

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

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA A GRÃOS ARDIDOS CAUSADOS
POR DIPLODIA (*Stenocarpella Sp.*) EM MILHO (*Zea Mays L.*)**

**Aluno: Humberto I Gutiérrez
Orientador: Prof. Dr. Heyder Diniz Silva**

**Uberlândia - MG
2008**

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

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA A GRÃOS ARDIDOS CAUSADOS
POR DIPLODIA (*Stenocarpella Sp.*) EM MILHO (*Zea Mays L.*)**

**Aluno: Humberto I Gutiérrez
Orientador: Prof. Dr. Heyder Diniz Silva**

**Tese apresentada a universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Biquímica**

**Uberlândia - MG
2008**

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G984m Gutiérrez, Humberto Ignacio, 1964-
Mapeamento de QTLs para resistência a grãos ardidos causados por
diploidia (*Stenocarpella Sp.*) em milho (*Zea Mays L.*) / Humberto I.
Gutiérrez. - 2008.
42 f. : il.

Orientador: Heyder Diniz Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-grama
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1.Milho - Melhoramento genético - Teses. I. Silva, Heyder Diniz.
II.Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 633.15:631.52

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

**MAPEAMENTO DE QTLs PARA RESISTÊNCIA A GRÃOS ARDIDOS CAUSADOS
POR DIPLODIA (*Stenocarpella Sp.*) EM MILHO (*Zea Mays L.*)**

Aluno: Humberto I Gutiérrez

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Heyder Diniz Silva (Orientador)

Examinadores:

Fernando Cesar Juliati

Renzo Garcia Von Pinho

Data da Defesa: 28/02/2008

As sugestões da Comissão Examinador e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Heyder Diniz Silva

***A Lourdes Pozar que fez de sua casa
minha casa***

Agradecimentos

Agradeço a minha empresa Monsanto pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal ao longo da minha carreira, e por me permitir fazer o que mais desfruto no mundo, que é trabalhar no melhoramento do milho para tentar ajudar na produção de alimentos que tanto necessitamos.

Agradeço em especial ao Ted Crosbie, Manuel Oyervides e Gustavo Lara pela oportunidade de vir ao Brasil e pelo estímulo a continuar meus estudos. A Manuel Oyervides também pela confiança sempre outorgada, pelos conselhos, pelas brincadeiras e por estar sempre presente e disposto a ajudar por sua incansável fortaleza e por essa qualidade de encontrar o melhor em cada pessoa.

Toda minha gratidão aos meus colegas do time de pesquisa da Monsanto, Gilberto Pozar, Marcelo Silveira, Justino Mario e Ivan Resende, pelo suporte providenciado, especialmente ao Antonio Carlos por ter compartilhado o projeto de pesquisa para o presente estudo, Sou grato também a todo o pessoal das fazendas de Uberlândia, Santa Helena e Barretos pelo suporte no trabalho de campo em especial ao Mario Dutra, Jose Reynaldo e Wagner Mello.

Ao pessoal docente da Pós-graduação de Genética e Bioquímica da UFU pelos ensinamentos recebidos, especialmente à professora Ana Maria Bonetti e aos professores Julio César Viglioni, Luiz Ricardo Goulart, Fernando Juliatti, e Foued Salmen Espindola. Agradeço também a meus amigos Cynara Rodovalho, Luciana de Oliveira, Renata Santos, Andréia Capaneli, Johara Boldrini, Fausto Capparelli e Vinicius Duarte por fazer mais agradável meu passo pela pós-graduação, e pela ajuda para trazer-me de volta ao espírito universitário.

Por fim gostaria agradecer ao meu orientador Heyder Dinis por ter me apresentado ao mundo dos marcadores moleculares, pelos ensinamentos recebidos e pela paciência no esclarecimento das dúvidas, muito obrigado.

Índice

1.	Apresentação	1
2.	Fundamentação Teórica	3
2.1.	Etiologia e Sintomatologia	3
2.2.	Associação com as sementes.....	4
2.3.	Capacidade de sobrevivência e forma de disseminação.....	5
2.4.	Importância Econômica.....	6
2.5.	Herança.....	6
2.6.	Marcadores moleculares.....	7
2.7.	Linhagens duplo-haplóides.....	8
3.	Referências bibliográficas.....	9
Capítulo Único		
1.	Resumo.....	15
2.	Abstract.....	16
3.	Introdução.....	17
4.	Materiais e Métodos.....	19
4.1.	Síntese da população segregante e protocolo de avaliação	19
4.2.	Inoculação artificial e avaliação do nível de resposta à Podridão de grão.....	20
4.3.	Avaliação do nível de podridões de grãos.....	20
4.4.	Análise de Variância.....	21
4.5.	Genótipagem, análise de ligação e mapeamento dos QTLs	22
5.	Resultados e Discussão.....	23
5.1.	Análise fenotípica.....	23
5.2.	Mapeamento de QTL's.....	27
6.	Agradecimentos.....	30
7.	Conclusões	30
8.	Referências Bibliográficas.....	31

Lista de Tabelas e Figuras.

F

- Figura 1. Distribuição de freqüências da porcentagem de incidência de podridão de Espiga causada por *Stenocarpella* (EDER) nas “*testcrosses*” resultado do cruzamento das progênies duplo-haplóides pelo testador susceptível MONDS5. 24

T

- Tabela 1. Estatísticas descritivas da incidência de grãos ardidos causados por *Stenocarpella sp* EDER nas 140 progênies duplo-haplóides para cada localidade e a traves dos ambientes avaliados na região central do Brasil durante a Safra agrícola 2005/06. 23
- Tabela 2. Correlação de Pearson entre localidades para os valores de podridão de grão por *Stenocarpella sp* avaliados na região central do Brasil durante a Safra agrícola 2005/06. 23
- Tabela 3 Resumo das Análises de variâncias individuais para Percentagem de Espigas com grãos ardidos por *Stenocarpella* (EDER) avaliadas durante a Safra Agrícola 2005/06. 25
- Tabela 4. Resumo da Análise de variância conjunta para Percentagem de Espigas com grãos ardidos por *Stenocarpella* (EDER) a traves de três localidades de avaliação no Brasil Central na Safra agrícola 2005/06. 26
- Tabela 5. Valores da incidência de podridão de espiga EDER para “*testcrosses*” selecionadas entre as progênies duplo-haplóides resultado do cruzamento entre MONDR1 (progenitor resistente) e MONDS1 (progenitor com nível intermediário de resistência) pelo testador susceptível MONDS5 em comparação com as testemunhas. 27
- Tabela 6: QTL e marcadores SNP associados à resistência a podridão de grão por *Stenocarpella* na população MONDR1/MONDS1 avaliada em três diferentes localidades na Região Central do Brasil durante a Safra agrícola 2005/06. 28

1. Apresentação

A cultura do milho (*Zea mays L.*), ocupa o segundo lugar em importância no Brasil, sendo cultivado em mais de 12 milhões de hectares, o que o coloca como o terceiro maior produtor do mundo, com uma produção anual de 42 M de toneladas, atrás só dos Estados Unidos e a China (IBGE, 2007 & Pingali, 2001). Entre os fatores que limitam a produtividade da cultura, quando comparado com países como os Estados Unidos, além do clima predominantemente tropical, está o fato da cultura estar presente praticamente ao longo do ano todo, o que em combinação com a prática do plantio direto, favorecem uma alta incidência de pragas e doenças em praticamente todas as regiões produtoras do país.

Com a expansão da cultura para áreas de maior altitude, a prática de plantio direto, o incremento nas densidades de plantio e outros fatores, as podridões de grão passaram a ganhar maior importância como um fator determinante na escolha dos híbridos por parte do agricultor, repercutindo de maneira imediata nos programas de melhoramento, tanto do setor público como das empresas privadas, já que na prática, a resistência genética é o método de controle mais efetivo, seguro e econômico que existe. No Brasil, os fungos dos gêneros *Stenocarpella sp*, *Fusarium sp* e *Gibberella sp* são os principais causadores das podridões do colmo e de grão.

As podridões de grão podem resultar em perdas diretas de produtividade estimadas em até 25-30% em cultivares altamente suscetíveis. Por outro lado, como a indústria que utiliza os grãos de milho como matéria prima para elaboração de rações tem-se preocupado com a qualidade de produto, sobre tudo com podridões de espiga, as quais originam os chamados grãos ardidos, incidências na faixa de 9-12% podem resultar em problemas severos na comercialização do grão, podendo resultar na sua não recepção no momento da venda.

A necessidade urgente de se desenvolver novas cultivares resistentes convergem uma grande parte dos recursos de melhoramento na identificação de fontes seguras e duradouras de resistência, no conhecimento da herança e seu

modo de ação, e também na disponibilidade de ambientes ou técnicas de inoculação que permitam a exposição do material genético a ser selecionado.

