultura, tais como a expansão da fronteira agrícola, ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), adoção do plantio direto, aumento do uso de sistemas de irrigação, ausência de rotação de culturas e uso de materiais suscetíveis (SILVA et al., 2015).

Em particular ao milho comum, a helmintosporiose, causada pelo fungo anamórfico *Exserohilum turcicum*, caracteriza-se como uma das mais antigas e importantes doenças foliares, tendo ampla ocorrência no Brasil e nas principais regiões produtoras do mundo (HARLAPUR et al., 2008; WANG et al., 2010, 2012). As perdas causadas pela doença em condições ambientais favoráveis e em cultivares suscetíveis podem alcançar até 50% do potencial produtivo da lavoura (SCHIPANSKI, 2011).

O emprego de cultivares geneticamente resistentes frente às principais doenças do milho consiste no método mais eficiente e viável de controle (VIEIRA et al., 2009). Contudo, o desenvolvimento de cultivares é um trabalho intenso, uma vez que envolve inicialmente a identificação de fontes de resistência e estudo do controle genético do caráter (SOUZA et al., 2004). Deste modo, essas informações facilitam a condução de qualquer programa de melhoramento, devido ao fato de que os melhoristas têm à sua disposição a possibilidade de escolher a estratégia que mais se adequa, a fim de direcionar os trabalhos de introdução de genes de resistência em genótipos suscetíveis (FALCONER; MACKAY, 1996).

O controle genético para resistência às principais doenças foliares são descritas como qualitativas na maioria dos estudos, porém existem algumas que podem ser caracterizadas como quantitativas. Estes dois tipos de resistência podem ser encontrados atuando separadamente ou em conjunto (OGLIARI et al., 2007).

A resistência quantitativa, ou horizontal, é amplamente empregada no controle genético da helmintosporiose, se referindo à vários genes de pequenos efeitos aditivos atuando na expressão do caráter (VIVEK et al., 2010). Entretanto, para a resistência à *E. turcicum*, genes de efeitos não-aditivos, advindas de genes sob efeitos

de dominância e, ou epistasia, têm se mostrado importantes (NIEHI; FERREIRA, 2012). Neste contexto, a resistência quantitativa à helmintosporiose pode ser caracterizada também pela ação conjunta de genes aditivos e não-aditivos (OGLIARI, 2007; VIEIRA et al., 2009).

Em programas de melhoramento, uma ferramenta que se destaca pela rapidez e eficácia em estudos genéticos de germoplasmas, tem sido o uso das técnicas de marcadores moleculares, em virtude da detecção do polimorfismo em nível molecular sem levar em consideração a influência ambiental (FALEIRO, 2011). Com o advento das tecnologias de sequenciamento em altíssima escala, das plataformas de genotipagem simultânea de milhares de marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) a custos reduzidos e o aumento da capacidade de análises computacionais, tornou-se possível o desenvolvimento de novos métodos de mapeamento genético, entre eles a genética de associação (XU et al., 2009).

A genética de associação, também conhecido como mapeamento por associação, ou mapeamento por desequilíbrio de ligação, baseia-se em avaliar estatisticamente o desequilíbrio de ligação entre o marcador e o QTL, que são variações causadas por mutações e ampliadas por recombinações durante a evolução das espécies (RESENDE JÚNIOR et al., 2013). Desta forma, essa estratégia aplicada ao melhoramento de plantas desponta como uma importante metodologia para mapear genes de interesse, fornecendo informações mais relevantes e precisas para a seleção de genótipos (CASTRO; PEREIRA, 2008). Trabalhos utilizando essa metodologia estão sendo amplamente utilizados para estudos de resistências às doenças foliares de milho, como a helmintosporiose (POLAND et al., 2011; VAN INGHELANDT et al., 2012; DING et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi identificar regiões genômicas associadas com a resistência à helmintosporiose em linhagens de milho comum e estudar o controle genético envolvido na resistência.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Mapeamento por Associação

O experimento foi conduzido em campo nos anos de 2013 a 2015, sendo realizada a fenotipagem para à helmintosporiose em 72 linhagens COODETEC. Deste modo, a fenotipagem consistiu da predição dos valores genotípicos derivadas das notas de resistência atribuídas à helmintosporiose, segundo o estudo da caracterização de linhagens (Tópico 2.2.2). Os valores genotípicos foram obtidos considerando o modelo 21 do software SELEGEN-REML/BLUP (RESENDE, 2008).

Foi realizado também a genotipagem para à helmintosporiose em 72 linhagens de milho da COODETEC. A extração, purificação e quantificação do DNA genômico das linhagens, seguiu o mesmo protocolo utilizado para a análise de diversidade genética (Tópico 2.2.3). Realizou-se a genotipagem com marcadores SNP com a Plataforma 650K (Affymetrix®). Do total de 616.201 marcadores SNP, 418.287 marcadores apresentaram polimórficos e com alta resolução nas amostras utilizadas.

A análise de estrutura populacional foi realizada inicialmente, com o intuito de evitar associações falso-positivas entre marcadores e a característica estudada. Desta forma, utilizou-se o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para o modelo bayesiano generalizado, através do software InStruct (GAO et al., 2007). A utilização do algoritmo MCMC possui a vantagem de não necessitar que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para se obter uma boa convergência dos dados, foram estimadas as frequências alélicas para cada número de subpopulações simuladas ( $k$ ) e na sequência, estimou-se a probabilidade da linhagem  $i$  pertencer a uma população  $k$ . Deste modo, foram empregados burn-in de 5000 simulações com 50 mil repetições (Run Length Periods), testando-se oito possibilidades de sub-agrupamentos. O melhor valor de  $k$  é o que apresenta o maior valor de  $\ln \Pr(x|k)$  entre todos os valores de  $k$  simulados.

A análise de associação entre os marcadores SNPs e helmintosporiose (HT), foi realizada empregando o modelo linear misto (MLM), através do software estatístico TASSEL versão 5.2.12 (BRADBURY et al., 2007).

A significância das associações entre os marcadores SNP e o atributo fenotípico HT, foi determinada por meio da identificação dos maiores valores de  $-\text{Log}_{10}(P)$ . Os  $-\text{Log}_{10}(P)$  foram utilizados para a obtenção dos gráficos do tipo Manhattan Plot.

#### 4.2.2 Estudo do Controle Genético

O experimento foi conduzido na safrinha de 2016, utilizando duas linhagens derivadas do estudo da caracterização das linhagens, do programa de melhoramento de milho da COODETEC. Tais linhagens foram escolhidas por diferirem na resistência à helmintosporiose, ou seja, uma linhagem resistente (CDL 15 – genitor 1) e a outra altamente suscetível à doença em estudo (CDL 69 – genitor 2).

