

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/49203

IB/ 81773

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução



Claudete Aparecida Mangolim

Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo
em linhagens tropicais de milho (*Zea mays* L.)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Claudete Aparecida Mangolim
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular - área de concentração:
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza

CAMPINAS – SP
2002

UNIDADE IB/81773
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M314m
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49203
PROC 16-837/0
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00167780-0

BIB ID 571010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M314m **Mangolim, Claudete Aparecida**
Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo em linhagens tropicais de milho (*Zea mays* L.) / Claudete Aparecida Mangolim. -- Campinas, S.P:[s.n.], 2002.

Orientador: Cláudio Lopes de Souza Júnior
Co-Orientador: Anete Pereira de Souza
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Mapeamento molecular. 3. Óleo. I. Souza Junior, Cláudio Lopes de. II. Souza, Anete Pereira de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 28 de fevereiro de 2002.

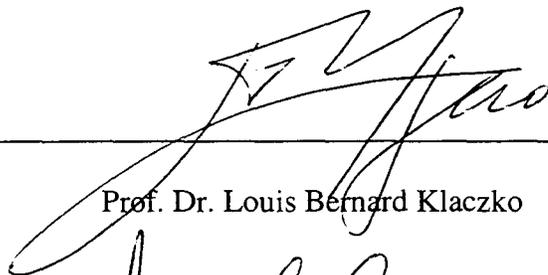
Banca Examinadora



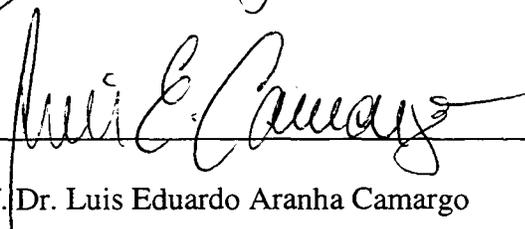
Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr. (Orientador)



Prof. Dr. Antônio Augusto Franco Garcia



Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo



Prof. Dr. João Bosco dos Santos

*"Deus quer, o homem sonha, a obra nasce."
(Fernando Pessoa)*

Aos meus pais, que construíram a base para que eu pudesse crescer cientificamente.

Para você meu querido esposo Eduardo, que está sempre caminhando ao meu lado.

Para aqueles que sei que minha presença era fundamental, mas nem por isso a cobraram, cedendo muito do tempo disponível a eles, para que este trabalho pudesse ser realizado. Para vocês meus filhos: Emerson, Camila e Eduardinho.

Agradecimentos

Agradeço as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a minha formação.

Ao professor Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr. pela orientação, ensinamentos, sugestões e críticas.

À professora Dra. Anete Pereira de Souza pela co-orientação, pelos ensinamentos e convivência durante a elaboração deste trabalho.

Ao professor Dr. Antônio A. F. Garcia por toda a ajuda na realização das análises genéticas deste trabalho.

Ao Dr. João Feijão do Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica da Unidade de Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas pelo auxílio na avaliação do teor de óleo.

Aos membros de minha pré-banca: Dr. Sizuo Matsuoka do Centro de Ciências Agrárias da UFSCAR/Araras-SP, Dr. Antônio V. O. Figueira do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP-Piracicaba-SP e Dr. Antônio A. F. Garcia do Departamento de Ciências Exatas ESALQ/USP-Piracicaba-SP que disponibilizaram tempo lendo e sugerindo alterações para a melhoria deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Antonio A. F. Garcia do Departamento de Ciências Exatas ESALQ/USP-Piracicaba-SP, Dr. Louis Bernard Klaczko do Departamento de Genética IB/UNICAMP, Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo do Departamento de Fitopatologia ESALQ/USP e Dr. João Bosco dos Santos do Departamento de Biologia UFLA/Lavras-MG por suas sugestões que deixaram este trabalho melhor.

Aos membros suplentes da banca examinadora: Eduardo Bearzoti do Departamento de Ciências Exatas UFLA/Lavras-MG e Dra. Yoko B. Rosato Departamento de Genética IB/UNICAMP-Campinas SP.

À Dra. Laura M. M. Ottoboni pela convivência e pelos ensinamentos.

À Dra. Maria de Fátima P. S. Machado, sempre amiga, pela leitura desta tese e sugestões.

À minha amiga Sandra A. O. Collet por seu carinho.

Aos amigos do Lab. Anete (Lu, Alê, Andréia.....enfim todos), do Lab. Laura, do Lab. Yoko, pela sempre agradável convivência, obrigada ‘povo’.

A todos os meus amigos ‘cebemeguianos’.

Aos meus amigos do Departamento de Biologia Celular e Genética/UEM-Maringá.

À Lu e ao Augusto pela amizade e pelo bolo ‘tirolei’.

A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal (Insetos).

À Norma por toda paciência me ensinando a trabalhar com aquele que tenho até medo, o computador.

Por fim, agradeço à minha família, pelo carinho incondicional com que sempre me acolhem.

Agradeço as instituições que contribuíram para a elaboração deste trabalho:

Ao Departamento de Biologia Celular e Genética, da Universidade Estadual de Maringá, pela minha liberação para o programa de capacitação docente.