Embora existam técnicas de inoculação que facilitem a discriminação de materiais suscetíveis, o número de fontes que podem ser avaliadas requer grande quantidade de recursos, assim, o uso de marcadores moleculares deverá permitir *que Loci* para Caracteres Quantitativos (QTLs) associados à resistência possam ser manipulados de maneira rápida e precisa através de programas de seleção assistidos por marcadores. A revisão de literatura indicou um limitado número deste tipo de estudo focalizando germoplasma tropical, e um número menor ainda de estudos direcionados à identificação de QTLs associados à resistência a podridão de grãos.

Assim, os objetivos do presente estudo foram 1) Mapeamento genético da resistência à podridão de grãos causada por *Stenocarpella sp* mediante o uso de marcadores moleculares SNP (em Inglês: Single Nucleotide Polymorfism) utilizando um grupo de progênies duplo-haplóides, produto do cruzamento de progenitores contrastantes, para sua resposta à podridão de grão. 2) Identificação de QTLs (em Inglês: Quantitative Trait *Loci*) associados com esta resistência e 3) A identificação de fontes de resistência para a podridão de grão causada por *Stenocarpella sp* visando a sua incorporação em programas de melhoramento.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Etiologia e Sintomatologia

Os fungos *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo; *D. zae* (Schweinitz) Leveille] e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle] pertencem a Classe Ascomycetes e a Ordem Dothideales. Estas duas espécies apresentam no campo, somente a forma imperfeita ou assexuada, podendo causar podridão do colmo, da espiga e mancha foliar (Casa *et al.*, 2006).

As espigas infectadas apresentam tipicamente grãos marrons, de baixo peso e, em condições de alta umidade, há a formação de micélio branco entre as fileiras de grãos. O desenvolvimento da doença pode atingir parte da espiga ou toda ela, podendo iniciar-se pela base ou pela ponta da espiga. A presença de numerosas e pequenas estruturas negras, denominadas picnídios, nos grãos da espiga e nas palhas, caracteriza a presença desses patógenos (Janssen, 2006). As duas espécies podem ser diferenciadas com base na forma, tamanho, número de células e cor dos conídios, e pela coloração das colônias em meio de cultura ou em papel-de-filtro no “Blotter Test” (Mário & Reis, 2001).

Comumente, essas infecções precoces resultam em branqueamento e desenvolvimento do fungo entre as palhas, tornando as espigas leves e com palhas aderidas. Picnídios pretos podem ser formados sobre as palhas e no interior dos grãos. Espigas infectadas tardiamente não mostram sintomas externos, mas quando essas espigas são quebradas e os grãos são removidos, um mofo branco é normalmente encontrado desenvolvendo-se entre os grãos, e as extremidades dos grãos ligadas ao sabugo podem apresentar cor marrom ou preta. (Janssen 2006, Rossouw *et al.*, 2002a).

Na espiga, os sintomas se iniciam principalmente, na base da espiga logo após a fecundação. As brácteas da espiga tornam-se despigmentadas e de coloração parda. Quando a infecção ocorre duas semanas após a polinização, toda a espiga pode tornar-se podre, apresentando coloração pardo-cinza a esbranquiçada, enrugada

e leve, com as palhas internas fortemente aderidas umas às outras ou aos grãos devido ao crescimento do micélio do fungo. Os picnídios negros podem formar-se sobre a palha, brácteas florais, sabugo e grãos. Os grãos infectados apresentam cor cinza fosco a marrom. As espigas infectadas ao final do ciclo da cultura não mostram sintomas externos e, quando são despalhadas e os grãos assintomáticos removidos, o micélio branco pode ser visto crescendo entre os grãos remanescentes nas espigas. Alguns isolados de *S. maydis* induzem a viviparidade, ou seja, a germinação prematura dos grãos. Tanto no colmo como na espiga não é possível determinar se a infecção foi causada por *S. maydis* ou *S. macrospora* apenas com base nos sintomas (Casa *et al.*, 2006).

2.2. Associação com as sementes.

A associação de *S. maydis* e *S. macrospora* com as sementes de milho constitui importante fonte de inóculo primário para o surgimento de podridões de sementes, de raízes e morte de plântulas (Janssen, 2006), sendo, na maioria dos casos, responsável pela introdução dos fungos em novas áreas de cultivo, mesmo distantes de seu local de produção (www.eppo.org/quarantine). McDonald & Chapman (1997), em testes de sanidade com sementes provenientes de diferentes países, detectaram com frequência a presença dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*. Por sua parte, Mário *et al.*, (1998) determinaram que os esporos produzidos nos restos culturais foram responsáveis pela infecção de grãos de milho no campo.

Considera-se que a podridão de semente e a morte de plântulas causada por *Stenocarpella sp* tenham as sementes como a sua principal fonte de inóculo. Quando a semente é hidratada, ao entrar em contato com a água do solo, o micélio do fungo, que se encontra no endosperma ou no embrião, reassume sua atividade vital e passa a crescer do interior para à superfície da semente. Ao crescer sobre a semente, o fungo acaba alcançando as raízes e o coleóptilo das plantas, atingindo, pela colonização do coleóptilo, a superfície do solo (Janssen, 2006).

2.3. Capacidade de sobrevivência e forma de disseminação.

Esporos de *S. maydis* e *S. macrospora* podem sobreviver fora da época de cultivo do milho, na forma de micélio dormente ou picnídios, em tecidos necrosados na lavoura após a colheita, no interior das sementes e, ainda, colonizar raízes, colmos, bainhas foliares, palha da espiga, sabugo e grãos. *S. maydis* pode também sobreviver livre no solo, sob a forma de conídios ou de micélio dormente (Janssen, 2006)

Flett e colaboradores (2001) reportaram maiores níveis de infecção de *S. macrospora* e *S. maydis* em condições de monocultura de milho quando comparado a condições onde se tiveram rotação com uma outra cultura, sendo o trigo, a soja, e o amendoim as culturas mais efetivas na redução de incidência de *S. maydis*, seguidos do girassol, classificado como o menos efetivo. Eles reportaram também, uma relação linear positiva entre a disponibilidade de resíduos, quantidade de picnídios e podridão de espiga por *Stenocarpella sp.*

Como *S. maydis* e *S. macrospora* sobrevivem nos restos de cultura, o plantio de milho após infecção severa de podridão de espiga por *Stenocarpella sp.* pode resultar em reincidência severa da doença. Assim, em sistemas de plantio direto de milho sem a rotação de culturas, ocorre o aumento do potencial de inóculo destes patógenos na área de cultivo. O mesmo fato pode acontecer em áreas onde se pratica a sucessão de culturas, onde as culturas de milho estão sempre sujeitas à infecção da podridão branca da espiga (Casa *et al.*, 2006, Flett *et al.*, 2001).

Trento e colaboradores (2002), avaliaram o efeito dos sistemas de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho (*Zea mays*). A maior incidência de grãos ardidos, quantificada pela separação visual de grãos com sintomas de descoloração, ocorreu em monocultura, com média de 10%, enquanto sobre rotação de culturas esta incidência foi de apenas 4,8%. A incidência de grãos ardidos foi maior à medida que a densidade de plantas aumentou para os dois sistemas. Os principais fungos isolados dos grãos de

milho nos sistemas de rotação e monocultura foram *Cephalosporium spp.*, *Diplodia spp.*, *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme* e *F. subglutinans*.

2.4. Importância Econômica

A diplodia causada pelos fungos *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis* é uma doença do milho antiga no Brasil, conhecida por causar podridão em espigas. Hoje as duas espécies de *Stenocarpella* podem ser detectadas em todas as regiões produtoras de milho causando sintomas de podridão do colmo de diplodia, podridão branca da espiga e mancha de macrospora em folhas (Casa *et al.*, 2006). A podridão branca da espiga causada por *Stenocarpella maydis* normalmente é mais severa em regiões com altitudes acima de 700m, temperaturas moderadas e, principalmente, ambiente úmido. Já a ocorrência da doença incitada por *S. macrospora* é mais comum em regiões quentes, abaixo de 500m, e em ambientes úmidos (Jenssen, 2006), podendo ocorrer acima de 500m desde que tenha adensamento e fonte de inóculo (Mario e Juliatti, 2008 comunicação pessoal).

Além dos danos físicos, expressos por descoloração (grãos ardidos), esses fungos causam também danos nutricionais nos grãos, o que se confirma pela redução dos teores de carboidratos, proteínas, aminoácidos, açúcares totais e cinzas; Também foram identificados danos químicos relacionados com a síntese de micotoxinas, uma vez que o fungo *Stenocarpella macrospora* produz a toxina diplodiol (Cutler *et al.*, 1980), e *Stenocarpella maydis* produz diplodiatoxina, as quais são tóxicas para aves e bovinos. Atualmente, os grãos ardidos por *Stenocarpella sp* constituem um dos principais problemas de qualidade do milho devido à possibilidade da presença destas micotoxinas. (Janssen, 2006).

