



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Identificação de QTLs em milho associados à qualidade de sementes no
pós-processamento**

Aluno: Cristhiane Abegg Bothona

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

UBERLÂNDIA - MG

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Identificação de QTLs em milho associados à qualidade de sementes no
pós-processamento**

Aluno: Cristhiane Abegg Bothona

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA - MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B749i Bothona, Cristhiane Abegg, 1972-
Identificação de QTLs em milho associados à qualidade de sementes no pós-processamento / Cristhiane Abegg Bothona. - 2007.
39 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Milho - Semente - Teses. 2. Milho - Teses. 3. Sementes - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 633.15:631.53.02

Palavras-chave: microssatélites, marcadores moleculares, produção sementes, mapa molecular



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Identificação de QTLs em milho associados à qualidade de sementes no
pós-processamento**

Aluno: Cristhiane Abegg Bothona

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores:

Prof. Dra. Cláudia Guimarães

Dr. Lisandro Rambo

Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

Prof. Dr. Luiz Carlos Federizzi

Data da Defesa: 20 /12 /2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart, por ter aceitado orientar-me e pela compreensão, apoio e incentivo durante todo o curso.

À Syngenta Seeds, por disponibilizar as informações do projeto para esta tese.

Ao Dr. Glóverson Moro, pelo seu apoio e incentivo ao início deste curso de Doutorado.

Ao Dr. Juan Kiekebusch, pelo incentivo enquanto sob sua gestão.

Ao Dr. Eduardo Brun e Dr. Juan Kenny, por terem concedido seu projeto de pesquisa para esta tese de Doutorado e pela atenção durante todo o processo, informações sempre prontamente concedidas.

À amiga M.Sc. Kátia Bernardeli, pela concessão dos dados genotípicos e pelo ombro amigo em todos os anos de convivência.

À Dra. Lynn Senior, Syngenta SBI, pela revisão prévia dos resultados desta tese.

Aos colegas Juliana Aoki e César Santos, pelo apoio na geração dos dados genotípicos e a toda equipe do laboratório de Genética Molecular pelo companheirismo e apoio.

Ao colega Dr. Jair Duarte pelo apoio e amizade.

Ao colega Dr. João Renato Vaz, e a todos aqueles que me incentivavam de alguma forma, perguntando ao passar no corredor: “-Como vai a sua tese?”

A todos os demais colegas da Syngenta Seeds Brasil e Argentina, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste estudo.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Gerson Fraissat, pela paciência e atenção ao longo de todo o curso.

Aos amigos Ana Maria e Leopoldo, Karen e Maurício, Tia Maria e Tio Luís, Rambo e Eliane, Ricardo e Adriana, pela companhia nos merecidos momentos de descontração.

Aos meus pais Breno e Erô e minha mana Pati, que mesmo na distância física nunca deixaram de me apoiar.

E finalmente, àqueles sem os quais eu jamais teria tantas conquistas, Nato e Mi, meu amor e gratidão eterna não cabem em palavras.

Sumário

Sumário	1
Lista de Tabelas	2
Lista de Figuras	3
Apresentação	4
Capítulo I – Fundamentação Teórica sobre Aspectos Genéticos da qualidade da Semente de Milho	6
Capítulo II - Identificação de QTLs em milho associados à qualidade de sementes no pós-processamento	16
Resumo	16
Abstract	17
Introdução	18
Material e Métodos	20
Descrição da população utilizada.....	20
Avaliação fenotípica das progênes para resistência ao dano de processamento	20
Análises estatísticas dos dados fenotípicos	23
Genotipagem por marcadores microssatélites (SSR)	23
Obtenção do DNA genômico.....	24
Análises de SSR	24
Construção do mapa genético e identificação dos QTLs	25
Resultados e Discussão	26
Resultados fenotípicos	26
Mapeamento de QTLs.....	31
Conclusão	45
Referências	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Vigor de sementes das linhagens progenitores NB9304 e NP4006 com e sem submissão ao dano de processamento e valores de VR.....	26
Tabela 2. Teste de X^2 para as hipóteses de tipo de herança para o fenótipo valor de redução de vigor (VR) na população estudada.	29
Tabela 3. Análise de variância para valores de VR para a população estudada. .	31
Tabela 5. Genes mapeados nos bins 9.02 e 9.03 do genoma do milho. (http://www.maizegdb.org consulta realizada em 28/09/2007).....	40

Lista de Figuras

Figura 1. Equipamento simulador de dano de processamento utilizado para o tratamento das sementes de milho utilizadas neste estudo.	22
Figura 2. Esquema de equipamento simulador de dano de processamento utilizado para o tratamento das sementes de milho utilizadas neste estudo.	22
Figura 3. Distribuição das frequências do valor de percentagem de Valor de Redução (VR) entre as 231 famílias da população estudada..	27
Figura 4. Mapa genético representando os 12 grupos de ligação obtidos com 52 marcadores SSR para população $F_{2:3}$ utilizada neste estudo.	34
Figura 5. Mapeamento por intervalo composto, indicando a presença de um QTL associado à resistência ao dano durante o processamento no cromossomo 9 (grupo de ligação 11, indicado como “Ch-11”).	35
Figura 6. QTL identificado no cromossomo 9 (grupo de ligação 11, indicado com Chromosome-11) em detalhe, numa região de 15.4cM entre os marcadores N1072 e N1227.	36
Figura 7. Concordância entre o genótipo para o marcador N1072 e o fenótipo observado.	38

Apresentação

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivado em diversas regiões do mundo. Os Estados Unidos respondem por quase 50% da produção mundial. Outros grandes produtores são a China, a Índia, o Brasil, a França, a Indonésia e a África do Sul. A produção mundial foi de 693 milhões de toneladas em 2006. Apesar de ser considerado um constituinte básico na alimentação humana, o uso primário do milho nos países produtores é na alimentação para animais. O Brasil tem situação parecida: 65% do milho é utilizado na alimentação animal e 11% é consumido pela indústria, para diversos fins.

Em termos de produção nacional o Brasil apresentou uma safra recorde em 2002/03, de 45,8 milhões de toneladas, tornando-se o terceiro maior produtor de milho do mundo. Embora com decréscimo da produção em 2005, para 35 milhões de toneladas, o país mantém sua posição como um dos principais produtores, respondendo por 5% da produção agrícola mundial deste cereal.

A sustentabilidade dos altos níveis de produtividade em lavouras de milho depende, entre outros fatores, da disponibilidade de sementes de alta qualidade. A qualidade de sementes é um termo bastante amplo, pois envolve diferentes propriedades as quais podem ser categorizadas em três grandes grupos: a qualidade sanitária; a qualidade física e a qualidade fisiológica, sendo estes aspectos que garantem uma germinação e emergência do solo rápida até seu estabelecimento, com vigor de planta capaz de alcançar a fase reprodutiva. O desempenho das sementes está relacionado ao histórico de sua produção e processamento, bem como as condições ambientais e época de cultivo.

Grande parte do dano causado às sementes durante o processamento está relacionada ao processo de colheita e secagem. A debulha de sementes úmidas resulta em rachaduras e sementes quebradas, assim como na fase de secagem forçada com aplicação de ar quente, práticas estas comumente adotadas no beneficiamento de sementes de milho. Cada etapa do processamento envolve algum movimento das sementes em sentido horizontal, elevação e/ou declive. A resistência ao dano de processamento é um fator crítico na qualidade da semente de milho, pois danificações causadas pelo processamento aceleram a perda de qualidade durante o armazenamento. A suscetibilidade ao dano depende de

fatores genéticos e ambientais. Dessa forma, é possível incrementar a resistência ao dano de processamento na fase de melhoramento e desenvolvimento das linhagens de milho, assegurando assim o potencial de qualidade das sementes dos futuros híbridos.

Com a disponibilidade de ferramentas moleculares, é possível identificar regiões genômicas em milho associadas aos aspectos de qualidade de sementes e assim efetuar a seleção de linhagens superiores de forma rápida, e não-destrutiva. Estas regiões genômicas associadas a características quantitativas, ou QTLs (Quantitative Trait *Loc*i), uma vez definidas, podem ser usadas como referência na seleção em nível molecular de linhagens que apresentem melhores perfis de qualidade de sementes. Além disso, estas informações podem servir como ponto inicial na elucidação de genes envolvidos nos diferentes aspectos da qualidade de sementes.

Esta tese apresenta dois capítulos, sendo o primeiro referente a fundamentação teórica de aspectos genéticos da qualidade da semente de milho e outro sobre o estudo de identificação de QTLs associados a qualidade de sementes de milho.

Capítulo I – Fundamentação Teórica sobre Aspectos Genéticos da qualidade da Semente de Milho

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivado em diversas regiões do mundo. Em termos de produção nacional, o Brasil mantém sua posição como um dos principais produtores, respondendo por 5% da produção agrícola mundial deste cereal (CONAB, 2008).

Parte do sucesso na produtividade nacional de milho deve-se a utilização de sementes de boa qualidade na instalação das lavouras, o que reflete diretamente na uniformidade da população, na baixa incidência de doenças transmitidas pela semente, no elevado vigor de plantas e em altos rendimentos. Nesse sentido, a qualidade da semente é fator a ser considerado em programas de produção agrícola, considerando que o controle de qualidade é fundamental para o produtor de sementes. Grande parte do dano causado às sementes durante o processamento está relacionada ao processo de colheita e secagem. A debulha de sementes úmidas resulta em rachaduras e sementes quebradas, assim como na fase de secagem forçada com aplicação de ar quente, práticas estas comumente adotadas no beneficiamento de sementes de milho. Cada etapa do processamento envolve algum movimento das sementes em sentido horizontal, elevação e/ou declive. A resistência ao dano de processamento é um fator crítico na qualidade da semente de milho, pois danificações causadas pelo processamento aceleram a perda de qualidade durante o armazenamento. Essa qualidade deve ser garantida e mantida durante os processos de produção, no campo e na usina de beneficiamento de sementes. Contudo, ela é grandemente influenciada por fatores genéticos e, dessa forma, é possível incrementar a resistência ao dano de processamento na fase de melhoramento e desenvolvimento das linhagens de milho, assegurando assim o potencial de qualidade das sementes dos futuros híbridos.

Os programas de melhoramento de plantas são, normalmente, direcionados para a obtenção de cultivares de elevado padrão, no que se relaciona ao rendimento, à resistência às doenças e pragas e à adaptabilidade ambiental. Contudo, ainda são bastante incipientes em relação a alguns

parâmetros especiais, tais como a qualidade de semente (Krzyzanowski, 1998). Existe a necessidade de avaliar a qualidade das sementes nos programas de melhoramento de plantas, assegurando a produção de sementes de alta qualidade. Pesquisas na área de sementes podem auxiliar no desenvolvimento de métodos para a seleção de genótipos com alta qualidade de sementes com base em testes fisiológicos, sanitários e físicos. Desse modo, é indiscutível a importância da avaliação da qualidade das sementes nos programas de melhoramento de milho, para fins de comercialização e controle da qualidade no processo produtivo.

O vigor das sementes está relacionado à deterioração; na semente, como em qualquer organismo vivo, o “envelhecimento”, é o resultado da soma dos processos deteriorativos que, finalmente, levam à morte. A maturidade fisiológica da semente pode ser considerada como o ponto de máximo peso de matéria seca, germinação e vigor. Nesse momento, a deterioração é mínima e, a partir daí, começa o processo de senescência progressivo, inexorável e dependente da espécie vegetal e das condições de ambiente onde a semente se encontra (Nakagawa, 1999; Popinigis, 1977). O envelhecimento da semente é um processo integrado de eventos degenerativos contrapostos à capacidade de detoxificação e reparo das sementes (Coolbear, 1995). Além disso, características como umidade, localização na espiga, forma, tamanho e espessura do pericarpo assim como estrutura e posição do embrião tem implicação na suscetibilidade ao dano durante o processamento (Moore, 1972). Sementes de milho grandes e achatadas tendem a ter um processo degenerativo mais lento do que sementes redondas e pequenas, durante o armazenamento. Estudos sobre o efeito do dano de processamento e armazenamento sobre sementes de milho de diferentes posições na espiga indicaram que as provenientes do meio da espiga foram menos danificadas do que aquelas provenientes do ápice e da base da espiga por serem mais uniformes, e conseqüentemente, se sobressaíram melhor durante o armazenamento em relação às outras categorias (Peterson *et al.*, 1995).