À CAPES, pelo fornecimento de minha bolsa de doutorado.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto de pesquisa, permitindo a elaboração de minha tese.

Ao CBMEG, por toda infra-estrutura oferecida.

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP pelo uso do campo experimental.

Ao Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica da Unidade de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas, onde a avaliação de teor óleo foi realizada.

Índice

	Pg
Lista de tabelas	XV
Lista de figuras	XVI
Lista de quadros	XVII
Prefácio	XVIII
Resumo	XX
Abstract	XXII
1- Introdução	01
2- Revisão de literatura	06
2.1- Importância econômica do milho	06
2.2- Síntese de ácidos graxos em vegetais	11
2.3- Teor de óleo em milho	21
2.4- Marcadores moleculares e mapa genético	27
2.4-1 Aspectos gerais dos marcadores moleculares	27
2.4-2 Microsatélites em vegetais	34
2.4-3 Mapa genético	36
2.5- Detecção e mapeamento de QTLs	39
2.6- Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo em milho	48
3- Objetivos	53
4- Artigo	54

4. 1- Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo em linhagens tropicais de milho (<i>Zea mays</i> L.)	54
5- Resultados complementares	89
5.1- Estatística descritiva para o teor de óleo	89
5.2- Amplificação dos microssatélites e construção do mapa de ligação	89
6- Conclusões	98
7- Referências bibliográficas	100

Lista de Tabelas

Pg

Tabelas do artigo

Para um melhor acompanhamento na leitura as tabelas do artigo estão escritas a partir do 1 e seguidas pela letra A.

Tabela 1A. Apresentação da análise de variância para o teor de óleo em grãos de milho estimada para as progênes $F_{2:3}$. 83

Tabela 2A. Valores médios, intervalo de variação e estimativas das variâncias genética e fenotípica e do coeficiente de herdabilidade para teor de óleo nos grãos da população $F_{2:3}$ 84

Tabela 3A. Localização, estimativas dos efeitos genéticos e dos coeficientes de determinação dos QTLs associados com o caráter teor de óleo em grãos de milho tropical 85

Tabelas de resultados complementares

Para um melhor acompanhamento na leitura as tabelas de resultados complementares estão escritas a partir do 1 e seguidas pelas letras RC.

Tabela 1RC. Locos de microssatélites polimórficos distribuídos através do genoma de milho e usados para a construção do mapa genético 93

Tabela 2RC. Comportamento dos microssatélites para cada grupo de ligação do mapa genético construído 97

Lista de Figuras

Pg

Figuras da revisão bibliográfica

Para um melhor acompanhamento na leitura as figuras da revisão bibliográfica estão escritas à partir do 1 e seguidas pela letra R.

Figura 1R. Metabolismo que ocorre em várias organelas para a síntese de lipídeos e o movimento destes de um compartimento celular para outro 12

Figura 2R. O papel e a origem de acetil-CoA no metabolismo de ácidos graxos 14

Figura 3R. Visão geral da síntese de um ácido graxo composto por 18 carbonos (18:0) 16

Figuras do artigo

Para um melhor acompanhamento na leitura as figuras do artigo estão escritas à partir do 1 e seguidas pela letra A.

Figura 1A. Mapa genético dos 10 cromossomos de milho construído com 75 marcadores microssatélites 87

Figura 2A. Mapeamento de QTLs associados com teor de óleo nos grãos obtido por mapeamento por intervalo composto (CIM) 88

Figuras de resultados complementares

Para um melhor acompanhamento na leitura as figuras de resultados complementares estão escritas à partir do 1 e seguidas pelas letras RC.

Figura 1RC. Distribuição do conteúdo de óleo em sementes de milho de 371 linhagens endogâmicas (1RC A) e em 408 progênies $F_{2:3}$ (1RC B) 90

Figura 2RC. Perfil de separação dos alelos do microsatélite polimórfico PHI029 em gel de agarose metaphor 4 % 94

Figura 3RC. Amplificação de locos de microsatélites para as duas linhagens parentais (P_1 e P_2) e para os três híbridos simples (F_1) 96

Lista de Quadros

Quadro 1. Programa de Amplificação *Touchdown* PCR com temperatura variando de 65°C a 55°C e o programa PC 1 91

Quadro 2. Programa de amplificação com temperatura específica 92

Quadro 3. Concentrações de reagentes utilizados para cada reação de amplificação dos microsatélites 95

Prefácio

O milho é uma cultura de relevante importância. Seus grãos têm sido usados principalmente no preparo de ração animal, alimentando aves e suínos. Além do uso no preparo de ração animal, o milho pode ser utilizado na indústria, produzindo diversos componentes que são empregados na elaboração de vários produtos industriais.