2.5. Herança

Trabalhos sobre a herança genética da resistência para podridões de grãos são escassos, com reporte de herança aditiva por Koehler em 1959, até parcialmente dominante (Wiser *et al.*, 1960), já o uso de inoculação artificial indicou haver uma

herança genética quantitativa (Dorrance *et al.*, 1998, Olatinwo *et al.*, 1999, e Rossouw *et al.*, 2002b)

Dorrance *et al.* (1998), num estudo dialélico composto de nove linhagens progenitores com diferente nível de resposta a podridão de grão por *Diplodia*, encontraram os efeitos da capacidade geral de combinação (GCA) como sendo de maior importância ao longo de anos quando comparado aos efeitos de capacidade específica (SCA), que se mostraram inconsistentes, os mesmos autores reportaram também a ausência de efeitos recíprocos. Na mesma linha, Olatinwo *et al.* (1999), baseados na avaliação de seis diferentes parâmetros do nível de resistência a podridão para cada geração resultante do cruzamento arbitrário de cinco diferentes progenitores (P1, P2, F1, BC1, BC2 e F2), reportaram efeitos significativos para GCA e SCA ao nível de 5% e 1% respectivamente, sendo estes relativamente dependentes dos materiais envolvidos nas avaliações.

Rossouw *et al.* (2002b), reportaram que a resistência contra *Diplodia* apresenta efeitos significativos de interação genótipo X ambiente, concluindo a necessidade de conduzir avaliações numa ampla gama de ambientes.

Para identificar de maneira mais precisa germoplasma resistente, necessita-se utilizar métodos de inoculação artificiais (Del Rio, 1991; Klapproth & Hawk, 1991; Bensch *et al.*, 1992a; Bensch, 1995b). Assim, conforme relatado por Mário (1998), estes deveriam ser os mais semelhantes possíveis à infecção natural, devendo fornecer também dados consistentes através de anos e localidades, possibilitando, assim, a distinção entre materiais resistentes e suscetíveis.

2.6. Marcadores moleculares

Recentemente, marcadores moleculares também têm sido usados para o mapeamento de QTLs de resistência (Agrama *et al.* 1999; Brown *et al.* 2001; Lubberstedt *et al.* 1998; Pé, M.E. *et al.* 1993; Perez Brito *et al.*, 2001, Liaket *et al.*, 2005, Leilani *et al.*, 2006). Quando revisados isoladamente, estes estudos parecem

estar longe de resultados conclusivos, já que mostram pouca concordância tanto quanto ao número quanto na localização dos QTLs.

Wisser e colaboradores publicaram em 2006 um artigo, compilando resultados da análise de 50 estudos de mapeamento QTL's para resistência a diversas doenças no milho. Nesse estudo, os autores desenvolveram um mapa consenso incluindo a posição dos diferentes QTLs reportados para cada cromossomo, conseguindo assim identificar a presença de conjuntos ou "clusters" de dQTL's (em inglês, *disease Quantitative Trait Loci*) para múltiplas doenças. Esses autores reportaram também a existência de alguns dQTL's novos.

2.7. Linhagens duplo-haplóides.

O mapeamento genético baseado na utilização de linhagens duplo-haplóides tem sido relatado em cevada e arroz (ZiChao, 2005), porém sua utilização no cultivo de milho tem sido escassa, devido principalmente às limitações práticas para a produção consistente de um número de indivíduos adequado por parte dos programas de melhoramento. Esta alternativa, porém, reúne as vantagens do delineamento de linhagens puras recombinantes com o maior poder de detecção do delineamento de retrocruzamento.

3. Referências bibliográficas

- AGRAMA, H.A., M.E. MOUSSA, M.E. NASER, M.A. TAREK and A.H. IBRAHIM (1999). Mapping of QTL for downy mildew resistance in maize. TAG 99(3-4): 519-523.
- BENSCH, M.J. VAN STADEN, J. & RIJKENBERG, F.G. (1992a). Time and Site of inoculation of Maiz for optimum infection of Ears by *Stenocarpella maydis*. Journal Phytopathology, 136: 265-269.
- BENSCH, M.J. *Stenocarpella maydis* (Berk). Sutton colonization of maize ears. Journal of Phytopathology 143:597-599. 1995b.
- BROWN, A. F., J. A. JUVIK, *et al.* (2001). "Quantitative trait loci in sweet corn associated with partial resistance to Stewart's wilt, northern corn leaf blight, and common rust." Phytopathology 91(3): 293-300.
- CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. 2006. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. Fitopatologia Brasileira 31:427-439. 2006.
- CUTLER, H.G; CRUMLEY, F.G; COX, R.H; COLE, R.J; DORNER, J.W; LATTERELL, F.M; ROSSI, A.E. 1980 Diplodiol: a new toxin from *Diplodia macrospora*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. V. 28, p. 135-138. 1980.
- DEL RIO, L. ZUNIGA, T. & TORRES, J. Evaluation de métodos e fechas de inoculation de *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton a diferentes concentraciones. Ceiba,32:151-160. 1991
- DORRANCE, A.E., HINKELMANN, K.H. & WARREN, H.L.,1998. Diallel analysis of diplodia ear rot resistance in maize. Plant Dis. 82, 699-703.
- FLETT, B. C., MCLAREN, N. W., AND WEHNER, F. C. 2001. Incidence of *Stenocarpella maydis* ear rot of corn under crop rotation systems. Plant Dis. 85:92-94.
- JANSSEN DE ALMEIDA PINTO, N.F. 2006 Podridão Branca da Espiga de milho. Comunicado Técnico No. 141 EMBRAPA.

- IBGE. Sítio da Internet do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística no endereço <http://web.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria>
- KOEHLER, B., 1959. Maize ear rots in Illinois. Univ. Ill. Agric. Exp. Sta. Bull. 658, University of Illinois, Illinois, USA. 87pp. \
- KLAPPROTH, J.C. & HAWK, J. A. (1991). Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. Plant Diseases 75:1057-1060.
- LANDER, J. B., B.S. WEIR AND Z.-B. ZENG. 2002. QTL Cartographer, Version 1.16. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- LEILANI, A.R, JINES, M.P., BALINT, P.J., KLEINSCHMIDT D.G., PAYNE, G.A., MARAGOS, C.M., MOLNAR, T.L., HOLLAND, J.B. (2006) QTL Mapping for *Fusarium* and Fumonisin Contamination Resistance in two Maize Populations Crop Sci. 46:1734-1743
- LIAKET, M., TAYLOR J.H, JIE, L. SUN, G., WILLIAM, M. KASHA, K.J., REID, L.M., PAULS, K.P. Molecular Mapping of QTLs for resistance to *Gibberella ear rot*, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. NRC Research Press Web site at <http://genome.nrc.ca> (2005)
- LI ZICHAO, L. Ping, M., CHUNPING, L. HONGLIANG, Z., ZHIKANG, L., YONG MING, G., XIANGKUN, W. QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments. TAG Theoretical and Applied Genetics, 2005 (Vol. 110) (No. 7) 1244-1252
- LUBBERSTEDT, T., D. KLEIN, *et al.* (1998). Comparative QTL mapping of resistance to *Ustilago maydis* across four populations of European flint-maize. TAG 97(8): 1321-1330.
- MACDONALD, M. V., CHAPMAN, R. The incidence of *Fusarium moniliforme* on maize from Central America, Africa and Asia during 1992-1995. Plant Pathology, Volume 46, Number 1, February 1997 , pp. 112-125(14)
- MARIO, J.L. Comparação de métodos de inoculação de *Diplodia maydis* em espigas de milho e reação de híbridos em condições de infecção natural de D.