O máximo vigor atingido pode depender de vários fatores: genéticos, de formação (polinização, microsporogênese e macrosporogênese), de maturação, os relacionados aos danos mecânicos, microorganismos e insetos, os decorrentes

das condições ambientais durante o armazenamento e os relativos à densidade, ao tamanho e à idade das sementes (Carvalho e Nakagawa, 2000).

A seqüência hipotética do processo deteriorativo envolve a degradação das membranas celulares, a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, a desaceleração na germinação, a redução do potencial de conservação, a menor taxa de crescimento e desenvolvimento, a menor uniformidade, a maior sensibilidade às adversidades do ambiente, a redução da emergência em campo, o aumento da ocorrência de plântulas anormais e, finalmente, a perda do poder germinativo (Delouche e Baskin, 1973). Assim, o uso de testes de vigor torna-se útil no monitoramento da qualidade das sementes durante a produção, processamento e armazenamento, pois a perda de vigor precede a perda de viabilidade (Hampton, 2002; McDonald, 1999).

Uma explicação para o maior vigor, em plântulas híbridas de milho, é a maior eficiência do sistema enzimático envolvido no processo de germinação. Por meio de estudos bioquímicos, foi observado que o controle da síntese de α -amilase e subsequente hidrólise das reservas de sementes, apresenta uma ligação entre as giberelinas e a heterose em milho (Paleg, 1965). Segundo Rood et al. (1988 e 1990), linhagens de milho são menos vigorosas que seus híbridos descendentes, em parte por causa da deficiência de giberelinas.

O endosperma do milho constitui a principal fonte de nutrientes para a germinação do embrião. A maioria do carbono e nitrogênio utilizados nos estágios iniciais do desenvolvimento deriva de amido e de proteínas de reserva que são conhecidas pelo nome de zeínas. A composição bioquímica das sementes está relacionada com a qualidade. Genótipos de milho com altos níveis de sacarose e outros açúcares geralmente apresentam baixa qualidade de semente (Cobb e Hannah, 1986). Por outro lado, Sinniah *et al.* (1998) observaram que em brássicas, açúcares e proteínas têm igual importância no desenvolvimento de sementes de alta qualidade. Bernal-Lugo e Leopold (1992) relataram que a perda de vigor em sementes de milho enquanto armazenadas estava associada com o declínio de vários carboidratos solúveis e que o esgotamento de reservas de rafinose precede a de sacarose. Agrupamento da cromatina, degeneração da mitocôndria e plastídeos, peroxidação de lipídeos, aumento da atividade da amilase, do conteúdo de aminoácidos e ácidos graxos livres, decréscimo da

síntese de DNA, monossacarídeos, rafinose e fosfolipídios são alguns dos fenômenos fisiológicos associados com a deterioração de sementes de milho (Berjak *et al.*, 1986; Kataki *et al.*, 1997). Além disso, a eficiência do sistema enzimático na detoxificação de hidroperóxidos tem um papel muito importante na manutenção do vigor e da viabilidade das sementes durante o armazenamento e estágios iniciais de germinação (Bernal-Lugo *et al.*, 2000).

O processo de desenvolvimento bem como as alterações físicas, químicas e fisiológicas no embrião e no endosperma e suas interrelações contribuem para a garantia de uma germinação e emergência do solo rápida até seu estabelecimento, com vigor de planta capaz de alcançar a fase reprodutiva (Nonogaki, 2006). Independentemente da sua gravidade, danos na semente aceleram o envelhecimento, predispondo as sementes a infecções, reduzindo a germinação e o vigor e assim diminuindo a produtividade final da lavoura.

Quanto ao controle genético de caracteres associados à qualidade de sementes de milho, não existem muitos relatos na literatura. Vários autores descreveram o efeito de heterose sobre a qualidade fisiológica de sementes em híbridos de milho (Causse *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2000; Hoecker *et al.*, 2006; José *et al.*, 2004; Rood *et al.*, 1990; Rood e Larsen, 1988). Já Silva (2006) obteve altos valores de herdabilidade para caracteres relativos à qualidade fisiológica da semente de milho. Regiões associadas à tolerância a altas temperaturas de secagem foram identificadas nos cromossomos seis e oito de milho (Salgado, 2005). Ibañez *et al.* (2004) concluíram que o dano decorrente do processamento de sementes de milho depende de fatores genéticos e ambientais. Com o advento do seqüenciamento do genoma, algumas informações estão sendo obtidas em plantas modelo, como é o caso de *Arabidopsis* (Silva, 2006). Diversos genes já foram identificados como envolvidos no processo de germinação de sementes (Nonogaki, 2006; Consonni *et al.*, 2005).

Na literatura não existem muitos relatos a respeito do controle genético de caracteres associados à qualidade de sementes de milho. Com o advento do seqüenciamento do genoma, algumas informações estão sendo obtidas em plantas modelo, como é o caso de *Arabidopsis*. Uma revisão a esse respeito foi apresentada por Nonogaki (2006). Nesse trabalho, ele relaciona algumas dezenas

de genes envolvidos com o processo de germinação. Esses genes estão, principalmente, relacionados à produção de determinados tipos de hormônios.

Diversas técnicas de Biologia Molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética na seqüência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismos genéticos. Essas tecnologias de análise permitiram determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética básica como na prática de melhoramento.

Utilizando a informação indireta dos marcadores é possível construir um mapa de QTLs. Mapeamento de QTLs não é apenas sua localização física no genoma, mediante alguma escala apropriada, mas também a quantificação e a caracterização de seus efeitos, como interações alélicas de cada um. (Bearzoti, 2000). A construção dos mapas de ligação envolve a escolha de genitores contrastantes para a característica em estudo, o desenvolvimento da população segregante, a identificação dos marcadores moleculares e análises estatísticas para estimar as probabilidades de ligação e as distâncias entre marcadores. Dependendo da espécie, do seu sistema reprodutivo, do objetivo do estudo e do tempo disponível, podem ser usados vários tipos de populações segregantes visando maximizar o desequilíbrio de ligação entre as marcas e os alelos do gene em estudo (Tanksley *et al.*, 1989), sendo que as mais utilizadas são populações F_2 , retrocruzamentos e linhas endogâmicas recombinantes (Burr *et al.*, 1988). O mapa é construído em duas etapas: inicialmente há a identificação dos grupos de ligação e, posteriormente o ordenamento dos marcadores em cada grupo de ligação (Coelho e Silva, 2002).

Métodos têm sido elaborados para identificar e localizar QTLs. O método de mapeamento baseado em intervalo foi proposto inicialmente por Lander e Botstein (1989). Neste caso, pares de marcadores genéticos ligados entre si são analisados simultaneamente com respeito aos seus efeitos sobre caracteres quantitativos. Pelo uso de marcadores ligados na análise, aumenta-se o poder de detecção de QTLs ao longo do genoma e torna-se possível estimar seu efeito sobre a expressão do caráter, bem como sua distância dos marcadores (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Com a disponibilidade destas ferramentas moleculares, é possível identificar regiões genômicas em milho associadas aos aspectos de qualidade de sementes e assim efetuar a seleção de linhagens superiores de forma rápida, e não-destrutiva. Estas regiões genômicas associadas a características quantitativas, ou QTLs (*Quantitative Trait Loci*), uma vez definidas, podem ser usadas como referência na seleção em nível molecular de linhagens que apresentem melhores perfis de qualidade de sementes. Além disso, estas informações podem servir como ponto inicial na elucidação de genes envolvidos nos diferentes aspectos da qualidade de sementes.

Referências

- Bearzoti E (2000) Mapeamento de QTL. In: Análise de QTL no Melhoramento de Plantas - 2ª Jornada em Genética e Melhoramento de Plantas. Goiânia: FUNAPE. pp 63-224.
- Bernal-Lugo I and Leopold CL (1992) Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol* 98: 1207-1210.
- Bernal-Lugo I, Camacho A and Carballo A (2000) Effects of seed ageing on the enzymatic antioxidant system of maize cultivars. In: Black M, Bradford KJ and Vásquez-Ramos J (ed) *Seed biology: advances and applications*. CAB International, Wallingford, pp 151-160.
- Berjak P, Dini M and Gevers HO (1986) Deteriorative changes in maize embryo of long-stored, uninfected maize caryopses. *S Afr J Bot* 52: 109-116.
- Carvalho NM and Nakagawa J (2000) *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- Causse M, Rocher JP, Pellesci S, Barriere Y, Devienne D, Prionil JL (1995) Sucrose phosphate synthase: enzyme with heterotic activity correlated with maize growth. *Crop Sci* 35: 995-1001.
- Coelho ASG, Silva HD (2002) *Construção de mapas genéticos e mapeamento de QTLs*. Piracicaba. 66p.
- CONAB (2008) [www. Agricultura.gov.br](http://www.Agricultura.gov.br)
- Consonni G, Gavazzi G and Dolfini S (2005) Genetic analysis as a tool to investigate the molecular mechanisms underlying seed development in maize. *Ann Bot*, 96: 353-362.

Coob BG and Hannah LC (1986) Sugar utilization by developing wild type and shrunken-2 maize kernels. *Plant Physiol* 80: 609-611.

Coolbear P (1995) Mechanisms of seed deterioration. In: Basra AS (ed) *Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications*. 9th edition The Haworth Press Inc., New York, pp. 223-277.

Delouche JC, Baskin, CC (1973) Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci Techn* 1: 1973.

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas* 220p.

Hampton JG (2002) What is seed quality? *Seed Sci Techn* 30: 1-10.

Hoecker N, Keller B, Piepho HP, Hochholdinger F (2006) Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. *Theor Appl Gen* 112: 421-429.

Ibañez MA, Santandrea MJ, Kenny V, Bonamico MC, Faricelli ME and Di Renzo MA (2004) Biplot analysis of maize seed quality with mechanical damage. *Biocell*, 28: 369.

Jose SCBR, Von Pinho EVR, Von Pinho RG, Ramalho MAP, Silva filho JL (2004) Controle genético da tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho. *Rev Bras Mil Sor* 3: 414-428.

Kataki PK, Horbowicz M, Taylor AG and Obendorf RL (1997) Changes in sucrose, cyclitols and their galactosyl derivatives with seed ageing. In: Ellis RH, Black M, Murdoch MH and Hong TD (ed) *Basic and applied aspect of seed biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 515-522.

Krzyzanowski FC (1998) Relationship between seed technology research and federal plant breeding programs. *Sca Agr* 55: 83-87.

Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative trait using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.

McDonald MB (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment, *Seed Sci Techn* 27: 177-237.

Moore RP (1972) Effects of mechanical injuries on viability In: Roberts EH (ed) *Viability of seeds*. Chapman and Hall, London, pp. 94-113.

Nakagawa J (1999) Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: França Neto JB, Krzyzanowski FC, Veira RD (1999) *Vigor de sementes: conceitos e testes*. pp. 221.

Nonogaki H (2006) Seed germination - the biochemical and molecular mechanisms. *Breed Sci*, 56: 93-105.

Peterson JM, Perdomo JA and Burriss JS (1995) Influence of kernel position mechanical damage and controlled deterioration on estimates of hybrid maize seed quality. *Seed Sci Technol*, 23: 647-657.