Um dos componentes extraído a partir de moagem úmida é o óleo. Este componente é importante, tanto para a alimentação humana como animal. Na alimentação humana, quando ele é metabolizado o organismo produz baixos níveis de colesterol e, no preparo de ração, milho com alto teor de óleo favorece o ganho de peso dos animais. O teor médio de óleo em milho é de 45 kg por tonelada de grãos. Assim, o desenvolvimento de materiais que produza acima de 60 kg por tonelada de grãos, que é um teor considerado alto, é de interesse comercial. Como este caráter é condicionado por múltiplos locos, existe a necessidade de estudo e compreensão do comportamento genético, mapeando os locos associados, determinando seus efeitos e o quanto cada loco contribui para o teor de óleo. Baseando-se nestes conhecimentos, programas de melhoramento podem ser planejados, aumentando a eficiência no desenvolvimento de cultivares com alto teor de óleo.

O mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) envolve um árduo trabalho, requerendo o conhecimento de várias áreas, dificultando assim a realização do trabalho de forma individual. O desenvolvimento do trabalho integrando diferentes grupos de pesquisa permite sua realização de forma mais eficiente, proporcionando maior qualidade nos resultados finais. Neste trabalho de mapeamento de QTLs associados com teor de óleo, foram utilizadas linhagens de milho contrastantes. Essas linhagens foram desenvolvidas no programa de melhoramento genético de milho do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Para o

mapeamento utilizou-se uma população F₂. Os plantios e cruzamentos para a obtenção dessa população foram realizados nos campos experimentais daquela universidade. Os dados moleculares foram obtidos no Laboratório de Biologia Molecular e Análises Genéticas, situado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) na UNICAMP. Nesse laboratório, foram obtidos os dados genotípicos de microssatélites para todas as progênes utilizadas no experimento. A avaliação do teor de óleo foi realizada em aparelho de Ressonância Nuclear Magnética. Esses dados fenotípicos foram obtidos no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica da Unidade de Fitoquímica do Instituto Agrônomo de Campinas. As análises, envolvendo a construção do mapa de ligação e detecção dos QTLs associados com teor de óleo, foram realizadas no Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP. A soma de trabalho envolvendo os diferentes grupos permitiu que no presente estudo fosse possível a detecção, o mapeamento e as estimativas dos efeitos genéticos de QTLs associados com o teor de óleo. Outro fator limitante para o estudo de QTLs é o custo inicial da implantação do projeto. Esta limitação para a realização do trabalho foi vencida graças ao apoio financeiro concedido pela agência fomentadora FAPESP, (Processo número 1999/11479-6), e também pela concessão da bolsa de doutorado pela CAPES.

Espera-se que estes resultados contribuam de forma significativa para o entendimento e conhecimento dos locos associados a esse caráter, permitindo, desta forma, que cultivares melhoradas possam ser desenvolvidas eficientemente. As informações obtidas no presente trabalho vieram enriquecer a escassa literatura existente sobre este tópico específico. O trabalho apresenta uma ampla revisão bibliográfica sobre o teor de óleo em milho e o mapeamento de QTLs para esse caráter; sendo que os resultados obtidos estão contidos no artigo a ser publicado, e parte integrante desta tese, sendo ainda apresentados resultados complementares e as conclusões gerais.

Resumo

O teor de óleo em grãos de milho é um caráter que apresenta herança poligênica e do ponto de vista econômico é de alta importância. Este trabalho foi realizado para conhecer o número e a localização dos locos (QTLs) que controlam o teor de óleo dos grãos. Para este estudo foram cruzadas as linhagens de milho L-20-01 e a L-02-03 que foram contrastantes para o conteúdo de óleo nos grãos. A partir deste cruzamento foram produzidas 408 plantas F_2 . Essa população foi utilizada para a construção de um mapa genético com 75 microssatélites, que se encontram distribuídos nos 10 cromossomos, formando 10 grupos de ligação com uma extensão de 1.438,6 cM. O número médio de marcadores para cada cromossomo foi de 7,5 e o intervalo médio entre marcadores foi de 19,18 cM. Para a avaliação de óleo foram utilizados os grãos das progênes $F_{2,3}$, das plantas F_2 autofecundadas. A média das progênes foi de 58,40 g kg^{-1} de óleo, variando de 44,93 a 72,63 g kg^{-1} . O coeficiente de herdabilidade para este caráter foi de 98%. Associações entre marcadores e QTLs foram realizadas através do método de mapeamento por intervalo composto (CIM) e foram consideradas significativas quando o valor da razão de verossimilhança (LR) ao longo do cromossomo ultrapassou o valor de 11,97, valor este estimado após 1.000 permutações. Associações significativas entre marcadores e QTLs foram obtidas em oito cromossomos, com um total de 13 QTLs mapeados. Juntos, esses QTLs explicaram 51,16% da variância genética. A principal contribuição para o caráter teor de óleo foi proveniente dos QTLs mapeados nos cromossomos 1 e 5. A maior parte dos alelos que contribuíram de forma favorável para o caráter foram provenientes da linhagem parental L-20-01, a qual apresentou o mais elevado teor de óleo. A ação gênica predominante para os QTLs mapeados foi aditiva e de dominância parcial, com grau médio de dominância de 0,47 evidenciando que este caráter apresenta dominância parcial. As posições de seis QTLs mapeados no presente trabalho foram

coincidentes com as posições descritas em trabalhos já publicados, sugerindo que eles possam ser os mesmos QTLs, mas mapeados em diferentes cruzamentos.