- macrospora. 1998: 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1998.
- MARIO, J.L. & REIS, E.M. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. *Fitopatologia Brasileira*, 1998
- MARIO, J.L. & REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. *Fitopatologia Brasileira* 26:670-672. 2001.
- OLATINWO R., CARDWELL K., MENKIR A., DEADMAN M. and JULIAN A. 1999. Inheritance of resistance to *Stenocarpella macrospora* (Earle) ear rot of maize in the mid-altitude zone of Nigeria. *European Journal of Plant Pathology* 105: 535–543, 1999.
- PÉ, M.E. *et al.* 1993 Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize. *Mol Gen Genet* (1993) 241: 11-16.
- PEREZ-BRITO D., JEFFERS D., GONZALEZ D, KHAIRALLAH, M., CORTEZ C.M., VELAZQUEZ G.C. AZPIROZ S.R., SRINIVASAN, G. (2001). QTL mapping of *Fusarium moniliforme* Ear Rot Resistance in Highland Maize, Mexico. *Agrociencia* 35:181-196
- PINGALI, P.L. (ed.). 2001. CIMMYT 1999–2000 World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize Needs: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector. Mexico, D.F.: CIMMYT
- ROSSOUW, JD, VAN RENSBURG J.B.J & VAN DEVENTER, C.S. 2002a. Breeding for resistance to ear rot of maize, caused by *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton. 1. Evaluation of selection criteria. *S.Afr Journal of Plant and Soil* 19(4) p.182-187
- ROSSOUW, JD, VAN RENSBURG J.B.J & VAN DEVENTER, C.S. 2002b. Breeding for resistance to ear rot of maize, caused by *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton. 2. Inheritance of Resistance. *S.Afr Journal of Plant and Soil* 19(4) p.188-194

- TRENTO, S.M., IRGANG, H. & REIS, E.M. Efeito de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. *Fitopatologia Brasileira* 27:609-613. 2002.
- WISSER, R.J., BALINT P.J., and NELSON, R.J. 2006. The Genetic Architecture of Disease Resistance in Maize: A Synthesis of Published Studies. *Phytopathology* 96:120-129 (2006)
- WISER, W.J., KRAMER, H.H. & ULLSTRUP, A.J., 1960. Evaluating inbred lines of maize for resistance to *Diplodia* ear rot. *Agric. J.* 11, 624-626.

Capítulo Único

**Mapeamento de QTL's para Resistência a Grãos Ardidos causados por Diplodia
(*Stenocarpella Sp.*) em Milho (*Zea Mays L.*)**

**Mapeamento de QTL's para Resistência a Grãos Ardidos causados por Diplodia
(*Stenocarpella Sp.*) em Milho (*Zea Mays L.*)**

Humberto Gutierrez ^{1*}, Heyder Diniz Silva², Justino Mario²

¹ Monsanto Company, 3302 S.E. Convenience Blvd, Ankeny, IA, USA

² Monsanto do Brasil Ltda, Rod. BR452 – Km 7. Uberlândia MG, Brasil

1 * Autor: Humberto Gutierrez (humberto.gutierrez@monsanto.com)
Telefone: +1 (515).965.3015

Palavras chave: *Loci* para caracteres quantitativos (QTL), Duplo-haplóide (DH), Mapeamento de QTL's.

RESUMO

Grãos ardidos causados pelos fungos *Stenocarpella maydis* (Berkeley) e *Stenocarpella macrospora* (Earle) tem se constituído num dos maiores fatores limitantes para a produção de milho (*Zea mays* L.) no Brasil. Estes fungos podem causar infecções no colmo, folhas e grãos, podendo ocasionar reduções significativas na produtividade e na qualidade do grão, pela produção de micotoxinas daninhas para aves e bovinos. A resistência para podridão de grão por *Stenocarpella sp* apresenta herança quantitativa e pode ser altamente influenciada pelo meio ambiente, e embora existam técnicas de inoculação que facilitam a discriminação de materiais suscetíveis, isto requer de grande quantidade de recursos. O objetivo do presente trabalho foi a identificação de locos de caracteres quantitativos (QTL) associados à resistência para podridão de grãos (“grãos ardidos”) ocasionados por *Stenocarpella sp* numa população de 141 progênies duplo-haplóides derivadas do cruzamento entre a linhagem resistente MONDR1 e a linhagem susceptível MONDS1 em “testcross” com o testador susceptível MONDS5. A porcentagem de espigas infectadas por *Stenocarpella sp* foi registrada para cada uma das “testcrosses” após da inoculação artificial em três localidades na região Central de Brasil durante a Safra agrícola 2005/06. Mediante a análise de mapeamento por intervalo composto foram identificados três QTL’s com $LOD > 2.5$ para resistência à grãos ardidos nos cromossomos 2, 3 e 5, sendo estes em conjunto, responsáveis por até 26% de variação fenotípica para este caráter. A identificação de dois QTL’s para resistência a grãos ardidos por *Stenocarpella sp* com origem no progenitor susceptível parece indicar a presença do fenômeno de segregação transgressiva. Adicionalmente foram identificadas seis progênies duplo-haplóides com alto nível de resistência a grãos ardidos (MDH15, MDH443, MDH95, MDH2, MDH120 e MDH81), sendo estas recomendadas para sua incorporação no programa de melhoramento para a região central do Brasil.

Palavras chave: Loci para caracteres quantitativos (QTL), Duplo-haplóide (DH), Mapeamento de QTL’s.

ABSTRACT

Diplodia ear rot caused by the fungus *Stenocarpella maydis* (Berkeley) and *Stenocarpella macrospora* (Earle) have become one of the most important limiting factors for the production of Corn (*Zea mays* L.) in Brazil. The fungus can attack the stalks, leaves and the grain causing significant reductions on yield and the overall quality of the grain, since it can produce micotoxinas that are dangerous to livestock. Resistance to ear rot by *Stenocarpella* sp in corn is quantitative and highly influenced by the environment and even that artificial inoculation techniques are available to screen for the disease the overall cost is very expensive. The objective of this study was the identification of quantitative trait loci (QTL's) associated with ear rot resistance by *Stenocarpella* sp in one breeding population composed of 141 double-haploid progenies resulted from the cross among the resistant inbred MONDR1 and the susceptible inbred MONDS1 in testcrosses with the susceptible tester MONDS5. Testcrosses were evaluated at harvest time after artificial inoculation for ear rot at three different locations in the central region of Brazil during the 2005/06 summer season. Thru Composite interval mapping (CIM), a total of three QTL's (LOD>2.5) for ear rot resistance were identified at chromosomes 2, 3 and 5, all together accounting for up 26% of total phenotypic variation for this character. The identification of two QTL's for ear rot resistance coming from the susceptible parent MONDS1 appear to indicate the presence of the phenomena of transgressive segregation. Additionally we were able to identify six double-haploid progenies with high level of resistance to ear rot by *Stenocarpella* (MDH15, MDH443, MDH95, MDH2, MDH120 e MDH81), being those recommended for their incorporation into the breeding program as new breeding sources for the Central Brazil regions.

Key words: Quantitative Trait Loci (QTL), double-haploid (DH), QTL' mapping, SNP (Single Nucleotide Polymorfism)

3. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays L.*), ocupa o segundo lugar em importância no Brasil sendo cultivado em mais de 12 milhões de hectares com uma produção anual de 42 M de toneladas (<http://web.ibge.gov.br>).

Vários fatores contribuem para a limitação na produtividade brasileira, quando comparada com países de clima temperado como os Estados Unidos. Dentre esses fatores podemos destacar o clima predominantemente tropical, a ausência de rotação de culturas, a presença da cultura ao longo do ano todo em algumas regiões, e o plantio direto, entre outras. Estes fatores favorecem uma alta incidência de pragas e doenças praticamente em todas as regiões produtoras do país (Del Rio, & Zuniga 1991, Rezende *et al.*, 1994). Doenças foliares como a mancha de *Phaeosphaeria*, a ferrugem tropical causada por *P. polysora* e a ferrugem comum, causada por *P. sorghi*, a Helmintosporiose, e os enfezamentos pálido e vermelho estão entre as principais doenças foliares da cultura do milho em todo o Brasil. Do mesmo modo, fungos dos gêneros *Stenocarpella*, *Fusarium* e *Gibberella* são os principais causadores das podridões de colmo e espiga (Pereira 1995).

No Brasil, a podridão branca da espiga causada por *Stenocarpella sp* está presente praticamente em todas as regiões produtoras de milho, sendo *S. maydis* severa em regiões com altitudes acima de 700m e temperaturas moderadas e *S. macrospora* mais comum em regiões de menor altitude. Estas duas espécies apresentam no campo, somente a forma imperfeita ou assexuada, e podem causar podridão do colmo, da espiga e mancha foliar (Casa *et al.*, 2006).

Na espiga, os sintomas iniciam-se principalmente em sua base, logo após a fecundação e quando a infecção ocorre até duas semanas após a polinização, toda a espiga pode tornar-se podre, apresentando coloração pardo-cinza a esbranquiçada. Os grãos infectados apresentam cor de cinza fosco a marrom e picnídios negros podem formar-se sobre a palha, brácteas florais, sabugo e grãos.

As espigas infectadas ao final do ciclo da cultura não mostram sintomas externos, somente quando despalhadas e os grãos assintomáticos removidos, o micélio branco pode ser visto crescendo entre os grãos remanescentes nas espigas. Tanto no colmo como na espiga não

é possível determinar se a infecção foi causada por *S. maydis* ou *S. macrospora* apenas com base nos sintomas (Casa *et al.*, 2006, Janssen, 2006).