Empregando-se os procedimentos de polinização controlada, as sementes das linhagens genitoras, bem como as gerações  $F_1$ , foram obtidas na safrinha de 2015 e na safra seguinte, correspondendo à safra de 2015/16 a geração  $F_2$  e os retrocruzamentos,  $RC_{1.1}$  ( $F_1 \times P_1$ ) e  $RC_{1.2}$  ( $F_1 \times P_2$ ).

O delineamento experimental foi composto por blocos casualizados com três repetições, sendo os tratamentos representados pelas gerações. A semeadura foi realizada no dia 7 de março de 2016, correspondendo à safrinha 2016. A unidade experimental foi constituída por duas fileiras de 5m para as gerações genitoras ( $P_1$  e  $P_2$ ) e  $F_1$ , quatro fileiras de 5m para as gerações  $RC_{1.1}$  e  $RC_{1.2}$  e oito fileiras de 5m para a geração  $F_2$ , com 20 plantas/rua e espaçamento de 0,5m entre fileiras. Como bordadura, utilizou-se quatro fileiras de híbrido altamente suscetível às doenças foliares. Além disso, colocaram-se entre as linhas restos culturais de milho com lesões de doenças foliares, a fim de promover maior pressão de doença na área experimental.

Dentro do experimento em blocos casualizados, foi necessária a realização de marcação individual das plantas para cada geração, para que posteriormente fossem avaliadas. Em virtude da segregação ser diferente em cada geração, foram marcadas 12 plantas para cada geração genitora ( $P_1$  e  $P_2$ ) e  $F_1$ , 48 plantas para cada retrocruzamento ( $RC_{1.1}$  e  $RC_{1.2}$ ) e 150 plantas para o  $F_2$ , de acordo com as recomendações de Cruz et al. (2012). Os tratos culturais foram efetuados conforme

as recomendações da cultura, com exceção da aplicação de fungicidas (EMBRAPA, 2010).

A infecção da doença ocorreu naturalmente em campo e posteriormente, avaliadas quanto às lesões foliares na fase de enchimento de grãos (32 dias após o florescimento), com o auxílio da escala diagramática variando de 1 a 6 (Figura 5).

Por meio das notas de resistência à helmintosporiose atribuídas às linhagens e as suas respectivas gerações, foram extraídos os dados genotípicos relacionado à herança da doença estudada.

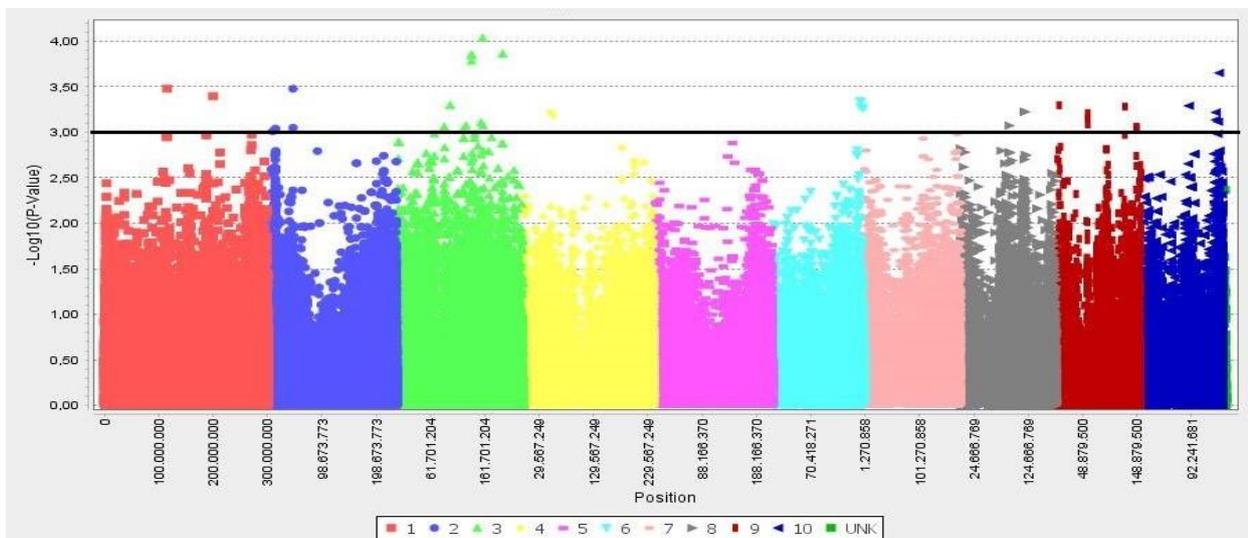
Os estudos genéticos sobre a herança da resistência à helmintosporiose, com base nas médias e variâncias das populações, foram realizados conforme descrito por Mather & Jinks (1982). As estimativas dos parâmetros genéticos e ambientais, baseada na análise das variâncias das gerações segregantes e não segregantes, foram realizadas segundo Cruz et al. (2012). As médias das gerações segregantes e não segregantes foram utilizadas para estimar os efeitos envolvidos na determinação da resistência genética à helmintosporiose, utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados (MATHER; JINKS, 1982; CRUZ et al., 2012). Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Mapeamento por Associação para a Resistência à Helmintosporiose

Pela análise de mapeamento por associação, baseada no modelo linear misto (MLM), foram identificadas 46 associações para à helmintosporiose (probabilidade de 0,05% ou  $[-\log_{10}(\text{P-valor})] \geq 3,0$ ), distribuídos nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 e 10 do milho ( $n = 10$ ). Assim, houve maior predominância das associações no cromossomo 3 (12 associações), seguidas do cromossomo 9 (9 associações), cromossomo 6 (8 associações), cromossomo 10 (5 associações), cromossomos 2 e 8 (4 associações) e cromossomos 1 e 4 (2 associações).

Com os valores estimados para cada marcador SNP associado à helmintosporiose, verifica-se uma elevado número de associações falso-positivas ( $[-\log_{10}(\text{P-valor})] \leq 3,0$ ) distribuídos ao longo do genoma do milho (Figura 5). Considerando um P-valor mínimo de 0,05%, detecta-se uma forte tendência de associações nos cromossomos 3, 6, 8 e 10 (Figura 5).



**Figura 5.** Manhattan plot resultante das associações para à helmintosporiose nos cromossomos de milho.

**Tabela 13.** Associação de marcadores SNP com à helmintosporiose do milho que apresentam os maiores coeficientes de determinação genotípicos em cada cromossomo.