Abstract

Oil contents in maize kernel is a polygenic hereditary trait and of paramount importance from the economic point of view. The number and sites of (QTLs) loci that control oil contents in maize kernel have been estimated. Maize strains L-20-01 and L-02-03, with contrasting oil contents, were crossed. Four hundred and eight F_2 plants were produced from this crossing, whose population has been used in the construction of a genetic map with 75 microsatellites distributed in 10 chromosomes and forming 10 linkage groups, with an extension of 1,438.6 cM. Mean number of markers for each chromosome was 7.5 and mean interval between markers amounted to 19.18 cM. Grains of progenies F_{2-3} of self-crossed plants F_2 were used for oil evaluation. Mean of progenies was 58.40 g kg⁻¹ of oil, ranging between 44.93 and 72.63 g kg⁻¹. Heritability coefficient for trait amounted to 98%. Associations between markers and QTLs were undertaken by composite interval mapping (CIM) and were significant when value of likelihood ratio (LR) throughout the chromosome surpassed 11.97. Latter value has been estimated after 1000 permutation tests. Significant associations between markers and QTLs were obtained in eight chromosomes, 13 QTLs has been mapped, which explained 51.16% of genetic variation. Main contribution for oil content trait was derived from QTLs mapped in chromosomes 1 and 5. Most alleles that contributed positively in trait came from parental strain L-20-01. The latter had the highest oil rate. Predominant genic action for mapped QTLs was additive and of partial dominance. Average dominance amounted to 0.47 and confirmed partial dominance for oil contents in maize kernel. Sites of six mapped QTLs coincided with those described in the literature. They may be the same QTLs mapped in different crossings.

1- Introdução

A espécie *Zea mays* L., comumente designada milho, é altamente politípica, com mais de 300 raças identificadas e milhares de variedades (Paterniani, 1990). Essa espécie ocupa um lugar de destaque no mundo, tanto pelo seu valor econômico, como também pelo acúmulo de conhecimentos e informações científicas que foram obtidas a partir das mais diversas áreas de pesquisas desenvolvidas. É provável que dentre as espécies que apresentam importante papel na economia mundial ela seja a mais pesquisada. O conhecimento resultante dessas pesquisas tem sido utilizado tanto para melhorar seu próprio cultivo, como também extrapolado para o melhoramento de outras espécies cultivadas (Paterniani e Campos, 1999).

O milho é considerado a planta cultivada que atingiu o mais elevado estágio de domesticação, porque a colheita de plantas individuais favoreceu a seleção pelo homem, que escolheu para o seu cultivo plantas com as características de espiga desejáveis (Paterniani e Campos, 1999). Esta escolha foi facilitada pela imediata identificação das características na espiga e o seu cultivo foi se expandindo até ocupar praticamente todo o continente americano. Esta expansão ocorreu em consequência de seleção promovida pelo homem e pela própria seleção natural. Assim, graças à sua capacidade adaptativa, e por apresentar grande importância econômica, o milho é a espécie vegetal mais cosmopolita do mundo. Além do uso direto na propriedade agrícola, o milho apresenta grande versatilidade de aplicação, podendo ser utilizado na produção de ração para aves e suínos, apresentando também grande aplicação na indústria, fazendo parte de diversos produtos industrializados. Trata-se de um cereal de múltiplas aplicações, e isto ocorre em função da qualidade dos seus grãos, que podem ser destinados para a indústria, sendo processados através de moagem seca ou úmida (Paterniani, 1995).

Um dos componentes importante do milho é o óleo, que está armazenado predominantemente no embrião da semente (Paterniani, 1990). Materiais genéticos que apresentam alto conteúdo de óleo podem ser utilizados para a produção de ração animal com alto valor calórico, aumentando o ganho de peso dos animais. Em função da sua composição química, o óleo de milho também é interessante na alimentação humana, pois apresenta alto nível de ácidos graxos insaturados e baixo nível de saturados, que quando metabolizados diminuem a taxa de produção de colesterol. Também, o óleo de milho contém altos níveis de antioxidantes naturais, o que permite a sua estocagem sem a adição de estabilizantes químicos (Weber, 1987).

O teor de óleo em milho é um caráter quantitativo (Dudley *et al.*, 1974), apresentando coeficiente de herdabilidade acima de 70% (Hallauer e Miranda Filho, 1988). Existe uma variação contínua na concentração de óleo armazenada no embrião de milho, de 0,5% até cerca de 20%. Em razão dessa variação, programas de melhoramento podem produzir cultivares com conteúdo de óleo acima da média, que é de 4,5%. Um fator importante que contribuiu para o desenvolvimento dos programas de seleção e melhoramento para o teor de óleo em milho foi a elaboração de métodos analíticos, como a espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NMR) (Alexander *et al.*, 1967). Este método permite a análise de uma única, ou de um conjunto de sementes, de forma rápida e não destrutiva.