Flett *et al.*, (2001) reportaram maior de incidência de *S. macrospora* e *S. maydis* em condições de monocultura de milho quando comparado com aquelas condições onde se tiveram rotação com uma outra cultura, sendo o trigo, a soja, e o amendoim as culturas mais efetivas na redução de incidência. Eles reportaram também uma relação linear positiva entre a disponibilidade de resíduos, quantidade de picnídios e podridão de espiga por *Stenocarpella sp.*

Trabalhos sobre a herança genética da resistência para podridões de grãos por *Stenocarpella sp* são relativamente escassos. Dorrance *et al.*, (1998) demonstraram que os efeitos da capacidade geral de combinação (GCA) são de maior importância quando comparado aos efeitos de capacidade específica de combinação (SCA). Estes resultados foram posteriormente suportados em estudos realizados por Olatinwo *et al.*, (1999) e Rossow *et al.*, (2002). Este último reportou também que a resistência contra *Stenocarpella sp* apresenta efeitos significativos de interação genótipo por médio ambiente concluindo a necessidade de conduzir avaliações numa ampla gama de ambientes.

Embora existam técnicas de inoculação que facilitem a discriminação de materiais suscetíveis, o número de fontes que podem ser avaliadas requer grande quantidade de recursos (Mario & Reis, 1998).

Assim, o uso de marcadores moleculares deverá permitir que QTL's associados à resistência possam ser manipulados de maneira rápida e precisa, através de programas de seleção assistida por marcadores. Porém, conforme ao extensivo resumo apresentado por Wisser *et al.*, (2005) não existem estudos publicados relatando a existência de QTL's para resistência a podridão de grão por *Stenocarpella sp.*

O objetivo principal do presente estudo foi o mapeamento genético da resistência à podridão de grãos causada por *Stenocarpella sp* mediante o uso de marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polymorfism), utilizando uma população de progênies duplo-haplóides produto do cruzamento de progenitores contrastantes para sua resposta à podridão de grãos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese da população segregante e protocolo de avaliação.

A população base do presente estudo resultou do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas contrastantes para sua reação à podridão de grão por *Stenocarpella sp.*, MONDR1 (resistente) e MONDS1 (susceptível). Com o intuito de incrementar o poder de identificação da ligação dos QTL's, cento e quarenta progênies duplo-haplóides foram geradas mediante uso de um indutor de frequência de haploidismo em combinação com o posterior tratamento de colchicina para duplicação de seus cromossomos. Estas progênies foram cruzadas com uma linhagem testadora susceptível (MONDS5) e não relacionada aos parentais da população testada para gerar igual número de cruzamentos de prova ou “*testcrosses*”.

Os “*testcrosses*” foram avaliados durante a safra agrícola de 2005/06 na região central do Brasil em três diferentes ambientes nos estados de São Paulo na localidade de Pirassununga, Minas Gerais na fazenda experimental da Monsanto em Uberlândia e Distrito Federal perto da cidade de Brasília (Tabela A1). Para a seleção destes ambientes, foram considerados principalmente os históricos de incidência de podridão de grão dentro do programa de pesquisa da Monsanto, o uso de plantio direto por ciclos consecutivos como prática comum e o nível de produtividade como sendo representativo de regiões amostradas.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com duas repetições por ambiente. A unidade experimental consistiu-se de duas linhas de 5 metros e 80 cm entre linhas, a densidade de população utilizada foi de 70,000 plantas por hectare em Pirassununga, 60,000 em Uberlândia e de 62,500 em Brasília. O plantio foi realizado mecanicamente e a colheita foi realizada de maneira manual para facilitar as estimações de podridão de grão na espiga antes da debulha do grão. A fórmula de adubação utilizada foi de 185-80-100 kg ha⁻¹ de N-P-K em duas aplicações, a primeira ao momento da semeadura na qual foram aplicadas 50-80-100 kg ha⁻¹ de N-P-K e o restante do nitrogênio 30 dias após do plantio. Para o controle de plantas daninhas se utilizou uma dose de 3 L ha⁻¹ da mistura dos herbicidas atrazina (200 g L⁻¹) e metalachlor (200 g L⁻¹).

Os caracteres coletados foram população final, florescimento feminino (dias), produção de grãos (ton/ha) e teor de umidade (%) ao momento da colheita e número de espigas infetadas por podridão de grãos por *Stenocarpella sp* e *Fusarium sp*.

4.2. **Inoculação e avaliação do nível de resposta à podridão de grão.**

O método de inoculação por deposição foi utilizado para a inoculação dos patógenos. Utilizou-se uma mistura de isolados de *Stenocarpella sp* e *Fusarium sp*, cujo inóculo foi aumentado em grãos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], em frascos Erlenmeyers de 500 ml de volume. A inoculação por deposição consiste em depositar uma suspensão de esporos no interior da bainha foliar na parte posterior da espiga acima do pedúnculo, com o auxílio de uma seringa dosadora automática, depositando-se 5 mililitros por espiga de uma suspensão com 4×10^4 conídios ml⁻¹ de dez a quinze dias após ter atingido o 100% da floração feminina conforme descrito por Mario (1998).

Esse método, além da praticidade e eficiência, mostra-se pouco influenciado pelas oscilações climáticas quando comparado com a infestação natural ou com o método de inoculação por aspersão, permitindo distinguir as diferenças entre os genótipos, suscetíveis e resistentes em relação à podridão branca da base da espiga de milho, causada por *Stenocarpella sp*. Pois simula o modo de infecção natural, sem causar injúrias que inviabilizem a seleção, como no caso da inoculação por palito-de-dente (Silva, 2005 e Mario, 1998).

4.3. **Avaliação do nível de infecção pelos patógenos.**

Os “testcrosses” foram colhidos manualmente e submetidos à secagem até atingirem umidade entre 18 e 24%, quando então foi realizada a avaliação das doenças. Posteriormente as espigas foram separadas segundo o tipo de dano predominante. Foram então classificadas em três categorias: 1) espiga não infectada; 2) espiga com incidência de *Stenocarpella sp*; 3) espiga com incidência de *Fusarium sp*, visando obter-se o nível de infecção para cada doença expresso em porcentagem por tratamento i.e porcentagem de espigas com infecção de *Stenocarpella sp* (EDER) e porcentagem de espigas com infecção de *Fusarium sp* (EFUS), para esta última os dados não foram apresentados.

4.4. Análise de Variância

A distribuição e caracterização da ocorrência de grãos ardidos na população em estudo foram avaliadas por meio de estatísticas descritivas e histogramas. Para estimação da infecção média de grãos ardidos e parâmetros genéticos associados a esta e outras características em cada localidade, adotou-se o modelo de análise em blocos casualizados completos:

$$y_{ij} = \mu + b_j + t_i + e_{ij};$$

em que:

y_{ij} é o valor observado na repetição j do “*testcross*” i ;

μ é uma constante inerente a todas as observações

b_j é o efeito aleatório do bloco j , $b_j \sim N(0, \sigma_b^2)$

t_i é o efeito do “*testcross*” i $t_i \sim N(0, \sigma_g^2)$;

e_{ij} é o erro aleatório associado à observação y_{ij} , $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Os componentes de variância genética, residual e fenotípica foram estimadas pelo método dos momentos, pela solução das equações obtidas igualando-se as esperanças matemáticas dos quadrados médios da análise de variância aos seus valores observados, sendo estes determinados por:

$$\text{Componente de variância genética: } \hat{\sigma}_g^2 = \frac{QM_{Gen\acute{o}tipos} - QM_{Re\acute{s}iduo}}{r};$$

$$\text{Componente de variância residual: } \hat{\sigma}^2 = QM_{Re\acute{s}iduo};$$

$$\text{Componente de variância fenotípica: } \hat{\sigma}_f^2 = \hat{\sigma}_g^2 + \frac{\hat{\sigma}^2}{r};$$

$$\text{Herdabilidade: } \hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2};$$

Para análise conjunta (três ambientes) adotou-se o seguinte modelo:

$$y_{ij(k)} = \mu + l_k + b \mid l_{j(k)} + t_i + tl_{ki} = e_{ij(k)};$$

em que:

$y_{ij(k)}$ é o valor observado na repetição j do “*testcross*” i no local k ;

μ é uma constante inerente a todas as observações

l_k é o efeito do local k ;

$b|l_{j(k)}$ é o efeito aleatório do bloco j , dentro do local k $b_{j(k)} \sim N(0, \sigma_b^2)$

t_i é o efeito do “*testcross*” i ;

tl_{ik} é o efeito da interação entre “*testcross*” i e o local k ;

e_{ij} é o erro aleatório associado à observação y_{ij} , $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

4.5. Genótipagem, análise de ligação e mapeamento dos QTLs.

Com propósito de fazer o mapeamento genético das progênes duplo-haplóides (DH), paralelo à avaliação das “*testcrosses*”, uma amostra de tecido foliar de 15 plantas de cada progênie foi coletada, liofilizada e enviada ao laboratório molecular da Monsanto localizado na localidade de Ankeny, Iowa nos Estados Unidos para realizar a extração, isolamento e fenotipagem do DNA.