MARC.	CROM.	POSIÇÃO	DISTÂNCIA (Kb)	F	PROB.	R <sup>2</sup> (%)	EFEITO A	EFEITO B
SNP38650	1	115216889	0	1,43	0,00034	20,8	-0,93	0,00
SNP59082	1	199871129	84.654,24	1,39	0,00004	20,2	-13,72	0,00
SNP101340	2	8498984	0	9,79	0,00097	22,5	-1,25	-0,57
SNP103857	2	13653173	5.154,19	9,13	0,00091	22,7	-1,28	-13,46
SNP115976	2	45770539	37.271,56	8,97	0,00089	22,8	-10,06	-0,83
SNP116035	2	45971994	37.473,01	3,34	0,00034	26,5	-0,23	0,71
SNP205575	3	137387675	0	10,25	0,00140	29,7	0,62	-0,67
SNP205576	3	137388596	0,92	10,25	0,00140	29,7	0,62	-0,67
SNP205577	3	137388601	0,93	10,25	0,00140	29,7	0,62	-0,67
SNP205579	3	137389050	1,38	10,05	0,00016	29,1	0,79	-0,46
SNP211587	3	157577589	20.189,91	9,21	0,00920	25,3	1,21	0,00
SNP256995	4	51493267	0	0,83	0,00600	24,2	-1,66	-10,80
SNP258064	4	55249726	3.756,46	8,27	0,00060	24,0	-1,36	-15,55
SNP424868	6	161416279	0	13,65	0,00046	19,8	16,64	0,00
SNP424874	6	161417753	1,47	13,65	0,00046	19,8	16,64	0,00
SNP424875	6	161419356	3,08	13,65	0,00046	19,8	16,64	0,00
SNP424876	6	161421285	5,01	13,65	0,00046	19,8	16,64	0,00
SNP427898	6	167397069	5.980,79	8,48	0,00055	24,6	-12,09	-1,15
SNP499972	8	90393344	0	12,28	0,00847	17,8	11,22	0,00
SNP507268	8	117972160	27.578,82	8,38	0,00059	24,3	-12,22	-1,91
SNP507269	8	117972299	27.578,96	8,38	0,00598	24,3	-19,11	-12,22
SNP507280	8	118004292	27.610,95	8,38	0,00059	24,3	-12,22	-1,91
SNP530575	9	5651064	0	13,44	0,00050	19,5	0,97	0,00
SNP544435	9	58059517	52.408,45	8,17	0,00070	23,7	-1,25	-10,68
SNP544589	9	58575058	52.923,99	7,98	0,00081	23,1	-15,45	-14,62
SNP544616	9	58727966	53.076,90	8,33	0,00620	24,1	-13,89	-14,20
SNP562142	9	126946209	121.295,15	8,55	0,00520	24,8	0,51	1,53
SNP595677	10	88023024	0	1,34	0,00054	19,4	-17,22	0,00
SNP610500	10	137502274	49.479,25	8,13	0,00070	23,5	-13,06	-0,17
SNP610584	10	137753585	49.730,56	13,03	0,00060	18,9	12,06	0,00
SNP612021	10	141591880	53.568,86	12,5	0,00076	18,1	0,74	0,00
SNP612903	10	143443806	55.420,78	15,33	0,00002	0,22,2	-0,96	0,00

MARC. = Marcadores SNP; CROM. = Cromossomo; Kb = Kilobase; F = valor tabelado de F; PROB. = probabilidade; R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; EFEITO A = Efeito do alelo A; EFEITO B = efeito do alelo B.

Analisando os marcadores SNP associados à HT que apresentaram os maiores coeficientes de determinação para cada cromossomo, observa-se uma variação de 0,178 a 0,297 (Tabela 13). Levando em consideração a distância entre os SNPs, constata-se marcadores muito próximos um do outro, podendo estarem atuando sobre

uma mesma região genômica responsável pelo caráter estudado. Tais são os casos ocorridos no cromossomo 3 (SNP205575, SNP205576, SNP205577 e SNP205579), no cromossomo 6 (SNP424868, SNP424874, SNP424875 e SNP424876) e no cromossomo 8 (SNP507268, SNP507269 e SNP507280).

Em espécies alógamas, a extensão do desequilíbrio de ligação (DL) é relativamente curta (0,4 a 2,0 Kb) e declina rapidamente, sendo necessário um número de marcadores substancialmente grande para detectar uma associação (MALOSETTI et al., 2007). O declínio do DL ocorre quando as amostras são derivadas principalmente de variedades tradicionais e de linhagens, pois a variação da extensão do desequilíbrio de ligação é altamente dependente não apenas da região genômica específica, mas também da população usada para quantificá-lo (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Selecionando os vinte SNPs com os maiores coeficientes de determinação para à HT (variação de 0,297 a 0,231), observa-se uma maior predominância no cromossomo 3 do milho, além das maiores magnitudes encontradas (0,297 e 0,291) (Tabela 14). Apesar da predominância dos marcadores no cromossomo 3, observa-se que os SNP205575, SNP205576, SNP205577 e SNP205579 estão atuando sobre uma mesma região genômica, visto que a distância genética é relativamente baixa entre eles (variação de 1,37 Kb). Desta forma, por estarem muito próximos um do outro, o efeito de um marcador pode estar contaminando o efeito do outro, apresentando informação redundante.

Em relação ao efeito dos alelos A e B dos marcadores SNP, nota-se que houve uma predominância das associações para redução da magnitude dos valores da doença, com exceção dos marcadores SNP211587 e SNP225204 (cromossomo 3), e do SNP562142 (cromossomo 9) (Tabela 14). A redução da magnitude dos valores de HT é desejável, pois promove uma redução de severidade causada pela doença, contribuindo deste modo, para o desenvolvimento de linhagens mais resistentes.

Analisando conjuntamente o gráfico de Manhattan (Figura 5) e a tabela com os vinte maiores coeficientes de determinação (Tabela 14), constata-se que foram encontradas cinco regiões genômicas que promoveram o aumento da resistência à helmintosporiose, sendo essas: um QTL (SNP210703) localizado no cromossomo 3, um QTL (SNP427898) no cromossomo 6, um QTL (SNP507268 e SNP507269) no cromossomo 8, um QTL (SNP544589 e SNP544616) no cromossomo 9 e um QTL (SNP610500) no cromossomo 10 do milho. Trabalhos com mapas de ligação

encontraram QTLs nestes cromossomos, tal como um QTL no cromossomo 3 (OGLIARI et al., 2007) e um QTL no cromossomo 8 (CHUNG et al., 2010a; 2010b; WANG et al., 2012).

Recentemente, trabalhos com mapeamento por associação vem sendo desenvolvidos, a fim de identificar associações entre marcadores moleculares e fenótipos de interesse com mapas mais saturados (MOREIRA et al., 2009). Trabalhos utilizando essa metodologia estão sendo amplamente utilizados para estudos de resistências às doenças foliares do milho, tais como para a HT (POLAND et al., 2011; VAN INGHELANDT et al., 2012; DING et al., 2015).