Popinigis F (1977) *Fisiologia da semente*. 289 p.

Rood SB, Buzzell R I, Major DJ, Pharis RP (1990) Gibberellins and heterosis in maize: quantitative relationships. *Crop Sci* 30: 281-286.

Rood SB, Larsen KM (1988) Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. *Exper Bot* 39: 223-233.

Salgado KCPC (2005) Mapeamento de QTLs associados à tolerância a alta temperatura de secagem em sementes de milho. Dissertação. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Silva N (2006) Controle genético de características associadas à qualidade de sementes em milho. Dissertação. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Sinniah UR, Ellis RH and John P (1998) Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. *Ann Bot*, 82: 647-655.

Tanksley SD (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnol* 7: 257-64.

Capítulo II - Identificação de QTLs em milho associados à qualidade de sementes no pós-processamento

Resumo

A sustentabilidade dos altos níveis de produtividade em lavouras de milho depende, entre outros fatores, da disponibilidade de sementes de alta qualidade. A resistência ao dano de processamento é um fator crítico na qualidade da semente de milho, pois danos causados pelo processamento aceleram a perda de qualidade durante o armazenamento. O objetivo deste trabalho foi identificar regiões genômicas em milho associados à resistência das sementes ao dano de processamento durante o processamento. Uma população segregante de 231 famílias $F_{2:3}$, proveniente do cruzamento entre uma linhagem suscetível e outra resistente ao dano de processamento, foram submetidas à análise de vigor de semente após simulação de dano que ocorre durante o processamento. Os valores de redução do vigor foram utilizados na análise de QTLs com base em um mapa molecular contendo 52 marcadores microssatélites. Foi identificado um QTL no cromossomo 9, apresentando LOD de 6.56 e variância fenotípica explicada de 14%. A região genômica que contém este QTL já foi identificada anteriormente como associada a características físicas de sementes e apresenta genes relacionados ao processo de germinação. Evidências de efeitos epistáticos indicam que esta característica envolve vários genes atuando de forma complexa. Da mesma forma, a possibilidade de um gene maior (considerando o modelo também aceito de dominância completa) atuando em recessividade para resistência não descarta a possibilidade de genes menores com diferentes efeitos no grau de suscetibilidade. A análise da expressão diferencial destes genes nestas regiões genômicas pode contribuir na elucidação dos fatores envolvidos na qualidade de sementes de milho após o processamento.

Palavras-chave: microssatélites, marcadores moleculares, produção sementes, mapa molecular

Identification of QTLs in maize associated to post-processing seed quality

Abstract

Sustainability of high yield levels on maize depends, among several factors, on the availability of high quality seeds. Resistance to processing damage is a critical factor on maize seed quality since damage during processing contributes on the quality loss during storage. The objective of this study was to identify QTLs in maize associated to seed resistance to processing damage. A 231 F_{2:3} segregating population derived from a cross between a resistant and a susceptible inbred to damage was screened to seed vigor after processing simulation. Levels of reduction on vigor were applied on a QTL mapping based on a 52 SSR molecular map. One QTL was identified on chromosome 9 as associated to processing damage resistance, under a LOD score of 6.56 and explaining 14% of the phenotypical variance. The genomic region identified is known as associated to physical seed traits and as containing genes related to germination process. Evidence of epistatic effects indicates that this trait involves multiple genes acting in a complex way. Similarly, the possibility of a major gene (also considering the accepted model of complete dominance) acting in recessiveness for resistance does not discard the possibility of minor genes with different effects in the degree of susceptibility. A further analyses based on differential expression may contribute on the clarification of factors involved on maize seed quality after processing.

Key-words: microsatellites, molecular markers, seeds production, molecular map

Introdução

Altos níveis de produtividade em lavouras de milho dependem, entre outros fatores, da disponibilidade de sementes de alta qualidade. A qualidade de sementes é um termo bastante amplo, pois envolve diferentes propriedades as quais podem ser categorizadas em três grandes grupos: a qualidade sanitária, que se refere à limpeza e pureza das sementes (corpos estranhos, sementes quebradas, infecções fúngicas, etc); a qualidade física, relacionada à aparência visual das sementes (como tamanho, forma, cor e densidade) e a qualidade fisiológica, sendo estes aspectos que garantem uma germinação e emergência do solo rápida até seu estabelecimento, com vigor de planta capaz de alcançar a fase reprodutiva. O desempenho das sementes está relacionado ao histórico de sua produção e processamento, bem como as condições ambientais e época de cultivo (Maier, 2004).

Grande parte do dano causado às sementes durante o processamento está relacionado ao processo de colheita e secagem. A debulha de sementes úmidas resulta em rachaduras e sementes quebradas, assim como na fase de secagem forçada com aplicação de ar quente, cuja temperatura pode variar de 82 a 115° C, práticas estas comumente adotadas no beneficiamento de sementes de milho (Maier, 2004). Cada etapa do processamento envolve algum movimento das sementes em sentido horizontal, elevação e/ou declive. A resistência ao dano é um fator crítico na qualidade da semente de milho, pois danos causados pelo processamento aceleram a perda de qualidade durante o armazenamento (Ajayi, 2005). A suscetibilidade ao dano depende de fatores genéticos e ambientais (Ibañez *et al.*, 2004). Dessa forma, é possível incrementar a resistência ao dano na fase de melhoramento e desenvolvimento das linhagens de milho, assegurando assim o potencial de qualidade das sementes dos futuros híbridos.

Com a disponibilidade de ferramentas moleculares, é possível identificar regiões genômicas em milho associadas aos aspectos de qualidade de sementes e assim efetuar a seleção de linhagens superiores de forma rápida, precisa e não-destrutiva. Estas regiões genômicas associadas a características quantitativas, ou QTLs, uma vez definidas, podem ser usadas como referência na seleção em nível molecular de linhagens que apresentem melhores perfis de qualidade de

sementes. Além disso, estas informações podem servir como ponto inicial na elucidação de genes envolvidos nos diferentes aspectos da qualidade de sementes.

O objetivo deste trabalho foi identificar QTLs em milho associados à resistência das sementes ao dano sofrido durante o processamento.

Material e Métodos

Descrição da população utilizada

Uma população segregante de 231 famílias $F_{2:3}$ foi desenvolvida a partir do cruzamento de duas linhagens do programa de melhoramento da Syngenta Seeds. A linhagem NP4006, textura de grão flint, germoplasma argentino, a qual apresenta alta suscetibilidade ao dano de processamento foi cruzada com a linhagem NB9304, textura de grão flint, germoplasma brasileiro, a qual apresenta boa qualidade de semente. Os cruzamentos para obtenção de sementes F_1 foram realizados na Unidade de Pesquisa da Syngenta Seeds em Santa Isabel, Argentina. A partir das sementes F_1 foi obtida a geração F_2 . Sementes de cada planta F_2 autofecundada foram colhidas separadamente para originar famílias $F_{2:3}$. Cada família $F_{2:3}$ foi plantada a campo na Unidade de Pesquisa da Syngenta Seeds em Santa Isabel, Argentina em parcelas de 2 linhas de 5m de comprimento e 70 cm entre linhas. Foram semeadas 28 sementes por linha, resultando em uma densidade equivalente a 80.000 plantas/ha.

As espigas foram colhidas com umidade de aproximadamente 18% e secadas à sombra até atingirem uma umidade de 13%. A seguir, as espigas foram despalhadas e debulhadas manualmente e as sementes armazenadas em câmara fria sob temperatura de aproximadamente 10° C e umidade 50%.

Avaliação fenotípica das progênes para resistência ao dano de processamento

Foram preparadas duas amostras de 500 g de semente de cada família e de cada linhagem parental, sendo que uma das amostras foi submetida à simulação de processamento a fim de ocorrência de dano. O equipamento utilizado para simulação de dano foi desenvolvido internamente pela Syngenta Seeds, Argentina (figuras 1 e 2). O processo consiste em manter as sementes por um determinado tempo em movimento, sofrendo a movimentação horizontal, declives e elevações típicas do processamento de sementes de milho. O processo é iniciado no compartimento “A”, um tambor onde é simulado o dano

abrasivo. O tanque tem deflectores internos, simulando o interior das torres de classificação de sementes de milho no processamento real das sementes. A seguir, as sementes caem em uma área tubular (“B”), onde um ventilador em alta velocidade impele ar no tubo e movimenta as sementes a alta velocidade e, finalmente, a semente bate na abertura “D”, onde recebe um dano de impacto. A seguir, as sementes caem na tremonha e voltam ao tanque para reiniciar o processo. Após a simulação do dano por cinco minutos, todas as sementes foram armazenadas em câmara fria com umidade e temperaturas constantes até a execução do teste de vigor.

Para ambas as amostras de cada família (com e sem dano) foi determinado o nível de vigor das sementes, em 2 repetições de 100 sementes por família. O vigor foi determinado com base no teste de frio saturado (CoSat), seguindo o protocolo determinado por AOSA (1983) e modificado de acordo com procedimento utilizado no Laboratório de Qualidade da Syngenta Seeds, Argentina. O teste foi realizado em bandeja contendo solo proveniente de área anteriormente cultivada com milho. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas a 10° C por quatro dias e após este período, transferidas para um ambiente escuro à temperatura de 25° C por três dias. Após este prazo, foi contado o número de plantas normais emergidas e os valores expressos em percentagem em relação ao número de sementes semeadas. Para cada família (i), foi obtida a percentagem de redução de vigor devido ao dano (VR), sendo:

$$VR_i = \frac{\text{vigor da amostra sem dano} - \text{vigor da amostra com dano}}{\text{vigor da amostra sem dano}} \times 100.$$

Dessa forma, quanto maior o valor de VR, mais suscetível é a família segregante ao dano de processamento.



Figura 1. Equipamento simulador de dano de processamento utilizado para o tratamento das sementes de milho utilizadas neste estudo.

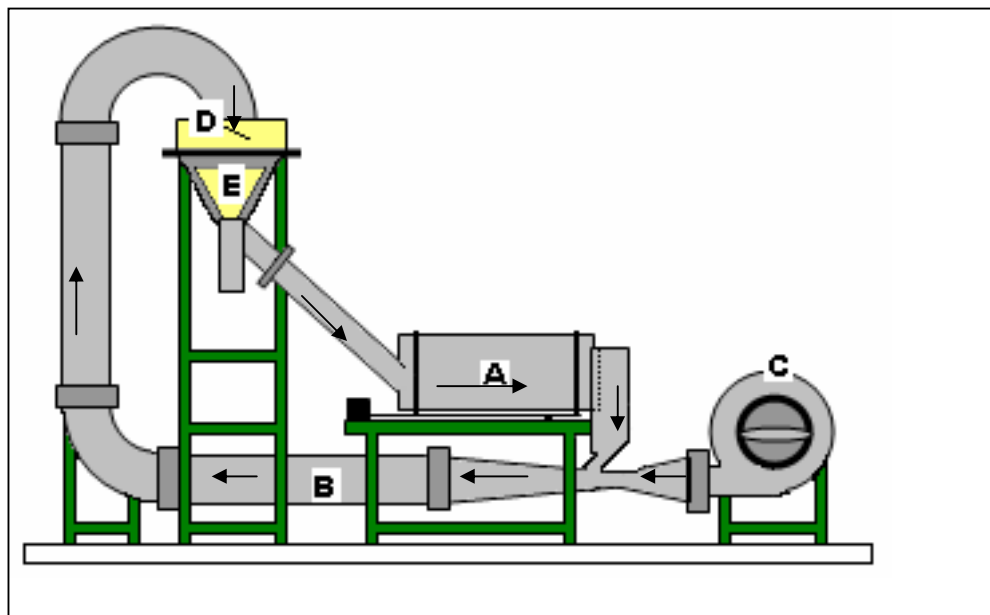


Figura 2. Esquema de equipamento simulador de dano de processamento utilizado para o tratamento das sementes de milho utilizadas neste estudo.