Um total de 106 diferentes marcadores moleculares do tipo SNP (Single Nucleotide Polimorfism) foram utilizados cobrindo os 10 cromossomos do milho e distribuídos em números de 15, 12, 12, 12, 11, 9, 10, 8, 9 e 8 entre os cromossomos 1 e 10 respectivamente, sendo os “primers” utilizados todos da propriedade da Monsanto Company. A posição dos marcadores e o mapa de ligação foram construídos com base no mapa consenso da Monsanto Company.

Para o mapeamento de QTL’s utilizou-se do método de mapeamento por intervalo composto (CIM – Composit Interval Mapping), Zeng (1994).

As análises foram realizadas no programa QTL CARTOGRAPHER versão 2.0 da North Carolina State University, USA (Basten alii, 2002) usando o modelo para uma população DH, assumindo como limiar de significância com valor para o LOD >2.5 . LOD é o logaritmo de odds o qual é igual ao logaritmo da razão de verossimilhança.

O mapeamento de QTL’s foi realizado para cada local individualmente e na média dos três ambientes.

5. Resultados e Discussão.

5.1. Análise fenotípica

Os valores observados para porcentagem de infecção de podridão de espigas, causada por *Sternocarpella sp* (EDER), variaram de 0 a 60% nas localidades individuais e de 2.9 a 35.6% na análise de médias conjunta. A localidade de Pirassununga apresentou o menor nível de infecção de grãos ardidos (EDER) com uma média de 7.5%. Uberlândia e Brasília apresentaram medias similares com valores de 14 e 14.1% respectivamente, embora a localidade de Brasília tenha apresentado maior intervalo com valores variando de 0 a 60%. (Tabela 1).

Tabela 1. Estatísticas descritivas da incidência de grãos ardidos causados por *Stenocarpella sp* EDER nas 140 progênies duplo-haplóides para cada localidade e a traves dos ambientes avaliados na região central do Brasil durante a Safra agrícola 2005/06.

Localidade	Media	Intervalo		SD
		Min	Max	
Pirassununga	7.5	0.0	22.5	4.49
Uberlândia	14.0	2.6	34.4	6.20
Brasília	14.1	0.0	60.6	10.68
Conjunta	11.9	2.9	35.6	5.58

SD = Desvio padrão

A correlação entre as localidades para os valores de infecção para EDER foi pequena, apresentando seu valor maior entre as localidades de Uberlândia e Brasília com um valor de 0.44 (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação de Pearson entre localidades para os valores de podridão de grão por *Stenocarpella sp* avaliados na região central do Brasil durante a Safra agrícola 2005/06.

	<i>Brasília</i>	<i>Pirassununga</i>	<i>Uberlândia</i>
Brasília	1.00		
Pirassunur	0.30	1.00	
Uberlandia	0.44	0.37	1.00

Os valores das porcentagens de infecção para podridão por *Stenocarpella sp* mostraram distribuição contínua conforme apresentado na Figura 1, indicando a possibilidade de que a resistência para este caráter esteja condicionada por mais de um *locus*. Esses resultados são consistentes com estudos previamente realizados que reportaram a natureza multigênica da resistência para podridão de grão por *Stenocarpella sp* (Dorrance *et al.*, 1998, Olatinwo *et al.*, 1999 e Russou *et al.*, 2002).

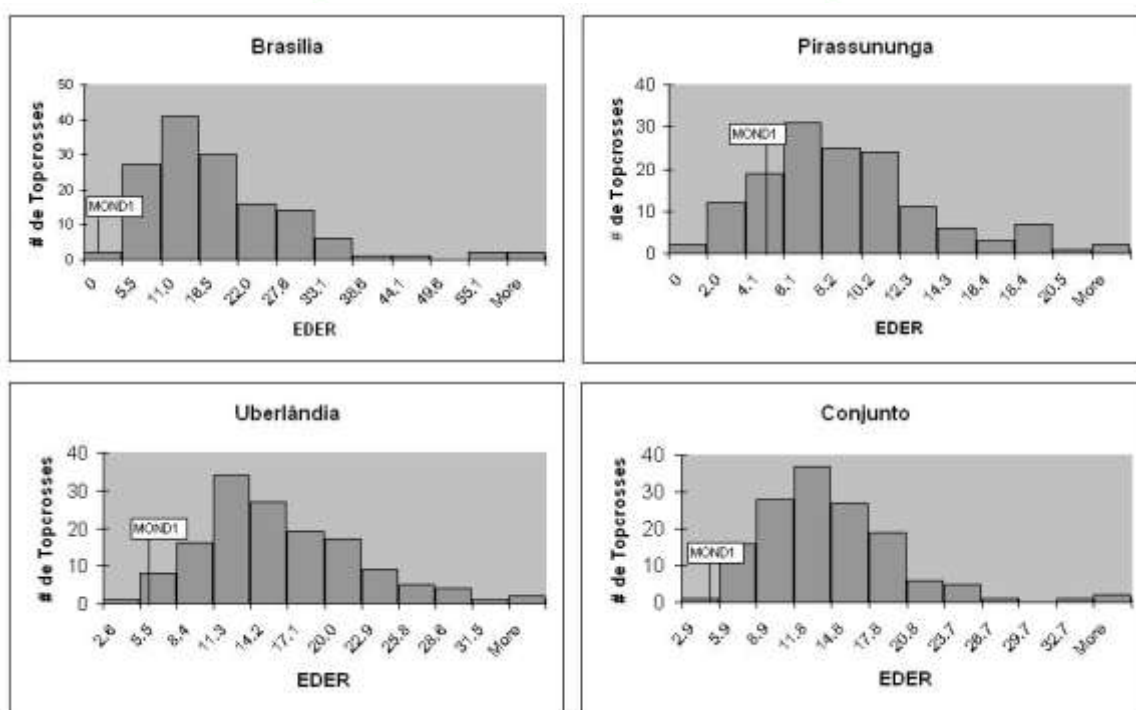


Figura 1. Distribuição de freqüências da porcentagem de incidência de podridão de Espiga causada por *Stenocarpella* (EDER) nas “testcrosses” resultado do cruzamento das progênies duplo-haplóides pelo testador susceptível MONDS5.

Observa-se no quadro de análise de variância (Tabela 3) diferenças significativas para o efeito de “testcrosses” (progênies), o que indica a existência de variância genética significativamente positiva entre estas progênies derivadas do cruzamento MONDR1 por MONDS1, e avaliadas em “testcrosses”, para a incidência de podridão de espiga EDER em todas as localidades consideradas.

Os coeficientes de herdabilidade para EDER variaram de 0,32 em Uberlândia a 0,57 em Brasília. Assim pode-se concluir que das três localidades avaliadas, Brasília foi a que

apresentou melhores resultados para a seleção resultando numa melhor discriminação entre as progênies.

Tabela 3 Resumo das Análises de variâncias individuais para Percentagem de Espigas com grãos ardidos por *Stenocarpella* (EDER) avaliadas durante a Safra Agrícola 2005/06.

FV	GL	QM		
		Pirassununga	Uberlândia	Brasília
Rep	1	8.99	8.75	393.32
“ <i>Testcrosses</i> ”	140	40.43**	74.01*	226.14**
Resíduo	143	19.95	55.85	96.83
Média		7.5%	13.9%	14.1%
CV%		59%	54%	71%
$\hat{\sigma}_g^2$		10.24	9.08	64.65
$\hat{\sigma}_f^2$		20.21	27.92	113.07
$\hat{h}^2$		0.50	0.32	0.57

Observando o resultado da análise de variância conjunta, o qual está apresentado na Tabela 4, verifica-se que o efeito médio de progênies também foi significativo, o que possibilita a seleção de materiais com base em sua performance média através dos ambientes. Contudo houve uma interação significativa entre “*testcrosses*” x locais, indicando que o comportamento dos “*testcrosses*” em relação a EDER não foi constante de local para local.

Rossouw *et al*, (2002) reportaram também diferenças significativas entre a interação genótipo x médio ambiente confirmando o efeito diferencial das localidades na expressão da podridão causada por *Stenocarpella maydis* num estudo realizado em três localidades da África do Sul com intervalo nas medias de incidência de EDER variando de 3.4% a 25% nas localidades de Lichtenburg e Hillerest respectivamente.

Tabela 4. Resumo da Análise de variância conjunta para Percentagem de Espigas com grãos ardidos por *Stenocarpella* (EDER) a traves de três localidades de avaliação no Brasil Central na Safra agrícola 2005/06.