Corroborando com o trabalho, Ding et al. (2015) estudando o mapeamento por associação para novas fontes de resistência à helmintosporiose em milho, identificaram 12 genes associados à doença, nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 7, 9 e 10 do milho. Entre os genes identificados, cinco estão associados com duas ou três regiões de resistência, sendo um gene no cromossomo 4, dois genes no cromossomo 7 e dois genes no cromossomo 10.

Relacionando as cinco linhagens mais resistentes e suscetíveis à HT do milho com os vinte marcadores com maiores coeficientes de determinação, nota-se a existência de regiões genômicas que partilham alelos de resistência em comum, tais como o ocorre no cromossomo 3 (SNP210703), 8 (SNP507268 e SNP507269), 9 (SNP544616) e 10 (SNP610500) (Tabela 14). Com relação ao nível de resistência, observa-se que as linhagens resistentes apresentaram valores genômicos negativamente altos (acima de -122), quando comparados aos suscetíveis, que mostraram valores genômicos negativos (abaixo de -90), evidenciando a diferença de composição alélica de materiais tolerantes e sensíveis à mancha branca (Tabela 14).

**Tabela 14.** Análise de associação com os vinte maiores coeficientes de determinação genotípicos para as cinco linhagens mais resistentes e suscetíveis à helmintosporiose do milho (Cascavel/PR, 2016).

MARC.	CR.	POSIÇÃO	DIST. (Kb)	F	PROB.	R <sup>2</sup> (%)	EFEITO A	EFEITO B	LINHAGENS RESISTENTES					LINHAGENS SUSCETÍVEIS				
									2	15	28	30	41	16	33	52	63	69
SNP116035	2	45971994	0	3,34	0,00034	26,5	-0,23	0,71	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	BB
SNP195833	3	97896759	0	0,86	0,00050	24,9	-1,13	0,00	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA
SNP205575	3	137387675	39491	10,25	0,00140	29,7	0,62	-0,67	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA
SNP205576	3	137388596	39492	10,25	0,00140	29,7	0,62	-0,67	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA
SNP205577	3	137388601	39492	10,25	0,00140	29,7	0,62	-0,67	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA
SNP205579	3	137389050	39492	10,05	0,00016	29,1	0,79	-0,46	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA
SNP210703	3	154753924	56857	8,04	0,00078	23,3	-18,99	0,00	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	AA	BB
SNP211587	3	157577589	59681	9,21	0,00920	25,3	1,21	0,00	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA
SNP225204	3	194547063	96650	16,48	0,00013	23,9	0,84	0,00	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	AA	BB	AA
SNP256995	4	51493267	0	0,83	0,00600	24,2	-1,66	-10,80	AA	BB	BB	AA	BB	AA	AA	BB	BB	BB
SNP258064	4	55249726	3756	8,27	0,00060	24,0	-1,36	-15,55	BB	AA	BB	BB	BB	AA	AA	AA	BB	AA
SNP427898	6	167397069	0	8,48	0,00055	24,6	-12,09	-1,15	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP507268	8	117972160	0	8,38	0,00059	24,3	-12,22	-1,91	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB
SNP507269	8	117972299	0	8,38	0,00598	24,3	-19,11	-12,22	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB
SNP507280	8	118004292	32	8,38	0,00059	24,3	-12,22	-1,91	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AA	BB	BB
SNP544435	9	58059517	0	8,17	0,00070	23,7	-1,25	-10,68	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	BB	AA	BB
SNP544589	9	58575058	516	7,98	0,00081	23,1	-15,45	-14,62	BB	AA	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SNP544616	9	58727966	668	8,33	0,00620	24,1	-13,89	-14,20	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA
SNP562142	9	126946209	68887	8,55	0,00520	24,8	0,51	1,53	AA	BB	BB	AA	AA	BB	BB	BB	AA	AA
SNP610500	10	137502274	0	8,13	0,00070	23,5	-13,06	-0,17	AA	AA	AA	AA	AA	BB	BB	BB	BB	BB
VALOR GENÔMICO									-135	-122	-144	-126	-134	-70	-74	-90	-88	-64

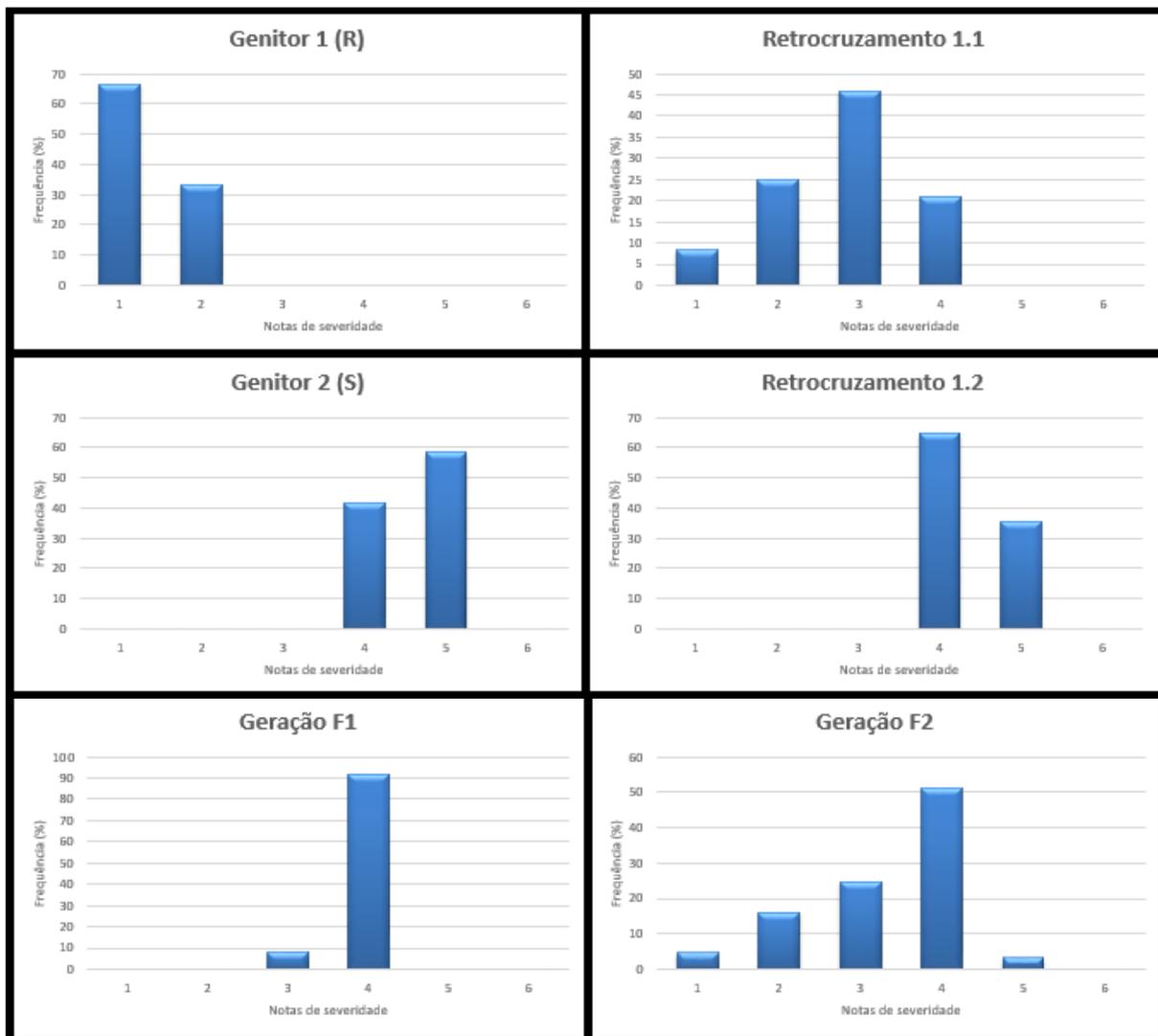
MARC. = Marcadores SNP; CROM. = Cromossomo; Kb = Kilobase; F = valor tabelado de F; PROB. = probabilidade; R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação; EFEITO A = Efeito do alelo A; EFEITO B = efeito do alelo B.