Análises estatísticas dos dados fenotípicos

Foi utilizado o teste F (0.05) para as médias de vigor de sementes submetidas e não submetidas ao dano e VR.

O modelo de herança foi inferido com base nos valores de VR, por meio da categorização e análise pelo teste de X^2 . As classes fenotípicas foram definidas com base no valor de VR. O valor crítico para rejeitar a hipótese ao nível de 5% com um grau de liberdade foi de 3.84 (Strickberger, 1976).

Realizou-se a análise de variância no delineamento inteiramente casualizado com duas repetições.

Foram obtidas as seguintes estimativas (CRUZ e CARNEIRO, 2003):

variância fenotípica média: $\hat{\sigma}_f^2 = \frac{QMT}{r}$; variância ambiental média: $\hat{\sigma}^2 = \frac{QMR}{r}$;

variância genotípica média: $\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QMT - QMR}{r}$; herdabilidade baseada na média

de família: $h^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2}$; coeficiente de variação genético: $CV_g \% = \frac{(100\sqrt{\hat{\sigma}_g^2})}{m}$; em que

QMT é o quadrado médio de tratamentos; QMR é o quadrado médio de resíduos; "r" é o número de repetições e "m" é a média geral.

Genotipagem por marcadores microssatélites (SSR)

Para a construção do mapa genético e posterior identificação de QTLs, primeiramente foi realizada uma triagem com 805 marcadores tipo Microssatélites (SSR) baseada no genótipo das linhagens parentais, para identificação de *loci* polimórficos. Os SSR que apresentaram polimorfismo entre as linhagens parentais foram utilizados para genotipar cada uma das 231 famílias $F_{2:3}$. Os marcadores SSR são codominantes e assim foi possível identificar famílias homocigotas para os alelos de cada um dos parentais e famílias segregando para ambos os alelos. A genotipagem, construção do mapa genético e mapeamento de QTLs foi realizado no Laboratório de Genética Molecular da Syngenta Seeds em Uberlândia, MG.

Obtenção do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir do protocolo MINIPREP (Doyle e Doyle, 1990) com modificações, a partir de amostras de folhas dos parentais e de *bulks* de 12 plantas de cada família, a fim de representar o genótipo de cada família F_{2:3}. A quantificação do DNA foi feita utilizando espectrofotômetro por meio da leitura nas faixas de 260nm. A concentração foi calculada a partir da fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ ng}/\mu\text{L} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Fator de diluição},$$

onde: OD₂₆₀ é o valor da leitura da absorbância em 260nm;

50 é o fator de conversão para DNA dupla-fita;

Fator de diluição é a razão volume total /volume da amostra de DNA, sendo neste estudo igual a 100.

O DNA estoque foi mantido a -20°C e o DNA diluído, na concentração de trabalho de 20ng/μL, foi armazenado a 4°C.

Análises de SSR

Inicialmente, foram testados 805 pares de *primers* SSR, pertencentes ao acervo do Laboratório de Genética molecular da Syngenta Seeds Ltda, entre as linhagens NP4006 e NB9304, para selecionar os *loci* polimórficos. A partir desta triagem os primers polimórficos foram utilizados na população F_{2:3}, para a construção do mapa genético.

Tanto na triagem quanto na genotipagem da população F₂, as reações de amplificação dos SSR foram conduzidas em volume final de 10μL. Cada reação foi constituída de: 3,0 μL de DNA genômico, 4,9μL de água ultra pura, 1,0μL de tampão de reação 10X (20mM de MgCl₂), 0,5μL de dNTP (5mM), 0,1μL de Taq DNA polimerase (5U/μL) e 0,5μL dos *primers* R (*reverse*) e F (*forward*) (10μM).

As amplificações foram realizadas em termocicladores programados para uma etapa de 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60° por 45 segundos para amplificação e 72°C por 2 minutos para a extensão final.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose de alta resolução a 3% preparado com TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo (0,5μL/mL). Como referencial de pesos moleculares, foram empregados 5μL de DNA marcador 25pb. A eletroforese foi conduzida a uma

voltagem constante de 170V durante 90 minutos. Os fragmentos foram visualizados em transluminador UV e as imagens digitalizadas para posterior tabulação dos dados.

Como os SSR são codominantes, foi possível identificar os genótipos heterozigotos e homozigotos. Os indivíduos da população que apresentaram o alelo igual ao do parental resistente à característica estudada foram tabulados como “A”, os que apresentaram o alelo igual ao do parental susceptível foram tabulados como “B” e aqueles que apresentaram os dois alelos foram tabulados como “H”. Os dados perdidos foram representados com “-“. Uma matriz contendo os SSR e os indivíduos foi elaborada com estes dados.

Construção do mapa genético e identificação dos QTLs

O mapa genético foi elaborado com a utilização dos softwares Joinmap 3.0 (Ooijen e Voorrips, 2001) e Mapmaker/EXP (Lander *et al.*, 1987), utilizando o LOD score igual a 6 e distâncias em centiMorgans (cM) pela função Kosambi (Kosambi, 1944). A identificação de QTLs associados à resistência ao dano de processamento foi feito por mapeamento por intervalo composto (CIM) com base das médias do valor de VR por família, empregando o software QTLCartographer 2.5 (Wang *et al.*, 2000; Zeng, 1994). O intervalo de precisão foi de 1cM, com uma distância de 10cM para controlar a interferência de múltiplos QTLs por meio de modelos de regressão *backward and forward*. A localização do QTL mais provável foi estimada pelo valor de $LOD \geq 4,2$, determinado de acordo com análise de 1000 permutações para os dados fenotípicos ($\alpha=0.05$), segundo Doerge e Churchill (1996).

A ação gênica do QTL detectado foi determinada por meio das estimativas do grau de dominância ($d/[a]$) e classificadas segundo o critério proposto por Stuber *et al.* (1987) e Salgado (2005). Assim, aditividade se $0 < (d/[a]) < 0,2$; dominância parcial se $0,21 < (d/[a]) < 0,80$; dominância se $0,81 < (d/[a]) < 1,20$ ou sobredominância se $(d/[a]) > 1,20$.

Resultados e Discussão

Resultados fenotípicos

Uma das premissas básicas em estudos de mapeamento de QTLs é o contraste entre os progenitores da população utilizada para o estudo da característica em questão. Os valores de VR obtidos para as linhagens parentais indicaram que estas duas linhagens apresentavam perfil adequado para a geração de uma população segregante para este estudo (tabela 1). Além disso, foi possível observar que a diferença entre elas foi inerente do efeito de dano de processamento, já que no teste CoSat sem simulação prévia do dano, ambas apresentaram altos níveis de vigor de semente, sem diferença estatisticamente significativa (tabela 1).

Os valores semelhantes de CoSat obtidos para os progenitores, quando sem submissão ao dano, demonstra que a identificação de QTL neste estudo foi direcionada para a característica *per se* e não houve influência de outros parâmetros de qualidade de sementes. Quando dados da população segregante, sem submissão ao dano, foram submetidos à análise de QTLs, nenhuma região foi identificada, reforçando a especificidade dos dados para a característica de resistência a esta característica (dados não apresentados).

Tabela 1. Vigor de sementes das linhagens progenitores NB9304 e NP4006 com e sem submissão ao dano de processamento e valores de VR.

Progenitor	CoSat		VR*
	sem dano ^{ns}	com dano*	
9304	89.0	63.0	29.2
NP4006	89.9	27.1	69.8

*: significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F; ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

Outro requisito para o estudo de QTLs é a utilização de uma população segregante para a característica em questão, em geração F_2 a F_n , cujos dados fenotípicos apresentem uma distribuição normal. A população estudada

apresentou um valor médio de 54,70 para VR e desvio padrão de 21,51. A distribuição das freqüências de VR apresentou uma pequena assimetria em relação ao padrão normal, sendo -0.34 para assimetria e 0.97 para curtose ou “achatamento” (figura 3). De acordo com Bradshaw *et al.* (1998), a utilização de dados não-normais pode influenciar na identificação e dimensão da magnitude de QTLs, uma vez que esta análise assume uma distribuição normal dos dados fenotípicos. No entanto, de acordo com Silva (2004), se o coeficiente de assimetria situa-se em um intervalo de -0.5 a +0.5, a distribuição normal pode ser considerada aproximadamente simétrica. Outros autores, como Bryman e Cramer (1997) usam valores ainda mais lenientes, considerando que com valores de simetria no intervalo ± 1 a distribuição ainda poderia ser considerada normal.

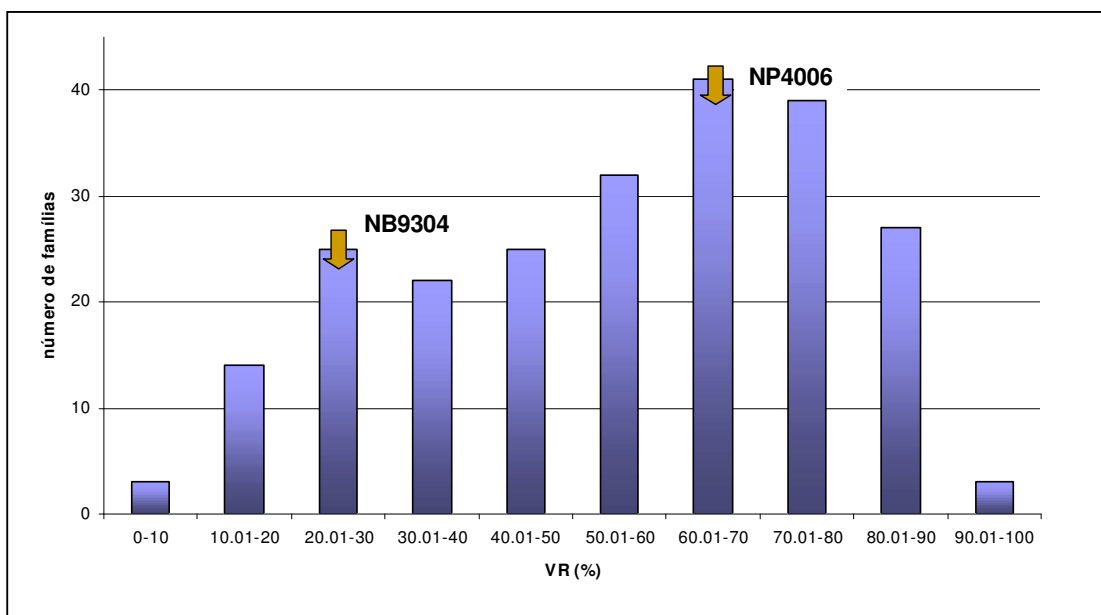


Figura 3. Distribuição das freqüências do valor de percentagem de Valor de Redução (VR) entre as 231 famílias da população estudada. As setas indicam os valores de VR dos parentais da população.

Além disso, no presente estudo, foi utilizado o mapeamento por intervalo composto com uso do teste de permutação para determinação do nível de significância para detecção de QTL que, segundo Doerge e Churchill (1996), minimiza a identificação de falsos QTLs resultantes da utilização de dados fenotípicos com distribuição não-normal em modelos estatísticos desenvolvidos para dados com distribuição normal.

Diferentes hipóteses foram testadas quanto ao modelo de segregação e o número possível de genes envolvidos na herança de resistência da semente de milho ao processamento. A hipótese de epistasia dominante recessiva (13:3) foi testada com base em duas classes fenotípicas definidas pelo valor de VR igual a 30, aproximadamente o observado para o parental resistente da população em estudo. Outra hipótese testada foi a de dominância completa (3:1), sendo neste caso as duas classes definidas pelo valor de VR igual a 40. Este valor foi considerado em função da ocorrência de uma depressão na curva da distribuição normal, nessa amplitude, o que pode ser em decorrência da ação de um gene dominante coordenando a resistência ao processamento (VR abaixo de 40%). Ambas as hipóteses testadas (13:3 e 3:1) foram significativas (tabela 2).