O principal fator limitante no uso de cultivares de milho com alto teor de óleo é a sua baixa produtividade de grãos, uma vez que esses caracteres são negativamente correlacionados (Alexander, 1999). Portanto, a seleção para aumentar o teor de óleo nos grãos conduz à redução na produtividade. Este decréscimo no peso ocorre em função do grande consumo de energia envolvido para a síntese de óleo, quando comparado com o gasto energético para a síntese de amido. Isto faz com que o óleo de milho seja mais caro que o de soja e girassol, que apresentam

teores elevados de óleo nos grãos. Para que o caráter seja manipulado corretamente, o que poderia possibilitar o desenvolvimento de cultivares com alto teor de óleo e manutenção de produtividade em níveis adequados, é preciso que haja um conhecimento profundo da herança deste caráter.

A variabilidade do teor de óleo em milho é controlada por diversos locos gênicos, isto é, o caráter é poligênico (Dudley, 1977; Dudley e Lambert, 1992; Moreno-Gonzalez *et al.*, 1975). Com o advento dos marcadores moleculares tornou-se possível mapear regiões cromossômicas que afetam caracteres quantitativos, como o teor de óleo. Dessa forma, essas regiões denominadas de QTLs, podem ser monitoradas e pesquisadas, obtendo-se como consequência maior conhecimento do controle genético do caráter e de sua manipulação no melhoramento (Souza Jr., 1992).

Os marcadores moleculares são utilizados para a construção de mapas genéticos. A detecção e o mapeamento de QTLs é realizada associando-se a variação dos dados fenotípicos de um determinado caráter com as regiões cromossômicas em que se encontram os marcadores moleculares (Falconer e Mackay, 1996; Lynch e Walsh, 1997). Diversas técnicas estatísticas foram sugeridas para se detectar e mapear QTLs, desde análises de variância, regressão simples e múltipla até aquelas que envolvem o método da máxima verossimilhança (ML) (Lynch e Walsh, 1997).

O marcador denominado RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) foi o primeiro marcador molecular desenvolvido em nível de DNA e utilizado para a construção de mapas de ligação. Mapas de ligação com este marcador foram construídos para muitas espécies vegetais, principalmente cereais de interesse agrônômico (Coe *et al.*, 1987; Burr *et al.*, 1988; Coe *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1998; Dufour *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999; Korzun *et al.*, 1996; Loarce *et al.*, 1996). Com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

(Mullis e Faloona, 1987), uma nova geração de marcadores moleculares baseados neste princípio foram criados, como o SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989); o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNAs*) (Williams *et al.*, 1990) e o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos *et al.*, 1995; Lin e Kuo, 1995).

Os genomas de eucariotos apresentam várias classes de seqüências repetidas, sendo que uma destas consiste de repetições em *tandem* de pequenos motivos de um a seis nucleotídeos, que foram denominados microssatélites ou SSR. *Primers* complementares para as seqüências conservadas que flanqueiam essas repetições são desenvolvidos e, através do uso de PCR, essas repetições são amplificadas. A técnica de microssatélite apresenta vantagens sobre outros marcadores, pois é um marcador codominante, baseado em metodologia de PCR e usa pequena quantidade de DNA (Gupta *et al.*, 1996). Esse marcador é abundante nos genomas de animais e plantas, sendo altamente variável e apresentando altos níveis de polimorfismo. Em função das vantagens que este marcador apresenta, na última década ele tem se tornado o mais popular marcador genético (Schlötterer, 2000).

Em milho, apesar da alta concentração de óleo na semente ser um caráter desejável, existe um número limitado de informações sobre a associação de locos marcadores moleculares, com genes controlando o conteúdo de óleo nessa espécie. Foram realizados alguns trabalhos associando locos de isoenzimas com conteúdo de óleo (Brown, 1971, Kahler, 1985) e locos de RFLP com QTLs associados com o teor de óleo (Goldman *et al.*, 1994, Sughrue e Rocheford, 1994, Berke e Rocheford, 1995) e QTLs associados com a concentração dos ácidos graxos componentes do óleo de milho (Alrefai *et al.*, 1995).

Considerando que o desenvolvimento de cultivares de milho com alto teor de óleo, poderá ser mais eficiente com o conhecimento da localização e do número de locos envolvidos com a expressão desse caráter, a proposta do presente estudo foi utilizar o marcador molecular

do tipo microssatélite para mapear e estimar os efeitos genéticos de QTLs associados a esse caráter, utilizando-se uma população de milho tropical. Essas informações podem contribuir para os programas de melhoramento que visam a obtenção de cultivares de milho com alto teor de óleo.

2- Revisão de literatura

2.1- Importância econômica do milho

O milho é uma gramínea da família Poaceae, da tribo Maydeae do gênero *Zea* e da espécie *Zea mays* L. Ele é uma planta essencialmente panmítica, uma vez que o monoicismo das Maydeae acentuou-se com maior separação espacial da inflorescência feminina e da masculina, sendo portanto uma planta álogama com praticamente 100% de reprodução cruzada. Trata-se de um cereal essencialmente americano e sua cultura teve origem com o advento da agricultura no Novo Mundo há mais de 8000 anos. O milho hoje está disseminado por todo o mundo e várias introduções foram feitas a partir do milho americano (Paterniani e Campos, 1999).