Com isso, o conhecimento das regiões associadas à doença em questão, aliadas a praticidade de aplicação da metodologia, sem haver necessidade de realização de cruzamentos, permite ao melhorista identificar com maior rapidez e precisão genótipos resistentes, a fim de utilizá-los como fontes de resistência para o desenvolvimento de novos híbridos comerciais. Além disso, é possível a realização de estudos de controle genético, a fim de se conhecer a magnitude da variabilidade e os efeitos gênicos envolvidos no caráter de interesse, através da escolha de materiais contrastantes, como é o caso das linhagens CD15 e CD69.

#### **4.3.2 Herança Genética de Resistência à Helmintosporiose**

O estudo foi conduzido sob condições ambientais favoráveis a fim de propiciar a infestação natural da Helmintosporiose do milho. Sendo assim, é oportuno ressaltar que, os índices máximos de incidência e severidade neste trabalho foram cerca de 0 a 75% em folhas do terço médio-superior da planta com lesões (notas variaram de 1 a 5), possibilitando uma discriminação representativa dos níveis de resistência. Esta amplitude de severidade foi igual ou superior aos estudos da helmintosporiose sob infestações naturais (VIERA et al., 2009; NIHEI; FERREIRA, 2012).

A distribuição das frequências de severidade da helmintosporiose se comportou de maneira não-normal para todas as gerações, típica de características em que poucos genes estão envolvidos (Figura 6). Nota-se que 74% das plantas demonstraram resistência moderada para helmintosporiose (notas 3 e 4) na geração F<sub>2</sub> e 100% na geração F<sub>1</sub>. Deste modo, a ausência de dominância averiguada nas duas gerações é um forte sinal de efeitos gênicos aditivos atuando na expressão do caráter em questão. Ainda, não se observa segregação transgressiva na geração F<sub>2</sub>, ou seja, valores dos fenótipos da geração segregante não excedem os limites estabelecidos pelos valores parentais correspondentes.



**Figura 6.** Distribuição das frequências de notas de severidade para a helmintosporiose, nas gerações genitoras ( $P_1$  e  $P_2$ ),  $F_1$ ,  $F_2$  e RC's (RC<sub>1.1</sub> e RC<sub>1.2</sub>) (Cascavel/PR, safrinha 2016).

Analisando-se as médias dos genitores (Tabela 15), pode-se observar que os parentais 1 e 2 foram altamente contrastantes, pois apresentaram valores das médias totalmente divergentes para doença em questão. As gerações  $F_1$  e  $F_2$  apresentaram médias de severidade medianas aos genitores e as médias dos retrocruzamentos tenderam a aproximar-se das médias das linhagens utilizadas como genitor recorrente (Tabela 15). Tanto as médias das gerações quanto a distribuição das frequências das notas de severidade são indícios de que efeitos aditivos estão envolvidos no controle genético da helmintosporiose.

Nota-se que nas variâncias das populações de HT (Tabela 15), as gerações dos genitores ( $P_1$  e  $P_2$ ), da  $F_1$  e o RC<sub>1.2</sub> apresentaram os menores valores. Esses

menores valores ocorrem devido às respectivas gerações (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e F<sub>1</sub>) possuírem o mesmo genótipo, sendo que qualquer variação que ocorre entre as plantas é de natureza ambiental. As demais gerações segregantes (RC<sub>1.1</sub> e F<sub>2</sub>), com exceção de RC<sub>1.2</sub>, apresentam os maiores valores de variância (Tabela 15). O baixo valor da variância encontrado para o retrocruzamento com o genitor 2 (RC<sub>1.2</sub>) pode também ser explicado, devido ao fato de que cada valor amostrado realizado no trabalho ser constituído de uma média de quatro plantas avaliadas fenotipicamente, contribuindo assim, para a diminuição dos valores das variâncias das gerações.

**Tabela 15.** Número de plantas avaliadas fenotipicamente, médias da severidade (sev), variâncias ( $\sigma^2$ ) e das variâncias médias da severidade V(sev) para resistência à helmintosporiose.

GERAÇÃO	Nº DE PLANTAS	MÉDIA(sev)	VARIÂNCIA( $\sigma^2$ )	V(sev)
P <sub>1</sub>	12	4,5833	0,2651	0,0220
P <sub>2</sub>	12	1,3333	0,2424	0,0202
F <sub>1</sub>	12	3,9166	0,0833	0,0069
F <sub>2</sub>	150	3,3266	0,8925	0,0059
RC <sub>1</sub>	48	4,3541	0,2335	0,0048
RC <sub>2</sub>	48	2,7916	0,7641	0,0159

Verifica-se que a constituição genética forneceu a maior contribuição para a expressão da helmintosporiose ( $\hat{\sigma}_g^2 = 0,8092$ ), visto que houve uma baixa influência ambiental ( $\hat{\sigma}_e^2 = 0,0833$ ) (Tabela 16). Além disso, a maior contribuição genotípica foi derivada do componente aditivo ( $\hat{\sigma}_a^2 = 0,7873$ ), enquanto que os desvios de dominância representaram relativamente menor importância ( $\hat{\sigma}_d^2 = 0,0218$ ).

Informações a respeito da magnitude da variância aditiva e dos desvios de dominância, desprezando a de natureza epistática, possibilita ao melhorista avaliar a potencialidade da população estudada, além de facilitar a escolha do método de seleção mais eficiente a ser empregado (CRUZ et al., 2012). Assim, a existência da variância aditiva constitui em um indicativo da facilidade de identificação de genótipos superiores, ao contrário da variância atribuída aos desvios de dominância, que é um

indicador das dificuldades no processo seletivo, tanto em termos de identificação de genótipos, quanto na quantidade de ganhos por seleção (CRUZ et al., 2012).