O teste de X^2 é empregado para estimar o valor da probabilidade (P) associado a um determinado desvio e, portanto, quanto maior o valor da probabilidade, maior é a chance de que os desvios sejam devido ao acaso (Ramalho *et al.*, 1990). No modelo de epistasia dominante recessiva a característica pode se expressar em função da presença de um alelo dominante de um dos genes e da condição recessiva homocigota do outro gene. No caso da característica analisada neste estudo, a maior resistência ao dano durante o processamento pode ser explicada pela presença de um alelo dominante de um gene e presença de outro gene em condição de homocigotidade recessiva.

Considerando a existência de dois genes atuando no modelo de epistasia dominante recessiva (13:3), arbitrariamente denominados aqui como *mechd1* e *mechd2*, é possível inferir que o parental homocigoto resistente estaria na condição alélica *Mechd1 Mechd1 mechd2 mechd2*, enquanto que a linhagem homocigota suscetível estaria na condição *mechd1 mechd1 Mechd2 Mechd2*. Assim, para a condição de resistência ao dano as famílias deveriam obrigatoriamente apresentar pelo menos um dos alelos do gene *mechd1* dominante e o gene *mechd2* em homocigotidade recessiva ((*Mechd1* _____ *mechd2 mechd2*).

Tabela 2. Teste de X^2 para as hipóteses de tipo de herança para o fenótipo valor de redução de vigor (VR) na população estudada.

Modelo de epistasia dominante recessiva (13:3)			
Classe fenotípica	Segregação esperada	Observado	Esperado
VR até 30.0%	3	43	44
VR de 30.01 a 100%	13	188	187
$X^2=0,007$	≤ 3.84 (GL=1 e P=0.05)		

Modelo de dominância completa (3:1)			
Classe fenotípica	Segregação esperada	Observado	Esperado
VR até 40.0%	1	65	57
VR de 40.01 a 100%	3	166	174
$X^2=1,213$	≤ 3.84 (GL=1 e P=0.05)		

Modelo de epistasia recessiva dupla (9:7)			
Classe fenotípica	Segregação esperada	Observado	Esperado
VR até 50.0%	7	90	100
VR de 50.01 a 100%	9	141	131
$X^2=2,140$	≤ 3.84 (GL=1 e P=0.05)		

Modelo de epistasia dominante dupla (15:1)			
Classe fenotípica	Segregação esperada	Observado	Esperado
VR até 20.0%	1	18	15
VR de 20.01 a 100%	15	213	216
$X^2=0,946$	≤ 3.84 (GL=1 e P=0.05)		

Efeitos epistáticos já foram identificados no processo de desenvolvimento de sementes. Cui *et al.* (2006) desenvolveram um modelo estatístico que assume efeitos epistáticos entre genes expressos no embrião e endosperma. Este foi validado quando aplicado no genoma do arroz, onde o gene *waxy* se enquadrava no modelo. Este gene é expresso no embrião, porém tem efeito regulador da biossíntese de amilose no endosperma, indicando que expressões gênicas coordenadas e reguladas entre endosperma e embrião são necessárias para o desenvolvimento apropriado da semente. Embora o entendimento destas interações gênicas seja de grande importância para o melhoramento genético e

biologia do desenvolvimento de sementes, pouco foi esclarecido sobre estas co-interações, pois geralmente os estudos se concentram em grupos de genes expressos ou no tecido do embrião ou do endosperma (Cui *et al.*, 2006).

O modelo de dominância completa, também aceito com base no teste de X^2 , na característica estudada seria o de um gene que em condição recessiva levaria a resistência ao dano no processamento. Outros modelos epistáticos, como epistasia recessiva e dominante dupla também foram aceitos a um nível de $p. 0.05$, mas não foram explicados pelas médias apresentadas pelos parentais (tabela 2)

O valor estimado para herdabilidade (H^2) de VR no sentido amplo foi alto (97.29%) (tabela 3). Isso se deve ao fato de que a avaliação desta característica foi realizada em laboratório com ambiente controlado, sendo assim as condições ambientais apresentaram pouca variação. Em trabalho desenvolvido por Silva (2006) também foram obtidos altos valores de herdabilidade para caracteres relativos à qualidade fisiológica da semente de milho.

A herdabilidade não é apenas uma propriedade da característica, mas também da população e das condições ambientais a que foram submetidos os indivíduos. Nesse caso a avaliação fenotípica para resistência ao dano por meio do teste CoSat apresentou alta eficiência para seleção fenotípica, tendo em vista o alto valor observado para H^2 . No entanto, o método é destrutivo e daí a importância de uma alternativa como o uso de seleção assistida por marcadores moleculares.

Tabela 3. Análise de variância para valores de VR para a população estudada.

Análise de Variância				
Fator de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Teste F
tratamentos	230	213825.42	929.67	< 0.005
resíduo	231	5812.07	25.16	
total	461	219637.49		
Média geral		54.79		
CV (%)		9.15		
Variância fenotípica		464.83		
Variância ambiental		12.58		
Variância genotípica		452.25		
H ²		97.29		

Mapeamento de QTLs

Dos 805 SSR verificados quanto ao polimorfismo entre parentais, 95 apresentaram boa amplificação e foram polimórficos. Estes foram utilizados na genotipagem da população e destes, 77 SSR foram informativos, em virtude da dificuldade de uma leitura acurada dos produtos de PCR para os outros 18 SSRs. Dessa forma, em torno de 12% (95 de 805) do total de SSR testados entre as linhagens parentais apresentaram polimorfismo. Isso pode ser explicado em função das linhagens pertencerem ao germoplasma da mesma empresa e, portanto não apresentarem uma distância genética muito grande. No entanto, como já discutido anteriormente, estes genótipos apresentam bastante diferença fenotípica para resistência ao dano durante o processamento, o que é um dos pré-requisitos para obtenção de uma população segregante para a característica em questão neste estudo. Outra causa possível para o baixo número de SSR polimórficos seria a eficiência da técnica de separação de fragmentos em géis de agarose, onde diferenças menores que 5pb entre os fragmentos podem tornar-se indistinguíveis.

Dos 77 SSRs utilizados para realização do mapa, 25 não foram utilizados por não apresentaram-se ligados a nenhum grupo ou por apresentarem um desvio de X^2 significativo, cuja inclusão causava alteração nos grupos de ligação. Valores significativos para X^2 indicam distorção da segregação, que podem ser

inerentes da população ou decorrentes de erros de leitura visual de géis de agarose. No entanto, há relatos do uso de marcadores com distorções mendelianas na construção de mapas de ligação. Mecanismos de seleção pré ou pós-zigóticos explicam, normalmente, tais desvios (Conner *et al.*, 1997; Heusden *et al.*, 2000, citado por Carneiro e Vieira, 2002).

Assim, foi possível obter-se um mapa próximo ao conhecido para o milho, tendo os marcadores SSR agrupados conforme sua posição em outros mapas já elaborados (Maize Genetics and Genomics Database, 2005). Estes SSR foram agrupados em 12 grupos de ligação, representando os 10 cromossomos do milho (figura 4). De acordo com Paterson (1996), um mapa genético pode ser considerado completo, quando os grupos de ligação obtidos sejam em mesmo número de cromossomos gaméticos do organismo e que os marcadores associados em cada grupo apresentem ligações entre si e não com marcadores de outros grupos. O mapa obtido apresenta consistência com o mapa de consenso IBM (Maize Genetics and Genomics Database, 2005), embora os grupos de ligação correspondentes aos cromossomos cinco e sete tenham sido representados em dois subgrupos cada (C5a e C5b; C7a e C7b) (figura 4). Do ponto de vista biológico, os grupos de ligação são definidos como grupos de marcadores cujos *loci* estão localizados no mesmo cromossomo (Carneiro e Vieira, 2002). Estatisticamente, um grupo de ligação pode ser definido como um conjunto de *loci* herdados juntos (Liu, 1998). A representação dos cromossomos cinco e sete em dois subgrupos de ligação cada um pode ser decorrente do fato de que a distância entre os marcadores de cada grupo tenha sido grande o suficiente para serem considerados como não ligados, em decorrência da baixa saturação do mapa nestas regiões.

O mapa genético obtido apresentou um tamanho de 1.088,4 cM, sendo a média de marcadores por grupo de ligação obtido de 4,3, variando de dois a nove marcadores por grupo de ligação. O comprimento médio dos grupos de ligação foi de 90,7 cM. Com base neste mapa, foi identificada uma região associada a menor redução do valor de VR (figuras 5 e 6), situada em um intervalo de 15,4cM entre os marcadores SSR N1072 e N1227, sendo o pico deste QTL situado na posição do marcador N1072. Este QTL situado no grupo de ligação 11, que se refere ao

cromossomo 9, apresentou um valor de LOD de 6.56. O valor 0.14 obtido para R^2 indica que este QTL corresponde por 14% da variância fenotípica de VR (figura 6).

Em estudo de QTLs para rendimento e outras características em milho tropical, Lima *et al.* (2006) identificaram também QTLs cujas proporções da variância fenotípica explicada apresentaram valores baixos e sugeriram que uma maior saturação do mapa genético poderia permitir a detecção de regiões importantes que possam conter grupos de genes com efeitos contrários que se anulam e não são passíveis de detecção na análise. Uma maior saturação do mapa genético desta população, com o uso de marcadores moleculares com maior amplitude de polimorfismo em uma plataforma que permita a detecção de diferenças menores que 5pb como marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) por exemplo, pode ser considerada para um detalhamento maior das regiões envolvidas com a qualidade das sementes em milho.