FV	GL	QM
Loc	2	3898.72**
Rep/Loc	3	137.02
“ <i>Testcrosses</i> ”	140	181.17**
“ <i>Testcrosses</i> ” x Loc	286	79.31**
Resíduo	423	57.26
Média		11.7%
CV%		50%

Embora os resultados tenham indicado uma interação significativa “*testcrosses*” x locais, a análise de médias para EDER mostrou-se consistente a través de localidades nos valores fenotípicos dos indivíduos com valores extremos conforme expressado na Tabela 5, possibilitando assim a identificação de progênies duplo-haplóides altamente resistentes para a podridão de grão por *Stenocarpella sp* quando comparados com os valores apresentados por as testemunhas resistentes representados pelo híbrido DK199 e pelo cruzamento entre o progenitor resistente MONDR1 e o testador susceptível MONDS5. Seis progênies em particular mostraram valores inferiores àqueles apresentados pelas testemunhas resistentes, a saber; MDH15, MDH443, MDH95, MDH2, MDH120 e MDH81.

Pascual *et al.* (2006) reportaram respostas diferenciais à infecção por *Stenocarpella sp* para mancha foliar e podridão de grãos mediante a inoculação artificial de 300 acessos de germoplasma, salientando que em condições ambientais ideais para a expressão da doença, materiais classificados como resistentes mostraram certo nível de susceptibilidade, com exceção de CML425 que apresentou um nível relativamente estável de resistência para esta doença. Da mesma forma, no presente estudo as testemunhas resistentes mostraram valores relativamente estáveis de 1 a 5.7%.

Tabela 5. Valores da incidência de podridão de espiga EDER para “*testcrosses*” selecionadas entre as progênies duplo-haplóides resultado do cruzamento entre MONDR1 (progenitor resistente) e MONDS1 (progenitor com nível intermediário de resistência) pelo testador susceptível MONDS5 em comparação com as testemunhas.

	Seleção de Progênies Resistentes					Amostragem de Progênies Susceptíveis			
	Brasília	Pirassununga	Uberlândia	Media		Brasília	Pirassununga	Uberlândia	Media
MDH015	0.00	2.70	6.02	2.90	MDH028	20.05	10.55	25.97	18.86
MDH043	3.77	2.42	3.66	3.28	MDH114	25.26	9.00	23.38	19.21
MDH095	3.85	1.14	4.88	3.29	MDH024	29.55	12.73	16.35	19.54
MDH002	2.44	5.11	3.06	3.54	MDH151	49.74	8.14	9.27	22.38
MDH120	0.00	0.00	11.30	3.77	MDH152	40.96	6.81	19.80	22.52
MDH081	2.36	1.66	7.88	3.97	MDH050	28.93	16.50	23.88	23.10
MDH042	5.25	3.39	3.94	4.20	MDH105	31.33	20.63	17.64	23.20
MDH003	3.95	0.83	9.14	4.64	MDH135	24.08	16.48	32.93	24.49
MDH079	2.94	4.10	7.60	4.88	MDH160	57.22	8.56	23.60	29.79
Testemunhas									
MOND1/MONDS5	1.11	5.69	5.60	4.14					
DK199	1.10	5.51	2.60	3.07					

5.2. Mapeamento de QTL's

O mapeamento por intervalo composto (CIM) considerando os valores para EDER obtidos na média dos três ambientes (análise conjunta) identificou três QTLs significativos para resistência à podridão de grãos por *Stenocarpella sp.*, Q1, localizado no cromossomo 2 entre as posições 36.5 e 55.4 cM, Q2, no cromossomo três, entre as posições 83.2 e 99.2 Q3, localizado no cromossomo 5, entre as posições 90.7 e 107.6 (Tabela 6). Estes QTLs expressaram, 7%, 9% e 10% da variância fenotípica para EDER observada, respectivamente.

Observa-se ainda na Tabela 6, que um quarto QTL, Q4, localizado no cromossomo 3, entre as posições 115.9 e 125.7, foi mapeado nas localidades de Brasília e Pirassununga. Porém não apresentou efeito significativo em Uberlândia, nem na análise conjunta de locais. Tal fato está associado à interação QTL x Locais, que corrobora à interação significativa entre testcrosses x locais observada na Tabela 4.

Embora não existam estudos publicados relacionados à identificação de QTL para a resistência a podridão de grão por *Stenocarpella sp.*, os resultados deste estudo mostram pontos

coincidentes com estudos da resistência a podridão de grão por *Fusarium* reportados por Perez Brito *et al.* (2001) e Leilani *et al.* (2006).

Tabela 6: QTL e marcadores SNP associados à resistência a podridão de grão por *Stenocarpella* na população MONDR1/MONDS1 avaliada em três diferentes localidades na Região Central do Brasil durante a Safra agrícola 2005/06.

Análise	Chrom.	Flanco Esquerdo		Flanco Direito		LOD	Efeito			Doador
		Posição	Marcador	Posição	Marcador		Aditivo	Dom.	R ²	
Conjunta	2	36.5	NC0202428	55.4	NC0201646	2.91	-1.51	0.0	7%	MONDS1
	3	83.2	NC0199309	99.2	NC0199941	3.46	1.87	0.0	9%	MONDR1
	5	90.7	NC0110854	107.6	NC0202210	4.60	-1.81	0.0	10%	MONDS1
Brasília	3	115.9	NC0201774	125.7	NC0199741	3.43	3.23	0.0	8%	MONDR1
Pirasununga	3	115.9	NC0201774	125.7	NC0199741	4.20	1.50	0.0	11%	MONDR1
Uberlândia	3	83.2	NC0199309	99.2	NC0199941	4.19	2.38	0.0	12%	MONDR1
Brasília	5	90.7	NC0110854	107.6	NC0202210	5.59	-3.96	0.0	13%	MONDS1

Limiar de Significância para LOD a 2.5

Valores de R² expressados em porcentagem

Num estudo realizado no México, Perez-Brito *et al.* (2001) reportaram a identificação de 9 e 7 QTLs responsáveis pela variação fenotípica para resistência a podridão de espiga por *Fusarium sp* em duas populações de milho adaptadas a regiões de alta altitude, com valores R² para cada QTL variando de 5 a 12%, reportando a existência de um nível alto de interação QTL x ambiente.

Leilani e colaboradores (2006), reportaram num outro estudo similar envolvendo duas populações de germoplasma temperado a identificação de 7 e 5 QTL's associados a resistência a podridão de grão por *Fusarium* com valores R² para cada QTL variando de 4% a 18% , reportando um QTL no cromossomo 1 como sendo responsável por 18% da variação fenotípica.

Cumprе salientar que neste estudo não foi possível determinar a importância relativa dos efeitos aditivos e dominantes já que de modo semelhante ao que ocorre na geração de linhas puras recombinantes a utilização de progênies duplo-haplóides não permite a estimação dos efeitos de dominância dado à ausência de genótipos heterozigotos (Silva, 2004).

De acordo com os sinais dos efeitos aditivos associados aos QTL's, (Tabela 6), conclui-se que Q1 e Q3 estão ligados em fase de repulsão com os marcadores flaqueadores identificados na mesma tabela, isto é seus alelos de resistência originam-se do genitor

MONDS1 (susceptível) enquanto Q2 e Q4, ambos no cromossomo 3, apresentam alelos de resistência originados do genitor MONDR1 (resistente). O fato de um QTL apresentar seu alelo de resistência originado de um material considerado suscetível pode ser explicado pelo fato do parental MONDS1 não ser completamente suscetível a EDER, pois mesmo na presença de *Stenocarpella spp* este material ainda produz uma quantidade razoável de grãos não ardidos. Sua classificação como suscetível deve-se ao fato de que, em condições similares, apresenta um percentual de grãos ardidos superior à média dos demais materiais.

O fato de dos QTLs de resistência Q1 e Q3 terem sua origem no progenitor suscetível (MONDS1), indica a possibilidade do fenômeno de segregação transgressiva. Este fenômeno consiste na segregação de fenótipos que são extremos ao nível relativo dos parentais participantes num cruzamento, sendo frequentemente o resultado da recombinação de parentais que possuem QTLs de efeitos antagônicos para um caráter (i.e QTLs com efeitos em direção oposta as diferenças dos parentais para um caráter). Este fenômeno é mais comum em plantas do que em animais (Loren et al., 2003). Em milho este fenômeno tem sido reportado em outros caracteres de herança quantitativa, embora as bases genéticas não tenham sido ainda totalmente explicadas (Veldboom et al., 1994, Perez Brito et al., 2001 e Leilani et al., 2006).

Melhoramento assistido por marcadores moleculares para incorporar resistência à podridão de grão mostra-se grande utilidade, considerando a complexidade da resistência para podridão de grãos por *Stenocarpella sp* (Dorrance et al., 1998, Olatinwo et al., 1999 e Russou et al., 2002) e o alto custo de realizar avaliações fenotípica incluindo o uso de inoculações artificiais. Porém estudos adicionais devem ainda ser conduzidos para validação dos QTLs identificados ao longo de anos localidades e “background” genético.