Um dos parâmetros genéticos mais utilizados pelos melhoristas é a estimativa da herdabilidade, em virtude de a mesma permitir prever a possibilidade de sucesso com a seleção (BORÉM; MIRANDA, 2013). Observa-se que as herdabilidades no sentido amplo e restrito para a resistência à helmintosporiose foram de 90,66% e 88,21%, respectivamente (Tabela 16). Assim, conclui-se que 90,66% da variação total na geração F<sub>2</sub> é advinda a causas genéticas e ainda, que 88,21% é atribuída a causa genética de natureza aditiva. Já o componente genético atribuído à dominância possui menor importância quando comparado ao componente aditivo, visto que representa apenas 2,69% da variância genotípica. Corroborando com os resultados, herdabilidade semelhantes foram encontradas para a resistência à helmintosporiose, variando de 50 a 85% (HAKIZA et al., 2004; ARNHOLD, 2008; SANTOS, 2016).

**Tabela 16.** Estimativa das variâncias fenotípica, genotípica, aditiva, decorrentes de dominância e de ambiente, da herdabilidade no sentido amplo e restrito, do grau médio de dominância e da estimativa do número de genes para a característica resistência à helmintosporiose (HT).

PARAMÊTROS GENÉTICOS DA POPULAÇÃO F <sub>2</sub>	
PARAMÊTRO	HT
Variância fenotípica ( $\hat{\sigma}f^2$ )	0,8925
Variância genotípica ( $\hat{\sigma}g^2$ )	0,8092
Variância aditiva ( $\hat{\sigma}a^2$ )	0,7873
Variância por dominância ( $\hat{\sigma}d^2$ )	0,0218
Variância de ambiente ( $\hat{\sigma}e^2$ )	0,0833
Herdabilidade no sentido amplo ( $\hat{h}a^2$ )	0,9066
Herdabilidade no sentido restrito ( $\hat{h}r^2$ )	0,8821
Grau médio da dominância (baseado em variâncias)	0,2357
Número de genes	2,54

O controle genético da resistência à helmintosporiose é quantitativo (Tabela 16), sendo que o grau médio de dominância evidencia a existência de dominância parcial (valor estimado 0,2357). A resistência quantitativa tem a vantagem de apresentar controle parcial contra praticamente todas as raças e por proporcionar maior dificuldade de superação por novas raças do patógeno (CARSON, 2006). Trabalhos anteriormente realizados evidenciam a grande importância da resistência quantitativa para estudos de controle da helmintosporiose (CARSON, 1995; VIVEK et al., 2010). No entanto, para a helmintosporiose, o controle genético pode ser feito por resistência quantitativa com ação gênica aditiva predominante e por resistência qualitativa, advinda de poucos genes de ação não-aditiva (FERGUSON; CARSON, 2007). Estes dois tipos de resistência podem ser encontrados atuando separadamente ou em conjunto (OGLIARI et al., 2007).

Os resultados indicam a existência de aproximadamente 2,5 genes atuando no controle genético da doença (Tabela 16). Resultado semelhante foi constatado por Hakiza et al. (2004), o qual encontrou de dois a três genes contribuindo parcialmente na resistência. No entanto, relatos já identificaram a existência de: três genes (FREYMARK et al., 1994); três a seis genes (HUGHES; HOOKER, 1971) e quatro a oito genes (DINGERDISSEN et al., 1996). Assim sendo, Cruz et al. (2012) aconselham interpretar com cautela a estimativa do número de genes, devido a mesma poder fornecer estimativas com valores diferentes.

Através do modelo genético completo, os parâmetros que contribuem significativamente para a determinação da resistência à helmintosporiose são a média geral ( $m$ ), os efeitos aditivos ( $a$ ), os efeitos devidos aos desvios de dominância ( $d$ ) e os efeitos gênicos epistáticos do tipo dominante-dominante ( $dd$ ), com exceção dos efeitos epistáticos do tipo aditivo-dominante ( $ad$ ) (Tabela 17). Informações do modelo completo dos efeitos gênicos para o controle da doença avaliada são bem restritos, ressaltando a importância e contribuição do estudo para os pesquisadores.

**Tabela 17.** Estimativas da média geral (m) e de efeitos gênicos aditivos (a), devidos aos desvios de dominância (d), epistáticos do tipo aditivo-dominante (ad) e epistáticos do tipo dominante-dominante (dd), obtidos pela análise das médias de seis gerações (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub>, RC<sub>2</sub>) avaliadas quanto a resistência à helmintosporiose.

PARAMÊTRO	ESTIMATIVA	VARIÂNCIA	T	PROB. %
m	1,9733	0,1889	4,5399	0,0020 **
a	1,6250	0,0105	15,8024	0,0 **
d	3,4700	1,2312	3,1271	0,2123 **
aa	0,9850	0,1783	2,3323	1,9414 *
ad	-0,1250	0,1254	-0,3529	72,4987 <sup>ns</sup>
dd	-1,5266	0,4978	-2,1636	2,9625 *

\*\*Significativo a 1% de probabilidade; <sup>ns</sup> não significativo.

**Tabela 18.** Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d, aa, ad, dd), pelo método de eliminação de Gauss da característica resistência à helmintosporiose.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	R <sup>2</sup> (%)
m/ a, d, aa, ad, dd	1	20,6109	7,09
a/ m, d, aa, ad, dd	1	249,7164	86,00
d/ m, a, aa, ad, dd	1	9,7791	3,36
aa/ m, a, d, ad, dd	1	5,4398	1,87
ad/ m, a, d, aa, dd	1	0,1245	0,04
dd/ m, a, d, aa, ad	1	4,6812	1,61
TOTAL	6	290,3521	

A prevalência da aditividade é comprovada quando se analisa a decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros. Constata-se que os efeitos aditivos mostraram maior importância na determinação do caráter, por explicar 86% da variabilidade do caráter estudado (Tabela 18). Tal fato representa a possibilidade de obtenção de genótipos resistentes, mais duradoura e estável, por meio de estratégias simples de melhoramento, como a seleção recorrente e o retrocruzamento (VIEIRA, 2010).

Por meio da análise do modelo aditivo-dominante, observa-se alta significância ( $p < 0,01$ ) pelo teste t para os parâmetros da média, dos efeitos aditivos e de dominância. Além disso, nota-se médias observadas em magnitudes de 0,99, o que equivale uma determinação de ( $R^2$ ) 99,34% para a helmintosporiose (Tabela 19). Pelos resultados conclui-se que o uso do modelo é satisfatório para explicar o comportamento da média das gerações.