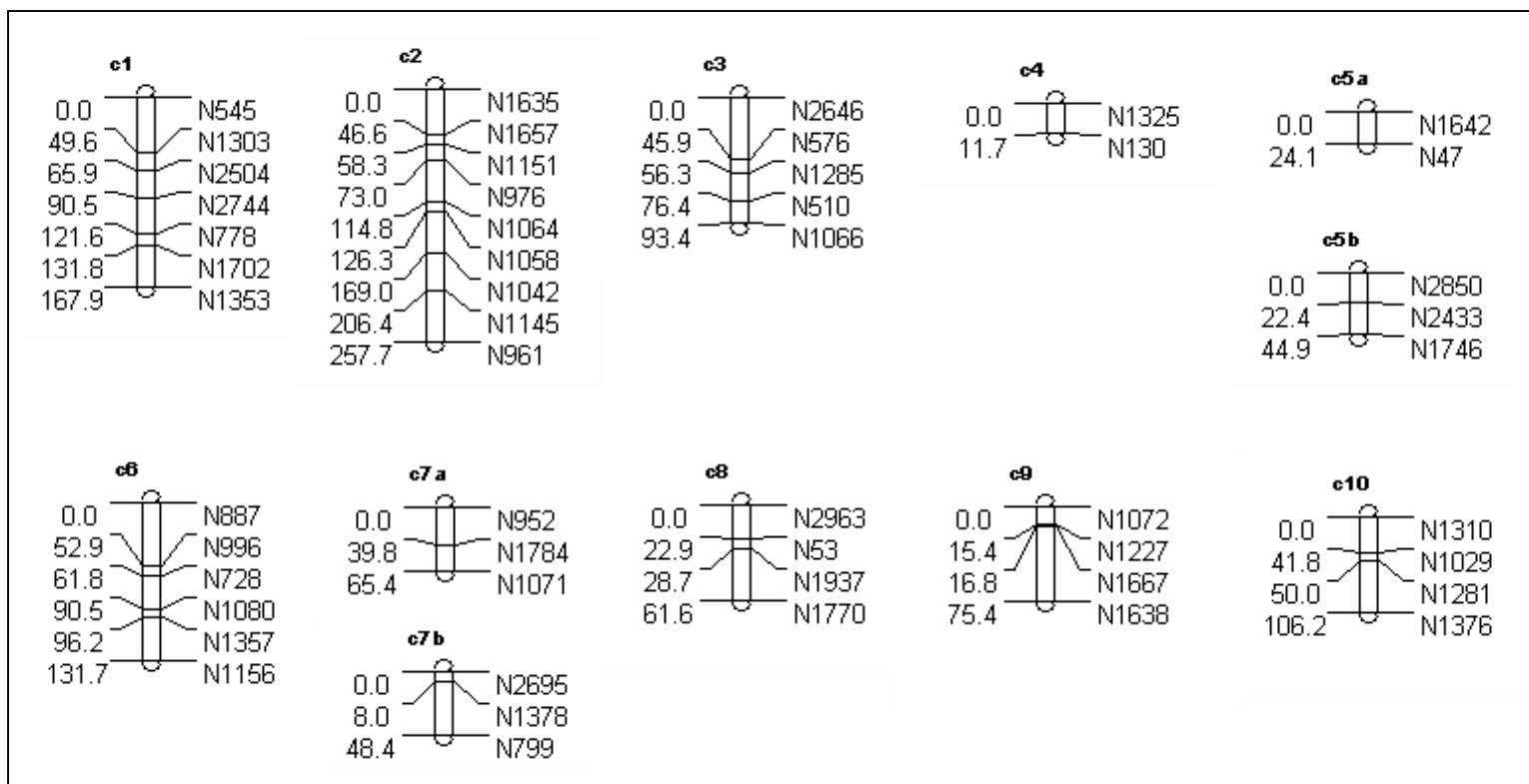


Figura 4. Mapa genético representando os 12 grupos de ligação obtidos com 52 marcadores SSR para população $F_{2:3}$ utilizada neste estudo. Foi considerado LOD 6 e função Kosambi (1944). Os valores à esquerda representam a distância em centimorgans a partir do ponto zero.

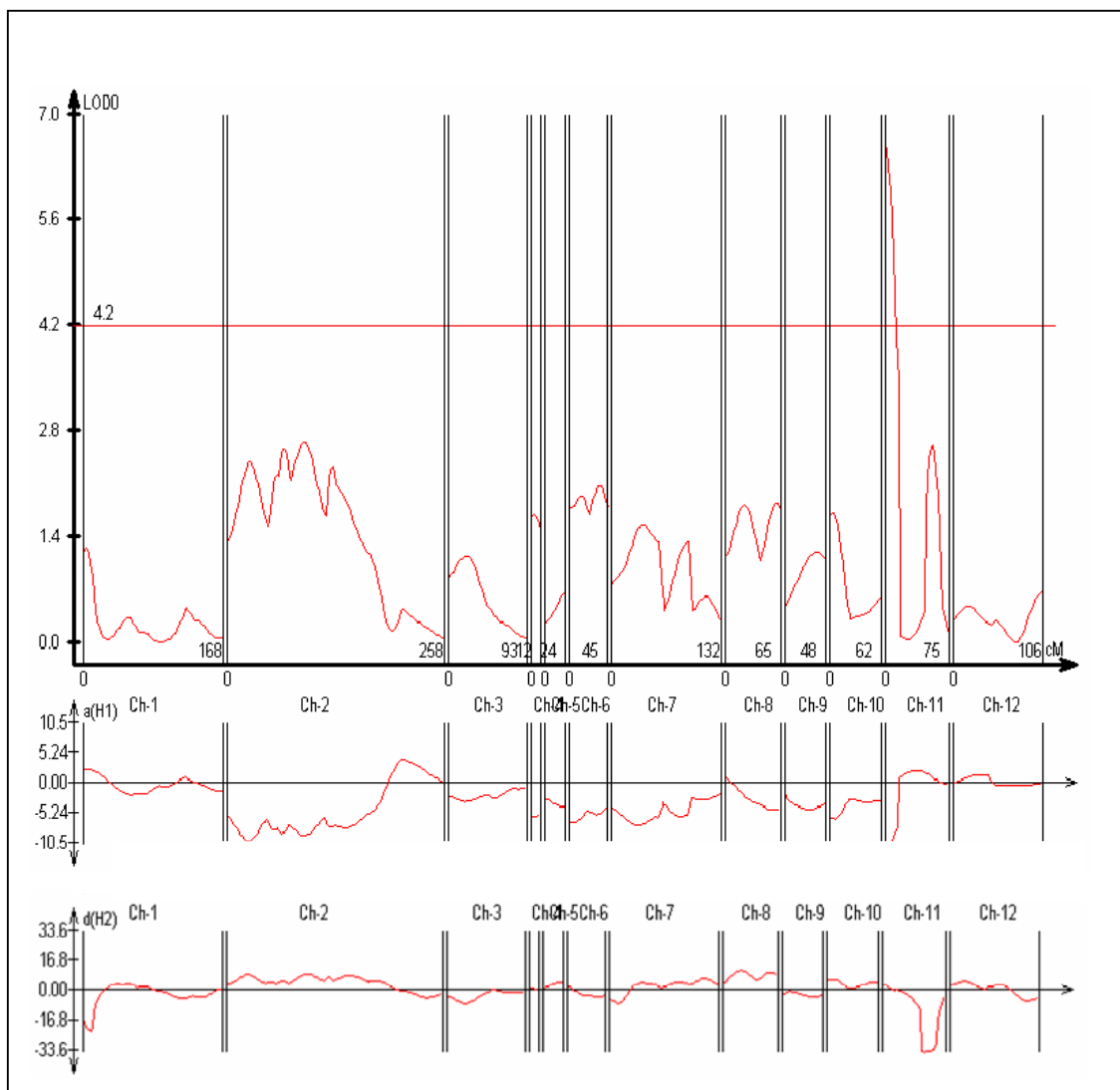


Figura 5. Mapeamento por intervalo composto, indicando a presença de um QTL associado à resistência ao dano durante o processamento no cromossomo 9 (grupo de ligação 11, indicado como “Ch-11”). Os picos representam os valores de LOD, sendo considerados significantes aqueles iguais ou maiores que 4.2. Valores negativos de aditividade (a) e dominância (d) para o QTL identificado indicam que este reduz o valor de percentagem de valor de redução (VR).

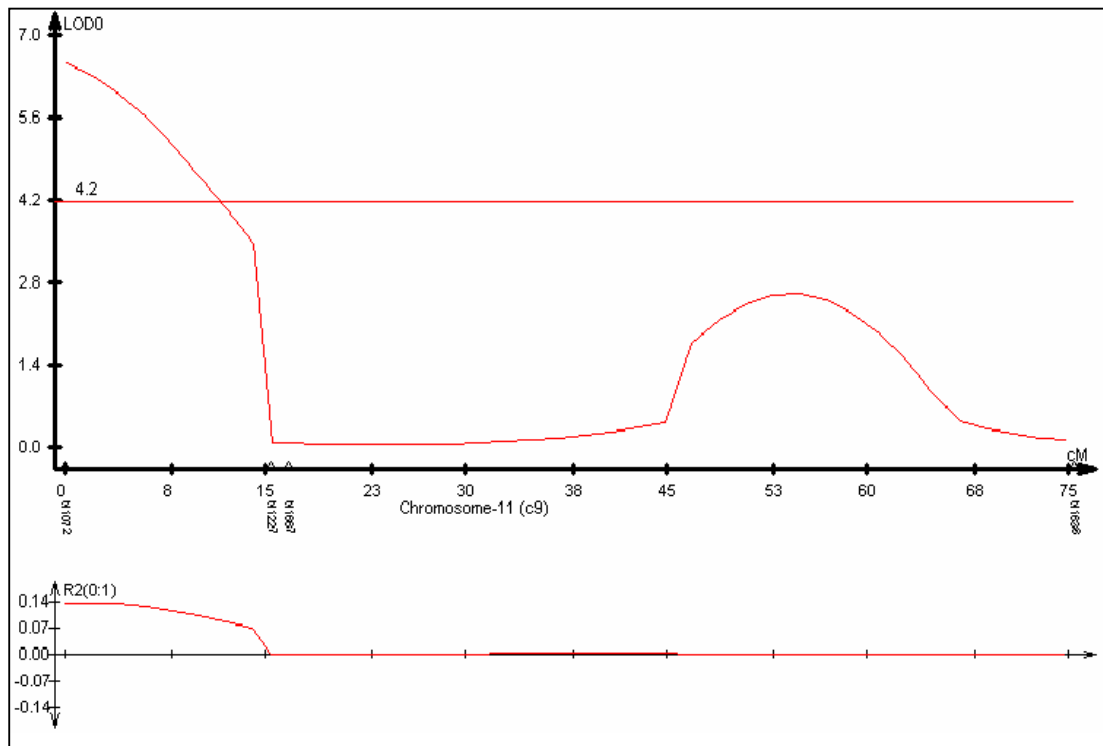


Figura 6. QTL identificado no cromossomo 9 (grupo de ligação 11, indicado como Chromosome-11) em detalhe, numa região de 15.4cM entre os marcadores N1072 e N1227. O valor obtido para R^2 para este pico foi de 0,14.

A ação gênica deste QTL pode ser definida com base no proposto por Stuber *et al.* (1987) e utilizado por Salgado (2005). Assim considerando que o valor de aditividade (a) desta região foi de -10.5 e de dominância (d) -2.8, o valor de $(d/[a])$ é 0,26, indicando que este QTL tem efeito de dominância parcial para a característica desejada. Os valores negativos indicam que o efeito do alelo proveniente do parental favorável, ou seja, do parental com resistência ao dano contribuiu para a diminuição do valor de VR, o que seria esperado já que VR é o valor de percentagem de redução no vigor das sementes. Assim, famílias contendo o alelo da linhagem NB9304 apresentaram menor valor de VR, ou seja, menor redução no vigor quando comparado a ausência de dano durante o processamento.

Evidências de efeitos epistáticos e a identificação de um QTL com dominância parcial explicando pouco da variância fenotípica para resistência ao dano no processamento indica que esta característica envolve vários genes atuando de forma complexa. Da mesma forma, a possibilidade de um gene maior (considerando o modelo aceito de dominância completa) atuando em recessividade para resistência não descarta a possibilidade de genes menores com diferentes efeitos no grau de suscetibilidade. Tendo em vista a seqüência de eventos envolvida ao longo do desenvolvimento da semente em milho e conseqüentemente na qualidade no pós-processamento, é possível a existência de genes com diferentes efeitos, ou mesmo efeitos opostos atuando nesta característica.

Considerando a proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL identificado (14%) poderia-se inferir inicialmente que o uso de seleção assistida neste caso não seria vantajoso no ganho genético, visto que não se enquadra na premissa de seleção indireta, onde a correlação entre o marcador e a característica deve ser maior que a herdabilidade da característica ($h_{2 \text{ marcador } (2)} \times r_{12} > h_{2 \text{ fenótipo } (1)}$). No entanto, na observação da percentagem de concordância entre o genótipo e o fenótipo, a presença do alelo do parental suscetível ao dano em homozigose identificaria 90% das famílias com altos valores de VR (acima de 30%) (figura 7). Na prática, isto significa que a utilização do marcador N1072 em seleção assistida por marcadores (SAM), com base nesta população, seria efetiva para eliminar famílias com baixa resistência ao dano.

A ocorrência de fenótipos suscetíveis ao dano ($30.1 < VR < 100$) apresentando o genótipo de resistência (“A”), resultando em apenas 30% de concordância entre o genótipo e o fenótipo indica que podem existir interações entre os dois genes epistáticos ou ainda falta de quebra de ligação, resultando a detecção apenas do gene *mechd2* pelo marcador N1072 (figura 7 e tabela 4). Para o caso de modelo de dominância completa, o gene em questão, que estaria associado a resistência quando em recessividade, seria o gene *mechd2*.