Sendo o presente estudo um dos primeiros com o objetivo de identificar QTLs para resistência a podridão de grão por *Stenocarpella sp* em germoplasma tropical, recomenda-se a realização do mapeamento fino das regiões em volta das posições dos QTLs aqui identificados, para facilitar a validação dos mesmos visando um melhor entendimento de sua performance como fontes de resistência em tipos de germoplasma diferentes, assim como para validar sua estabilidade através de localidades e anos.

6. Agradecimentos.

Os autores agradecem a empresa Monsanto Company pelos recursos genéticos e materiais providenciados para a elaboração do presente estudo, assim como também ao pessoal técnico da mesma empresa nas localidades de Uberlândia, Santa Helena e Barretos pelo apoio recebido na condução dos trabalhos de campo.

7. Conclusões

- Mediante a análise de mapeamento por intervalo composto foram identificados quatro QTL's para resistência a grãos ardidos ocasionados por *Stenocarpella sp* nos cromossomos dois, três e cinco, sendo estes em conjunto, responsáveis por até 26% de variação fenotípica para este caráter.
- Foi observada uma interação Genótipo x Ambiente significativa para porcentagem de grãos ardidos, assim como a interação QTLs x Ambientes, caracterizada pelo não mapeamento de um dos quatro QTLs em uma localidade e na análise conjunta.
- A identificação de dois QTL's para resistência a grãos ardidos por *Stenocarpella sp* com origem no progenitor susceptível pode indicar a possibilidade de obtenção do fenômeno de segregação transgressiva.
- Marcadores SNP específicos a ambos francos foram determinados para cada QTL identificado.
- Foram identificadas seis progênies duplo-haplóides com alto nível de resistência a grãos ardidos causados por *Stenocarpella sp*, a saber; MDH15, MDH443, MDH95, MDH2, MDH120 e MDH81, sendo estes recomendados para incorporar ao programa de melhoramento para a região central do Brasil.

5. Referências Bibliográficas

- CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. 2006. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. *Fitopatologia Brasileira* 31:427-439. 2006.
- CASELA, C. R. Manejo das doenças do milho. In: Congresso Nacional de milho e sorgo, 23., Uberlândia, 2000. A inovação tecnológica e a competitividade no contexto dos mercados globalizados, CD-ROM. Sete Lagoas: ABMS/EMBRAPA Milho e Sorgo/Universidade Federal de Uberlândia, 2000.
- DEL RIO, L. & ZUNIGA, T. Efecto de algunas practicas culturales y fechas de recolección en la incidencia de *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton en maíz sembrado en dos sistemas de labranza. *Ceiba* 32:141-149. 1991a.
- DEL RIO, L. ZUNIGA, T. & TORRES, J. Evaluation de métodos e fechas de inoculation de *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton a diferentes concentraciones. *Ceiba*,32:151-160. 1991b
- DORRANCE, A.E., HINKELMANN, K.H. & WARREN, H.L.,1998. Diallel analysis of diplodia ear rot resistance in maize. *Plant Dis.* 82, 699-703.
- FLETT, B. C., MCLAREN, N. W., AND WEHNER, F. C. 2001. Incidence of *Stenocarpella maydis* ear rot of corn under crop rotation systems. *Plant Dis.* 85:92-94.
- JANSSEN DE ALMEIDA PINTO, N.F. 2006 Podridão Branca da Espiga de milho. Comunicado Técnico No. 141 EMBRAPA.
- IBGE. Sitio da Internet do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística no endereço <http://web.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria>
- KLAPPROTH, J.C. & HAWK, J. A. (1991). Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. *Plant Diseases* 75:1057-1060.
- LANDER, J. B., B.S. WEIR AND Z.-B. ZENG. 2002. QTL Cartographer, Version 1.16. Department of Statistics, North Caroline State University, Raleigh, NC.
- LEILANI, A.R, JINES, M.P., BALINT, P.J., KLEINSCHMIDT D.G., PAYNE, G.A., MARAGOS, C.M., MOLNAR, T.L., HOLLAND, J.B. (2006) QTL Mapping for *Fusarium*

- and Fumonisin Contamination Resisitnce in two Maize Popilations Crop Sci. 46:1734-1743
- LIAKET, M., TAYLOR J.H, JIE, L. SUN, G., WILLIAM, M. KASHA, K.J., REID, L.M., PAULS, K.P. Molecular Mapping of QTLs for resistance to Giberella ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. NRC Reasearch Press Web site at <http://genome.nrc.ca> (2005)
- MARIO, J.L. & REIS, E.M. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. Fitopatologia Brsileira, 1998
- MARIO, J.L. Comparação de métodos de inoculação de *Diplodia maydis* em espigas de milho e reação de híbridos em condições de infecção natural de *D. macrospora*. 1998: 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1998.
- OLATINWO R., CARDWELL K., MENKIR A., DEADMAN M. and JULIAN A. 1999. Inheritance of resistance to *Stenocarpella macrospora* (Earle) ear rot of maize in the mid-altitude zone of Nigeria. European Journal of Plant Pathology 105: 535–543, 1999.
- PASCUAL, C.B., GUZMAN, P.S. and SALAZAR, A.M., 2006. Reaction of maize germplasm to *Stenocarpella macrospora* (Earle) infection and effect of resistance to disease development, International Plant Breeding Symposium. Book of abstracs. P. 150
- PEREZ-BRITO D., JEFFERS D., GONZALEZ D, KHAIRALLAH, M., CORTEZ C.M., VELAZQUEZ G.C. AZPIROZ S.R., SRINIVASAN, G. QTL mapping of *Fusarium monilifirme* Ear Rot Resistance in Highland Maize, Mexico. Agrociencia 35:181-196 2001
- PEREIRA, O.A.P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: Resistência genética de plantas a doenças. Piracicaba. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1995. pp.25-30.
- PINGALI, P.L. (ed.). 2001. CIMMYT 1999–2000 World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize Needs: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector. Mexico, D.F.: CIMMYT

- RANDALL J. WISSER, PETER J. BALINT-KURTI, AND REBECCA J. NELSON, 2006. The Genetic Architecture of Disease Resistance in Maize: A Synthesis of Published Studies. *Phytopatologhy* 96:120-129
- REZENDE, I.C.; SILVA, H.P.; PEREIRA, O.A.P. Comportamento das doenças do milho em diferentes épocas de semeadura. Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 20., Goiânia, 1994, Centro-Oeste: cinturão de milho e sorgo no Brasil; resumos. 1994. P.173
- ROSSOUW, JD, VAN RENSBURG J.B.J & VAN DEVENTER, C.S. Breeding for resistance to ear rot of maize, caused by *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton. 1. Evaluation of selection criteria. *S.Afr Journal of Plant and Soil* 19(4) p.182-187
- ROSSOUW, JD, VAN RENSBURG J.B.J & VAN DEVENTER, C.S. Breeding for resistance to ear rot of maize, caused by *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton. 2. Inheritance of Resistance. *S.Afr Journal of Plant and Soil* 19(4) p.188-194
- SILVA, H.D. 2004 Biometria de Marcadores moleculares, aplicada a Genética e Melhoramento – Construção de Mapas Genéticos e Mapeamento de QTL's. Curso de pós-graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia.
- SILVA, A.R. da, JULIATTI, F.C., BRITO, C.H. de, GOMEZ, L.S., Métodos de Inoculação de *Stenocarpella maydis* em três populações de milho. *Summa Phytopatologica*, V.31, p.82-86, 2005
- TRENTO, S.M., IRGANG, H. & REIS, E.M. Efeito de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. *Fitopatologia Brasileira* 27:609-613. 2002.
- WHITE, D. G. ; CARSON, M.L. History of Corn, In: WHITE, D.G. Compendium of corn diseases. Minnesota: APS Press, 1999, 77P.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1466. 1994

Anexos

Tabela A1. Características das localidades de avaliação das “*testcrosses*” nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal durante a Safra de verão 2005/06.

	Pirassununga, SP.	Uberlândia, MG.	Brasília, DF.
Latitude	21° 59' 4" S	18° 55' 18" S	15° 46' 47" S
Longitude	47° 20' 5" W	48° 9' 22" W	47° 57' 39" W
Altitude	627 m	863 m	1171 m
Tipo de solo	Latossolo	Latossolo	Latossolo
Cor de solo	Vermelho	Vermelho/ amarelo	Vermelho
pH	5.6	5.2	5.7
Modalidade	Plantio direto	Plantio direto	Plantio direto
Cultivo anterior	Crotalaria	Soja	Nabo
População	70,000 p/ ha	60,000 p/ ha	62,500 p/ há
Controle de plantas daninhas	Boxer 8 l/ha + Gesaprim 5 l/ha	Atrazina, Primestra Gold	Gesaprim 5 l/ha
Controle Insetos	Piretróides a 300 ml/há (Decis/Karate), Tracer a 0.5 ml/ha		