**Tabela 19.** Teste de significância da nulidade de modelos menos parametrizados dos parâmetros genéticos média geral (m), efeitos gênicos (a) e de dominância (d) obtidos das médias de seis gerações ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $RC_1$ ,  $RC_2$ ) para a característica resistência à helmintosporiose.

PARAMÊTRO	ESTIMATIVAS	VARIÂNCIA	t	PROB. %
m	2,9796	0,0064	37,1177	0,0 **
a	1,6517	0,0064	20,5746	0,0 **
d	0,9502	0,0170	7,2861	0,0 **
$R^2$	99,34			

\*\*Significativo a 1% de probabilidade.

**Tabela 20.** Decomposição não-ortogonal da soma de quadrados de parâmetros (m, a, d), pelo método de eliminação de Gauss da característica resistência à helmintosporiose.

PARAMÊTRO	GL	SQ	$R^2$ (%)
m/ a, d	1	1377,7305	74,30
a/ m, d	1	423,3156	20,83
d/ m, a	1	53,0880	2,86
TOTAL	3	1854,1342	

De acordo com a análise de decomposição não-ortogonal da soma dos quadrados dos parâmetros (Tabela 20), os resultados mostram que a média e o efeito gênico aditivo apresentaram as estimativas de maior magnitude. Com isso, tanto as análises das médias quanto das variâncias evidenciam que a variabilidade aditiva presente na geração  $F_2$  é relativamente superior à atribuída aos desvios da dominância.

A predominância da ação gênica aditiva já foi verificada nos estudos de herança da resistência à helmintosporiose (CARSON, 1995; VIVEK et al., 2010). Divergindo dos resultados encontrados, alguns desses estudos apresentaram predominância dos efeitos não-aditivos (CARSON, 2006; NIEHI; FERREIRA, 2012; SANTOS, 2016). Estes dois tipos de resistência podem ser comumente encontrados atuando em conjunto, sob ação tanto dos efeitos aditivos (referentes à resistência quantitativa) quanto dos não-aditivos (referentes à resistência qualitativa, advinda de genes sob efeitos de dominância e epistasia) (VIEIRA et al., 2009). A ação dos efeitos aditivos e não-aditivos também têm se mostrado importante para conferir resistência a helmintosporiose (OGLIARI et al., 2007; VIEIRA et al., 2009).

A variabilidade genética da resistência à helmintosporiose é conferida em maior magnitude pelos efeitos aditivos, o que representa não apenas a facilidade de seleção de genótipos superiores, mas também ganhos de seleção satisfatórios (CRUZ et al., 2012). Uma das contribuições da genética quantitativa ao melhoramento de plantas é a possibilidade de os melhoristas predizerem as estimativas dos ganhos de seleção (RAMALHO et al., 2012). Considerando que a seleção fosse realizada na geração  $F_2$  e com uma intensidade de seleção de 20% ( $i = 1,39$ ), foi estimado um ganho de 4,39% para o primeiro ciclo após a seleção. Isso corresponde a, aproximadamente, 35% de ganho por ciclo. Tal ganho foi superior aos obtidos no trabalho de Bleicher et al. (1993) e Arnhold (2008), com ganho predito de 20% e 6,27% para a helmintosporiose, respectivamente.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Com exceção dos cromossomos 5 e 7, foram detectadas associações significativas à helmintosporiose nas demais regiões cromossômicas, podendo aumentar, reduzir ou até mesmo anular o efeito desse atributo. Entre os QTLs encontrados, cinco regiões genômicas foram detectadas para o aumento da resistência à helmintosporiose com o uso de marcadores SNP, encontradas nos cromossomos 3, 6, 8, 9 e 10.

O controle genético da resistência à helmintosporiose é quantitativo, sendo os efeitos aditivos mais importantes na determinação do caráter. Além disso, apresenta alta herdabilidade restrita (88%), o que permite boa eficiência na seleção e nos ganhos de seleção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNHOLD, E. Seleção para resistência a doenças foliares em famílias S1 de milho pipoca. **Revista Ceres**, v. 55, p. 89-93, 2008.

BLEICHER J.; BALMER, E.; ZINSLY, J.R. Resistência Horizontal a *Exserohilum turcicum* em milho, cultivar "Pirapoca Amarela". **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 187-193, 1993.

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2013. 523p.

BRADBURY, P.J.; ZHANG, Z.; KROON, D.E.; CASSTEVENS, T.M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E.S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Oxford Journals Science & Mathematics Bioinformatics**, Okfords, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.

CARSON, M. L. Response of a maize synthetic to selection for components of partial resistance to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 910-914, 2006.

CARSON, M.L. A new gene in maize conferring the chlorotic halo reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v. 79, p. 717-720, 1995.

CASTRO, C.M.; PEREIRA, A.S. **Mapeamento por associação em plantas: conceitos básicos e perspectivas de uso no melhoramento de batata**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 30p. (Documentos, 248).

CHUNG, C.L.; JAMANN, T.; LONGFELLOW, J.; NELSON, R. Characterization and fine-mapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06. **Theor. Appl. Genet.** v. 121, p. 205–227, 2010a.

CHUNG, C.L.; LONGFELLOW, J.M.; WALSH, E.K.; KERDIEH, Z.; VAN ESBROECK, G. Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize-*Setosphaeria turcica* pathosystem. **BMC Plant Biol.** v. 10, p. 103-127, 2010b.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, 2012. v. 2. 514p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes** - Biometria. 1st ed. Viçosa: UFV, 2006.

DING, J.; ALI, F.; CHEN, G.; LI, H.; MAHUKU, G.; YANG, L.N.; MAGAROKOSHO, C.; MAKUMBI, D.; YAN, J. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. **BMC Plant Biology**, v. 15, p.206, 2015.

DINGERDISSEN, A.; GEIGER, H.; LEE, M.; SCHECHERT, A. Interval mapping of genes for quantitative resistance of maize to *Setosphaeria turcica*, cause of northern leaf blight, in a tropical environment. **Mol. Breed**, v. 2, p. 143-156, 1996.

EMBRAPA. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. (Manual técnico).

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464p.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. (Eds). **Biotechnologia estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2011. Cap 3, p. 55-120.

FERGUSON, L.M.; CARSON, M.L. Temporal variation in *Setosphaeria turcica* between 1974 and 1994 and origin of races 1, 23, and 23N in the United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p. 1501-1511, 2007.

FREYMARK, P.J.; LEE, M.; MARTINSON, C.A.; WOODMAN, W.L. Molecular-marker-facilitated investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.): components of resistance. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p.305-313, 1994.