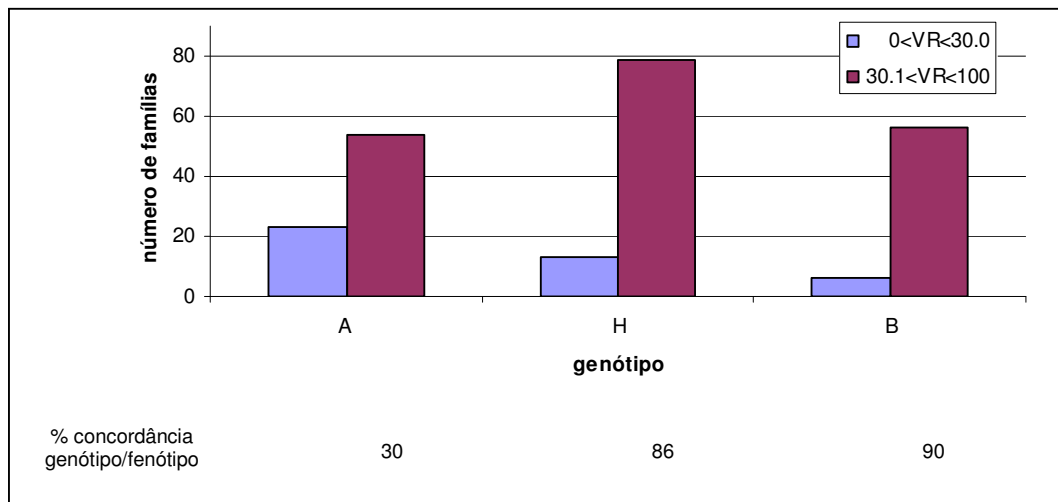


Figura 7. Concordância entre o genótipo para o marcador N1072 e o fenótipo observado. A: alelo igual ao do parental resistente; B: alelo igual ao do parental susceptível; H: presença de ambos os alelos. A percentagem de concordância refere-se a proporção do total de famílias que apresentaram o alelo do genótipo de acordo com o fenótipo observado.

Tabela 4. Provável genótipo epistático em relação ao marcador N1072

N1072	Provável genótipo epistático	Fenótipo	% concordância genótipo/fenótipo
A	<i>Mechd1</i> _____ <i>mechd2 mechd2</i>	R	30
	<i>mechd1 mechd1 mechd2 mechd2</i>	S	
H	<i>Mechd1</i> _____ <i>Mechd2 mechd2</i>	S	86
	<i>mechd1 mechd1 Mechd2 mechd2</i>	S	
B	<i>Mechd1</i> _____ <i>Mechd2 Mechd2</i>	S	90
	<i>mechd1 mechd1 Mechd2 Mechd2</i>	S	

A dissecação de genes situados nesta região genômica identificada no cromossomo nove também pode contribuir na elucidação dos componentes envolvidos na qualidade de sementes de milho após o processamento. Os marcadores N1072 e N1227 que estão na região do QTL identificado estão posicionados nos bins 9.02 e 9.03 do mapa de consenso IBM (Maize Genetics and Genomics Database, 2005). A regionalização dos cromossomos é baseada no conceito de bins. Os mapas genéticos são divididos em 100 segmentos, denominados bins, de aproximadamente 20cM entre dois marcadores fixos principais (Gardiner *et al.*, 1993). Os segmentos são designados pelo número do cromossomo seguido de um decimal de dois dígitos (por exemplo, 1.00, 1.01, 1.02, etc). Um bin é um intervalo que contém todos os *loci* incluídos entre os dois marcadores principais. A localização de um *loci* em um bin é dependente da precisão dos dados do mapa e a certeza aumenta a medida que há maior número de marcadores ou maior tamanho da população. Independentemente de a localização ser estatisticamente incerta, o “bin 1” refere-se ao início de uma amplitude e o “bin 2” refere-se ao fim de uma amplitude.

A região 9.02 possui 38 genes conhecidos e no bin 9.03 existem 47 genes (Maize Genetics and Genomics Database, 2005), entre os quais vários estão envolvidos em características de sementes, como os genes da família *dek* (tabela 4). Estes genes são descritos como associados a endospermas pequenos, não completamente desenvolvidos com, raramente, embriões normais (Becraft *et al.*, 2002). Genes da classe *emb* (*emb2* e *emb8516*) também são conhecidos como situados nesta região genômica do milho (tabela 5). Tratam-se de mutantes que

exibem fenótipos que sugerem defeitos no embrião resultantes da embriogênese, no entanto apresentam endosperma normal (Consonni *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por Beavis *et al.* (1994) identificaram um QTL nesta região associado à espessura de semente, denominado *qkthc3*, o qual está ligado ao *loci wx1*. A região genômica que contém o gene *waxy* também foi identificada por Cui *et al* (2006), em um estudo em arroz sobre a interação de genes expressos no embrião e endosperma e a influência desta expressão no desenvolvimento da semente. O gene *waxy* é sabidamente importante como regulador de uma das principais partes da biossíntese de amilose no endosperma.

Tabela 5. Genes mapeados nos bins 9.02 e 9.03 do genoma do milho. (<http://www.maizegdb.org> consulta realizada em 28/09/2007).

Bin 9.02	Bin 9.03
baf1 barren stalk fastigate1	acp1 acid phosphatase1
cp*-N1092A collapsedN1092A	bk3 brittle stalk3
da1 dilute aleurone1	cp*-N1381 collapsedN1381
emb2 embryo specific2	csu623a
g6 golden plant6	d3 dwarf plant3
hcf113 high chlorophyll fluorescence113	dcr*-N1409 defective crownN1409
l6 luteus6	dek13 defective kernel13
lag1 lowered Ac/Ds germinal reversion1	dsc*-N749 discoloredN749
mbf1 multi-protein bridging factor homolog1	dzs10 delta zein structural10
omt2 Caffeoyl CoA O-methyltransferase2	emb8516 embryo specific8516
pSl3 position shift locus3	gl15 glossy15
skb1 suppressor of kernel blotching1	hcf113 high chlorophyll fluorescence113
thl1 thiolase1	hsk1 high-sulfur keratin homolog1
v*-N829A virescentN829A	knox2 knotted related homeobox2
w*-N1830 whiteN1830	les8 lesion8
w*-N1865 whiteN1865	obf2 octopine synthase binding factor2
w11 white seedling11	pg*-N660A palegreenN660A
wl*-N1857 white luteusN1857	phs1 poor homologous synapsis1
znod1 Zea nodulation homolog1	rf2 restorer of fertility2
bz1 bronze1	rz953
csu471	trn1 torn1
dek12 defective kernel12	v*-N53A virescentN53A
eno1 enolase1	v1 virescent1
ga8 gametophyte factor8	wx1 waxy1

Tabela 5 (continuação). Genes mapeados nos bins 9.02 e 9.03 do genoma do milho. (<http://www.maizegdb.org> consulta realizada em 28/09/2007).

Bin 9.02	Bin 9.03
hyp1 hybrid proline-rich protein1	ar1 argentia1
l7 luteus7	cdo17
lo2 lethal ovule2	csu193
mkk1 mitogen-activated protein kinase1	d*-3010 dwarf candidate3010
prc1 proteasome C9 1	da1 dilute aleurone1
sem1 semaphore1	dek12 defective kernel12
ss1 starch synthase I	dek30 defective kernel30
v*-N1893 virescentN1893	dxs2 deoxy xylulose synthase 2
v31 virescent31	emb2 embryo specific2
w*-N1854 whiteN1854	et*-N357C etchedN357C
w*-N627B whiteN627B	gm*-N1319B germlessN1319B
zb8 zebra crossbands8	hyp1 hybrid proline-rich protein1
	lag1 lowered Ac/Ds germinal reversion1
	ms2 male sterile2
	pep1 phosphoenolpyruvate carboxylase1
	pg12 pale green12
	psl22 position shift locus22
	rpo2 RNA polymerase2
	sem1 semaphore1
	v*-N1871 virescentN1871
	v*-N806C virescentN806C
	wlu4 white luteus4

O endosperma do milho constitui a principal fonte de nutrientes para a germinação do embrião. A maioria do carbono e nitrogênio utilizados nos estágios iniciais do desenvolvimento deriva de amido e de proteínas de reserva que são conhecidas pelo nome de zeínas. Além do gene *waxy*, a região 9.03 também apresenta o gene *dzs10* (tabela 5). Este gene é responsável pela expressão de uma proteína de 10kDa rica em metionina (22.5%). Em estudo de Kiriara *et al.* (1988), foi relatada a existência de um ou dois genes no genoma do milho que expressam proteínas como esta.

O gene *ss1* (starch syntase I), também situado no bin 9.02 em milho, traduz-se em uma enzima que tem efeitos específicos na estrutura do amido, influenciando tanto no comprimento da sua cadeia quanto na sua ramificação.

Outro gene localizado na região onde foi identificado o QTL (bin 9.03) é relacionado ao desenvolvimento inicial da planta. O gene *knox2* é membro de uma classe de genes que expressam homeodomínios de proteínas KNOX, presentes apenas no meristema apical no desenvolvimento do milho (Consonni *et al.*, 2005). São conhecidos diversos genes que suprimem a expressão dos genes *knox* nos primórdios foliares, e um deles recentemente descoberto é o *semaphore 1* (*sem1*). Este gene também está mapeado na região 9.03 e é necessário na manutenção da repressão transcripcional de *knox* durante os estágios posteriores de desenvolvimento da planta. Especialmente em milho, observou-se que *sem1*, entre outros genes, está relacionado com deficiência de transporte de auxinas no meristema. (Consonni *et al.*, 2005)

A composição bioquímica das sementes está relacionada com a qualidade. Genótipos de milho com altos níveis de sacarose e outros açúcares geralmente apresentam baixa qualidade de semente (Cobb e Hannah, 1986). Por outro lado, Sinniah *et al.* (1998) observaram que em brássicas, açúcares e proteínas têm igual importância no desenvolvimento de sementes de alta qualidade. Bernal-Lugo e Leopold (1992) relataram que a perda de vigor em sementes de milho enquanto armazenadas estava associada com o declínio de vários carboidratos solúveis e que o esgotamento de reservas de rafinose precede a de sacarose. Agrupamento da cromatina, degeneração da mitocôndria e plastídeos, peroxidação de lipídeos, aumento da atividade da amilase, do conteúdo de aminoácidos e ácidos graxos livres, decréscimo da síntese de DNA, monossacarídeos, rafinose e fosfolipídios são alguns dos fenômenos fisiológicos associados com a deterioração de sementes de milho (Berjak *et al.*, 1986; Kataki *et al.*, 1997). Além disso, a eficiência do sistema enzimático na detoxificação de hidroperóxidos tem um papel muito importante na manutenção do vigor e da viabilidade das sementes durante o armazenamento e estágios iniciais de germinação (Bernal-Lugo *et al.*, 2000).

O processo de desenvolvimento bem como as alterações físicas, químicas e fisiológicas no embrião e no endosperma e suas interrelações contribuem para

a garantia de uma germinação e emergência do solo rápida até seu estabelecimento, com vigor de planta capaz de alcançar a fase reprodutiva (Nonogaki, 2006). Independentemente da sua gravidade, danos na semente aceleram o envelhecimento, predispondo as sementes a infecções, reduzindo a germinação e o vigor e assim diminuindo a produtividade final da lavoura.