O milho é uma espécie altamente politépica, apresentando cerca de 300 raças identificadas e dentro de cada raça podem ser identificadas variedades, com grande variabilidade genética (Paterniani, 1990). Essa variabilidade refere-se às adaptações climáticas, além das variações selecionadas pelo homem. É a espécie vegetal cultivada mais cosmopolita do mundo, apresentando variedades adaptadas a diferentes altitudes/latitudes. Como o milho é muito sensível ao fotoperíodo, podemos encontrar variedades temperadas e variedades tropicais. As variedades também podem ser classificadas quanto ao tipo de endosperma. Estes tipos bem distintos de endospermas são cultivados com o objetivo de atender as exigências dos consumidores (Paterniani, 1995).

O maior produtor mundial de milho é os Estados Unidos com uma estimativa de produção para 2000/2001 de 253,2 milhões de toneladas; segue-se a China, com uma estimativa de 105 milhões de toneladas (Brandalitze, 2001). No Brasil que é o terceiro maior produtor, o milho ocupa a maior área cultivada, com cerca de 14 milhões de hectares sendo utilizados para o

cultivo deste cereal. Este fato é importante, pois no ano de 2001 está se tornando um dos principais exportadores mundiais, ao invés de um dos maiores importadores (Brandalitze, 2001). O Brasil ainda apresenta espaço para evoluir em produtividade, tanto em áreas de cultivo, como também na produção de sementes melhoradas e insumos cada dia mais eficientes. A produção brasileira de milho nos anos de 1999/2000 foi de 32,8 milhões de toneladas e parte desta produção foi exportada, garantindo uma fatura superior a 60 milhões de dólares em junho de 2000. A estimativa para a colheita de 2001 é de aproximadamente 41 milhões de toneladas (Brandalitze, 2001).

A oferta mundial de milho é 787 milhões de toneladas, cobrindo um consumo total de 608,8 milhões de toneladas. De acordo com estas previsões, como existe crescimento de consumo para este grão, o ideal para o mundo seria que houvesse um crescimento médio na produtividade de 30 milhões de toneladas ao ano. O Brasil apresenta uma previsão de oferta total para 2000/2001 de 41,442 milhões de toneladas. Desta oferta, 19,100 milhões de toneladas deverão ser utilizadas para a produção de ração para aves e suínos e, 5,850, na indústria moageira. Para esta oferta total o Brasil apresenta uma demanda de 40,650 milhões de toneladas e no ano de 2001 foi colhida a maior safra, devendo atender a demanda interna e garantir a nossa presença no mercado internacional (Brandalitze, 2001).

Segundo Leath e Hill (1987), a produção de milho que vem aumentando no mundo, principalmente em função do aumento da área cultivada, parece estar associada a fatores tais como a disponibilidade de recursos tecnológicos. Estes recursos envolvem práticas agrícolas como: utilização de fertilizantes; herbicidas e inseticidas; manejo do solo e uso de sementes melhoradas. O melhoramento genético tem contribuído para o aumento da produtividade, permitindo a seleção de várias características de importância econômica tais como resistência à

doença, insetos, resistência à seca, aumento na produção de grãos e melhoria na qualidade nutricional das sementes.

O milho cultivado é um componente essencial na alimentação dos animais, sendo que 36% do total produzido é utilizado na elaboração de ração para aves e 18% é usado na alimentação de suínos (Perry, 1988). Para autoconsumo é utilizado um total de 26,6% da produção deste grão. A partir do milho também é elaborado uma grande variedade de produtos industrializados (Watson, 1988). Um total de 15% do milho produzido é utilizado na indústria. O consumo na alimentação humana e animal e o uso na elaboração dos produtos industrializados são justificados pelo alto conteúdo de carboidratos (principalmente amido, que compreende 71,5% da semente), de proteínas (10,3% da semente), de óleo (4,5% da semente) e vitamina (Perry, 1988).

O processamento de milho para a indústria pode ser realizado através de moagem seca ou úmida. A moagem seca consiste essencialmente na separação física dos componentes do grão de milho, onde o endosperma é moído em diversos níveis de tamanho de partículas. O embrião é utilizado para a obtenção de óleo e no preparo de ração animal (Paterniani, 1990). O óleo, um dos produtos de grande importância econômica do milho, é produzido por moagem úmida do embrião. Este óleo é de grande aceitabilidade na alimentação, devido a sua estabilidade durante a estocagem e cozimento, evitando a necessidade da adição de antioxidantes sintéticos. Esta estabilidade é devida à presença de antioxidantes naturais, os tocoferóis, que protegem as duplas ligações de ácidos graxos insaturados de sofrerem oxidação (Alexander, 1988). A aceitabilidade deve-se também à presença de um baixo nível de ácido linolênico e, também, ao alto teor de ácidos graxos insaturados (ácido linoleico) que quando metabolizados pelo homem resultam em níveis reduzidos de colesterol no sangue (Weber, 1987).