GAO, H.; MCDONNELL, A.; HARRISON, D.A.; MOORE, T.; ADAM, S.; DALY, K.; ESMONDE, L.; GOLDHILL, D.R.; PARRY, G.J.; RASHIDIAN, A.; SUBBE, C.P.; HARVEY, S. Systematic review and evaluation of physiological track and trigger warning systems for identifying at-risk patients on the ward. **Intensive Care Medicine**, Brussels, v. 33, n. 4, p. 667-6679, 2007.

HAKIZA, J.J.; LIPPS, P.E.; MARTIN, S. ST.; PRATT, R.C. Heritability and number of genes controlling partial resistance to *Exserohilum turcicum* in maize inbred H99. **Maydica**, v. 49, p. 173-182, 2004.

HARLAPUR, S.I.; KULKARNI, M.S.; WALI, M.C.; SRIKANT, K.; YASHODA, H.; PATIL, B.C. Status of turcicum leaf blight of maize in Karnataka. Karnataka **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 21, p. 55-60, 2008.

HUGHES, G.R. AND HOOKER, A.L. Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. **Crop Science**, v. 11, p. 180-184, 1971.

JAMANN, T.M.; POLAND, J.A.; KOLKMAN, J.M.; SMITH, L.G.; NELSON, R.J. Unraveling genomic complexity at a quantitative disease resistance locus in maize. **Genetics**. v. 198, p.333–344, 2014.

JULIATTI, F.C.; PEDROSA, M.G.; JULIATTI, B.C.M; BELOTI, I.F.; FIGUEIRÓ, A.A. Identificação de QTLs associados à resistência parcial à mancha branca do milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1163 -1178, 2013.

LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; BRUNELLI, K.R.; PEREIRA DA SILVA, H.; MATIELLO, R.R.; CAMARGO, L.E.A. Controle genético da resistência à mancha-de-Phaeosphaeria em milho. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.605-611, 2007.

MALOSETTI, M.; van der LINDEN, C.G.; VOSMAN, B.; van EEUWIJK, F.A. A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. **Genetics**, Pittsburgh, v. 175, p. 879-889, 2007.

MATHER, S.K.; JINKS, J.L. **Biometrical genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. 396p.

MOREIRA, J.U.V. BENTO, D. A. V.; SOUZA, C. L. J. QTL mapping for reaction to Phaeosphaeria leaf spot in a tropical maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.119, p. 1361-1369, 2009.

NIHEI, T.H.; FERREIRA, J.M. Análise dialélica de linhagens de milho com ênfase na resistência a doenças foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.369-377, 2012.

OGLIARI, J.B.; GUIMARÃES, M.A.; GIRALDI, I.O.; CAMARGO, L.E.A. New resistance genes in the *Zea mays*: *Exserohilum turcicum* pathosystem. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 435-439, 2007.

POLAND, J.A.; BRADBURY, P.J.; BUCKLER, E.S.; NELSON, R.J. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. **Proceeding of the National Academy of Sciences United State of America**, v. 108, n. 17, p. 6893–6898, 2011.

RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B.; SANTOS, J.B.; NUNES, J.A.R. **Genética quantitativa em plantas autógamas**. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 522p.

RESENDE, M.D.V. **Genômica quantitativa e seleção no melhoramento de plantas perenes e animais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

RESENDE JÚNIOR, M.F.R.; ALVES, A.A.; SÁNCHEZ, C.F.B.; RESENDE, M.D.V.; CRUZ, C.D. Seleção genômica ampla. In: CRUZ, C.D.; SALGADO, C.C.; BHERING, L.L. (Eds.). **Genômica aplicada**. Viçosa, UFV, 2013, cap. 10, p. 375-424.

SANTOS, J.S. **Análise dialélica completa e recíproca na estimação da capacidade combinatória da incidência e severidade de *bipolaris maydis* e *exserohilum turcicum* em milho-pipoca em diferentes épocas de cultivo**. 2016. 83f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2016.

SCHIPANSKI, C. A. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho**. 3. ed. Castro: Fundação ABC, 2011. 126 p.

SILVA, D.D.; COTA, L.V.; COSTA, R.V. Doenças. In: SILVA, D.D.; COTA, L.V.; COSTA, R.V. **Cultivo de milho**. 9. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. (Sistemas de produção, 1).

SOUZA, I.R.P.; SCHUELTER, A.R.; GUIMARÃES, C.T. Genética da resistência a doenças, com ênfase na virose mosaico-comum do Milho. In: Oliveira, E. e Oliveira, C.M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por Phaeosphaeria**. Brasília, DF, p. 227-252, 2004.

VAN INGHELANDT, D.; MELCHINGER, A.E.; MARTIANANT, J.P.; STICH, B. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm set. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 56-71, 2012.

VIEIRA, R.A. **Melhoramento genético da resistência à helmintosporiose comum, cercosporiose e ferrugem polissora em milho-pipoca**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

VIEIRA, R.A.; TESSMANN, D.J.; HATA, F.T.; SOUTO, E.R.; MESQUINI, R.M. Resistência de híbridos de milho-pipoca a *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.5, p.391-395, 2009.

VIVEK, B.; ODONGO, O.; NJUGUNA, J.; IMANYWOHA, J.; BIGIRWA, G.; DIALLO, A.; PIXLEY, K. Diallel analysis of grain yield and resistance to seven diseases of African maize (*Zea Mays* L.) inbred lines. **Euphytica**, v.172, p.329-340, 2010.

XU, Y.; SKINNER, D. J.; WU, H.; PALACIOS-ROJAS, N.; ARAUS, J. L.; YAN, J.; GAO, S.; WARBURTON, M. L.; CROUCH, J. H. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. **International Journal of Plant Genomics**, Philadelphia, v. 2009, p. 1-30, 2009.

WANG, H.; XIAO, Z.X.; WANG, F.G.; XIAO, Y.N.; ZHAO, J.R.; ZHENG, Y.L.; QIU, F.Z. Mapping of HtNB, a gene conferring nonlesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 2523-2533, 2012.

WANG, P.; SOUMA, K.; KOBAYASHI, Y.; IWABUCHI, K.; SATO, C.; MASUKO, T. Influences of Northern Leaf Blight on corn silage fermentation quality, nutritive value and feed intake by sheep. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 81, p. 487-493, 2010.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Existe variabilidade genética entre as linhagens de milho e deste modo, com os dados das distâncias por meio dos marcadores moleculares é possível orientar com maior precisão os cruzamentos, visando obter genótipos mais resistentes às principais doenças foliares.

O emprego do mapeamento por associação pode ser uma estratégia eficiente na seleção de genótipos resistentes à mancha branca e à helmintosporiose, sem a necessidade de cruzamentos.

Com os estudos de controle genético, heranças do tipo quantitativa aliadas com as altas herdabilidades restritas, permitem boa eficiência na seleção e ganhos de seleção satisfatórios.