O envelhecimento da semente é um processo integrado de eventos degenerativos contrapostos à capacidade de detoxificação e reparo das sementes (Coolbear, 1995). Além disso, características como umidade, localização na espiga, forma, tamanho e espessura do pericarpo assim como estrutura e posição do embrião tem implicação na suscetibilidade ao dano durante o processamento (Moore, 1972). Sementes de milho grandes e achatadas tendem a ter um processo degenerativo mais lento do que sementes redondas e pequenas, durante o armazenamento. Estudos sobre o efeito do dano de processamento e armazenamento sobre sementes de milho de diferentes posições na espiga indicaram que as provenientes do meio da espiga foram menos danificadas do que aquelas provenientes do ápice e da base da espiga por serem mais uniformes, e conseqüentemente, se sobressaíram melhor durante o armazenamento em relação às outras categorias (Peterson *et al.*, 1995). QTLs para tamanho e peso de sementes também foram identificados na mesma região genômica identificada no presente estudo (Austin, 1996; Bohn, 1997).

Quanto ao controle genético de caracteres associados à qualidade de sementes de milho, não existem muitos relatos na literatura. Em estudo realizado por Gomes (1999) concluiu-se que existe efeito de heterose sobre a qualidade fisiológica de sementes em híbridos de milho. Já Silva (2006) obteve altos valores de herdabilidade para caracteres relativos à qualidade fisiológica da semente de milho. Regiões associadas à tolerância a altas temperaturas de secagem foram identificadas nos cromossomos seis e oito de milho (Salgado, 2005). Ibañez *et al.* (2004) concluíram que o dano decorrente do processamento de sementes de milho depende de fatores genéticos e ambientais. Com o advento do seqüenciamento do genoma, algumas informações estão sendo obtidas em plantas modelo, como é o caso de *Arabidopsis* (Silva, 2006). Diversos genes já foram identificados como envolvidos no processo de germinação de sementes (Nonogaki, 2006; Consonni *et al.*, 2005).

Uma possibilidade para a elucidação dos genes envolvidos seria a combinação de estudos de QTL e a tecnologia de microarranjos de cDNA (DNA microarray), permitindo assim o estudo de genes não antes identificados, o que é fundamental na análise funcional da interação genótipo-fenótipo (Wayne *et al.*, 2002). Atualmente, os microarranjos têm sido utilizados amplamente em estudos sobre classificação de enfermidades humanas e no esclarecimento de regulação de características complexas, assim como na pesquisa na área vegetal para a análise de expressão gênica (Pérez-Enciso *et al.*, 2003). Embora com informação genômica limitada, se comparado à área humana, várias espécies vegetais de importância agrícola têm sido estudadas por meio de microarranjos de DNA, como arroz (Zhu *et al.*, 2003), milho (Hunter *et al.*, 2002) e centeio (Negishi *et al.*, 2002). Estudos atuais estão relacionados com a quantificação, complexidade e estabilidade de transcritos; identificação de novos genes e rotas metabólicas associadas a processos biológicos e seus elementos regulatórios; caracterização da função de genes específicos e definição de padrões de expressão para predição de desempenho biológico (Kawasaki *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Em sequência ao estudo aqui apresentado, poderia-se estreitar a região cromossômica que está correlacionada com a resistência da semente ao dano durante o processamento a um intervalo que seja o menor possível, de maneira que sejam identificados poucos genes. A utilização desta ferramenta na análise de expressão diferencial dos genes a partir do início do processamento até os primeiros estágios da germinação, juntamente com estudos de longevidade de vigor da semente ("shelf life"), pode elucidar várias questões relacionadas aos mecanismos de expressão gênica envolvidos na qualidade de sementes de milho após seu processamento.

Conclusão

As evidências com base neste estudo indicam que a resistência das sementes de milho ao dano durante o processamento pode ser controlada por um modelo genético de epistasia dominante recessiva ou pelo modelo de dominância completa. Um QTL associado a esta característica foi identificado no cromossomo nove, região esta já conhecida como relacionada a aspectos de qualidade de sementes de milho. Estudos de expressão diferencial de genes localizados nesta região genômica, associados a análise de “shelf-life”, podem auxiliar no avanço da elucidação dos mecanismos genéticos relacionados à qualidade de sementes de milho no pós-processamento.

Referências

Ajayi SA, Rühl G and Greef JM (2005) Interrelations of seed quality, seedling establishment and early phenological stages in maize. *Land Völk* 55: 79-90.

Association of Official Seed Analysts (AOSA) (1983) Seed vigor testing handbook. East Lansing, 88 pp.

Austin D and Lee M (1996) Comparative mapping in F_{2:3} and F_{6:7} generations of quantitative trait *loci* for grain yield and yield components in maize. *Theor Appl Gen* 174: 817-826.

Beavis WD, Smith OS, Grant D and Fincher R (1994) Identification of quantitative trait *loci* using a small sample of top crossed and F4 progeny from maize. *Crop Sci* 34: 882-896.

Becraft PW, Li K, Dey N and Asuncion-Crabb Y (2002) The maize *dek1* gene functions in embryonic pattern formation and the cell fate specification. *Development* 129: 5217-5225.

Bernal-Lugo I and Leopold CL (1992) Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol* 98: 1207-1210.

Bernal-Lugo I, Camacho A and Carballo A (2000) Effects of seed ageing on the enzymatic antioxidant system of maize cultivars. In: Black M, Bradford KJ and Vásquez-Ramos J (ed) *Seed biology: advances and applications*. CAB International, Wallingford, pp 151-160.

Berjak P, Dini M and Gevers HO (1986) Deteriorative changes in maize embryo of long-stored, uninfected maize caryopses. *S Afr J Bot* 52: 109-116.

Bohn M, Khairallah MM, Jiang C, Gonzalez-De-Leon DA, Hoisington DA, Utz HF, Deutsch JA, Jewell DC, Mihm JA and Melchinger AE (1997) QTL mapping in tropical maize. 2. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. Crop Sci, 37: 1892-1902.

Bradshaw HD, Otto KG, Frewen BEK, Mckay JK and Schemske DW (1998) Quantitative trait *loci* affecting differences in floral morphology between two species of monkeyflower (*Mimulus*). Genetics 149: 367-382.

Bryman A and Cramer D (1997) Quantitative Data Analysis. Routledge, London.

Carneiro MS and Vieira MLC (2002) Mapas genéticos em plantas. Bragantia, 61: 89-100.

Consonni G, Gavazzi G and Dolfini S (2005) Genetic analysis as a tool to investigate the molecular mechanisms underlying seed development in maize. Ann Bot, 96: 353-362.

Coob BG and Hannah LC (1986) Sugar utilization by developing wild type and shrunken-2 maize kernels. Plant Physiol 80: 609-611.

Coolbear P (1995) Mechanisms of seed deterioration. In: Basra AS (ed) Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications. 9th edition The Haworth Press Inc., New York, pp. 223-277.

Cruz CD and Carneiro PCS (2003) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. UFV, Viçosa, 585pp.

Cui Y, Wu J, Shi C, Littell RC and Wu R (2006) Modelling epistatic effects of embryo and endosperm QTL on seed quality traits. Genet Res, 87: 61–71.

Doerge RW and Churchill GA (1996) Permutation test for multiple *loci* affecting a quantitative character. Genetics, 142: 285-294.

Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

Gardiner JM, Coe EH, Melia-Hancock S, Hoisington DA and Chao S (1993) Development of a Core RFLP Map in Maize Using an Immortalized F(2) Population. *Genetics* 134: 917-930.

Gomes MS (1999) Heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. Dissertação. Universidade de Lavras, Lavras.

Hazen SP, Hawley RM, Davis JL, Henrissat B and Walton JD (2003) Quantitative Trait *Loci* and Comparative Genomics of Cereal Cell Wall Composition. *Plant Physiol*, 132: 263-271.

Hunter BG, Beatty MK, Singletary GW, Hamaker BR, Dilkes BP, Larkins BA and Jung R (2002) Maize opaque endosperm mutations create extensive changes in patterns of gene expression. *The Plant Cell*, 14: 2591-2612.

Ibañez MA, Santandrea MJ, Kenny V, Bonamico MC, Faricelli ME and Di Renzo MA (2004) Biplot analysis of maize seed quality with mechanical damage. *Biocell*, 28: 369.

Kataki PK, Horbowicz M, Taylor AG and Obendorf RL (1997) Changes in sucrose, cyclitols and their galactosyl derivatives with seed ageing. In: Ellis RH, Black M, Murdoch MH and Hong TD (ed) *Basic and applied aspect of seed biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 515-522.

Kawasaki S, Borchert A, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D and Bohert H (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*, 13: 889-905.

Kirihara JA, Hunsperger JP, Mahoney WC and Messing JW (1988) Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize *Mol Genet*, 211: 477-484.

Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 12: 172-175.

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE and Newburg L (1987) Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174-181.

Laurie DA and Bennett MD (1985) Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*: intergeneric, interspecific and intraspecific variation. *Heredity*, 55: 307-313.

Lima MLA, Souza CL, Bento DAV, Souza AP and Carlini-Garcia LA (2006) Mapping QTL for grain yield and plant traits in a tropical maize population *Mol Breed*, 17: 227-239.

Liu BH (1998) *Statistical genomics*. CRC, New York.

Maier DE (2004) On-farm handling, storage, and quality. In: Smith CW, Betrán J and Runge ECA (ed) *Corn: origin, history, technology and production*. Wiley, Hoboken, pp. 827-866.

Moorw RP (1972) Effects of mechanical injuries on viability In: Roberts EH (ed) *Viability of seeds*. Chapman and Hall, London, pp. 94-113.

Negishi T, Nakanishi H, Yazaki J, Kishimoto N, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T and Kikuchi, S (2002) cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J*, 30: 83-94.

Nonogaki H (2006) Seed germination - the biochemical and molecular mechanisms. *Breed Sci*, 56: 93-105.

Ooijen JW and Voorrips RE (2001) Joinmap 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International B.*, Wageningen, 51 pp.

Paterson AH (1996) Making genetic maps. In: Paterson AH. *Genome mapping in plants*. RG Landes Company, Austin.

Pérez-Enciso M, Toro MA, Tenenhaus M and Gianola D (2003) Combining Gene Expression and Molecular Marker Information for Mapping Complex Trait Genes: A Simulation Study. *Genetics*, 164: 1597–1606.

Peterson JM, Perdomo JA and Burriss JS (1995) Influence of kernel position mechanical damage and controlled deterioration on estimates of hybrid maize seed quality. *Seed Sci Technol*, 23: 647-657.

Ramalho M, Santos JP and Pinto CB. *Genética na agropecuária* (1995). Globo, São Paulo, FAEPE, Lavras.

Salgado KCPC (2005) Mapeamento de QTLs associados à tolerância a alta temperatura de secagem em sementes de milho. *Dissertação*. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Silva N (2006) Controle genético de características associadas à qualidade de sementes em milho. *Dissertação*. Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Silva T <http://www.fpce.uc.pt/ensino/psi/ae1/texto2.pdf> (2004)

Sinniah UR, Ellis RH and John P (1998) Irrigation and seed quality development in rapid-cycling brassica: soluble carbohydrates and heat-stable proteins. *Ann Bot*, 82: 647-655.

Stuber CW, Edwards MD and Wendel JF (1987) Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait *loci* in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci*, 27: 639-648,.

Strickberger MW (1968) *Genetics*. Collier-McMillan, Toronto.

Wang S, Basten CJ and Zeng ZB (2000) *QTL Cartographer 2.5*. Windows. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh.

Wayne ML and McIntyre LM (2002) Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 14903–14906.

Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait *loci*. *Genetics*, 136: 1457-1466.

Zhu T, Budworth P, Chen W, Provar N, Chang H, Guimil S, Su W, Estes B, Zou G and Wang X (2003) Transcriptional control of nutrient partitioning during rice grain filling. *Plant Biotech J*, 1: 59-70.

Zhu T, Budworth P, Han B, Brown D, Chang HS, Zou G and Wang X (2001) Toward elucidating the global gene expression patterns of developing Arabidopsis: parallel analysis of 8300 genes by high-density oligonucleotide probe array. *Plant Physiol Biochem*, 39: 221-242.