O óleo de milho é importante para a produção de margarinas, óleo para salada, óleo usado no cozimento, fazendo parte assim, de vários produtos alimentícios. Além do uso na alimentação humana, o aumento do conteúdo de óleo na ração animal é vantajoso. Alexander e Creech (1977) descreveram que o milho que apresenta concentrações de óleo maior que 4,5% é importante para a alimentação de animais. Quando aves são alimentadas com ração preparada com milho que apresenta alto teor de óleo (6% a 13%) ao invés de com milho com teor normal (4,5%), observa-se aumento na produção de ovos e aumento no peso corporal, em função da mesma quantidade de ração oferecida. Quando aves são alimentadas com ração que apresenta alto teor de óleo, tanto o aspecto da pele como a pigmentação do plasma apresentou-se com melhor qualidade (Han *et al.*, 1987); o ganho de peso e aumento da qualidade da carne também foram observados para suínos (Adams e Jensen, 1987). O ganho ocorre, pois o óleo contém 2,25 vezes mais calorias por grama de matéria seca do que amido ou proteína (Han *et al.*, 1987; Adams e Jensen, 1987 e Goss e Kerr, 1992). Foi observado, também, que o aumento de calorias em ração utilizada para bovinos, tem resultado em crescimento mais rápido devido a potencialização do hormônio de crescimento (Alexander, 1988). Devido a isso, o desenvolvimento de germoplasma com alto teor de óleo tem sido o objetivo de alguns programas de melhoramento (Goldman *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de cultivares de milho que apresentam alto teor de óleo é importante, pois a sua disponibilidade no mercado é restrita. Existe grande procura por esse óleo que ocorre em função de suas qualidades para o consumo humano. Uma maior procura do que oferta favorece o alto preço do produto, sendo o seu preço superior ao de óleo de soja, de algodão e de girassol. Neste sentido, programas de melhoramento, têm sido desenvolvidos com o objetivo de selecionar e produzir cultivares de milho que apresentam maior teor de óleo. Programas de seleção são importantes, em função destes a produção de óleo de milho tem aumentado: em 1972

produziu-se 226.800 toneladas e em 1986 a produção mundial chegou a cerca de 612.123 toneladas (Watson, 1988).

Cultivares de milho que apresentam alto teor de óleo, quando comparadas com os que apresentam baixo teor, produzem menos toneladas de grãos por hectare quando cultivadas em condições de campo que proporcionem a mesma capacidade fotossintética e fisiológica. Esta proporcionalidade inversa entre produtividade e o teor de óleo, é decorrente do maior envolvimento energético para a produção de óleo, quando comparado com a síntese de amido. Para que o milho produza uma quantidade de óleo que fornecerá uma caloria, a planta gastará duas calorias, fazendo com que o custo energético desta via seja grande (Alexander, 1988).

Os milhos produzidos diferem quanto à qualidade dos seus grãos. Os preços pagos pela indústria são uma função da qualidade do produto. O preço também varia conforme a maior ou menor disponibilidade de milho no mercado. Entretanto, com o desenvolvimento da indústria, a tendência é que haja aumento das exigências quanto às qualidades do milho. No futuro, a comercialização deste cereal para fins industriais poderá ser devidamente ajustada e as diferenças na composição dos grãos serão importantes para que a indústria possa decidir o tipo de processamento que estes deverão receber, ou seja, se através de moagem seca ou úmida. Assim, o desenvolvimento de cultivares que produzam componentes de interesse (óleo, proteínas, teor de caroteno) poderá atrair diferentes indústrias, que passarão a comprar o milho em função dos seus interesses de processamento. A seleção de milho para o aumento do teor de óleo é uma possibilidade que pode ser executada, podendo oferecer atrativos para a indústria, desde que a comercialização seja devidamente ajustada (Paterniani, 1995).

2.2- Síntese de ácidos graxos em vegetais

Para que programas de melhoramento possam ser mais eficientes no desenvolvimento de cultivares de milho com características agrônômicas importantes, tanto para fins nutricionais como industriais, é interessante o conhecimento prévio do comportamento e funcionalidade das vias envolvidas na produção desses caracteres. O triacilglicerol (TAG), a principal forma química de estocagem de lipídeos nas plantas, é um dos principais produtos da agricultura. O entendimento das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de lipídeos tem aumentado, o que tem permitido que através de engenharia genética, modificações da composição de ácidos graxos nas sementes oleaginosas possam ser realizadas. Através dessas modificações, novos ou melhorados óleos vegetais podem ser produzidos. Estas pesquisas têm custado anualmente vinte e cinco bilhões de dólares (Töpfer *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Ohlrogge e Browse (1995), mostraram que em plantas a biossíntese de ácidos graxos ocorre nos plastídeos. Estes ácidos graxos são utilizados como precursores para a construção e organização de membranas celulares, sendo também utilizados para a síntese de lipídeos de reserva. O lipídeo é a principal forma de reserva de carbono nas sementes de muitas espécies de plantas, constituindo aproximadamente 60% do peso seco de tais sementes. A via de biossíntese de ácidos graxos é considerada uma via metabólica primária, pois ela é realizada por todas as células da planta, sendo essencial para o seu crescimento.

Os principais ácidos graxos sintetizados pelas plantas apresentam uma cadeia de 16 a 18 carbonos, contendo de uma a três duplas ligações cis (Ohlrogge e Browse, 1995). No plastídeo, uma série de enzimas estão envolvidas no processo de biossíntese destes ácidos graxos. Quando os três carbonos do glicerol são esterificados com as cadeias de ácidos graxos, ocorre a formação de triacilgliceróis, sendo este o principal lipídeo de estocagem nas sementes (Figura 1R).

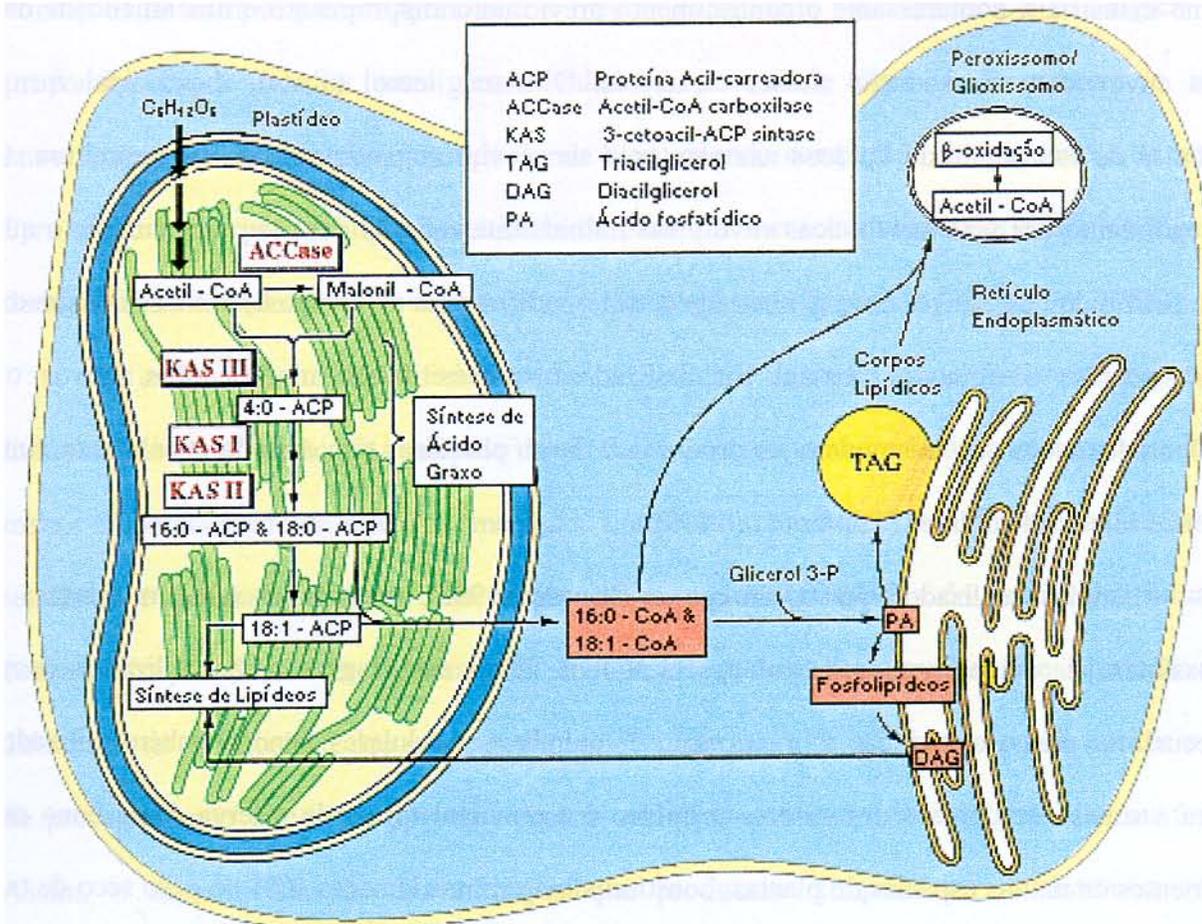


Figura 1R. Metabolismo que ocorre em várias organelas para a síntese de lipídeos e o movimento destes de um compartimento celular para outro.

Todos os átomos de carbono dos ácidos graxos são derivados de acetil-Coenzima A (acetil-CoA) que está presente no plastídeo (Ohlrogge e Browse, 1995). A concentração de

acetil-CoA permanece constante nesta organela, mesmo quando a taxa de síntese de ácido graxo varia muito. A constância na concentração de CoA pode ser em função da enzima piruvato desidrogenase do plastídeo (PDH), que atua sobre o piruvato, este pode ser proveniente tanto da via glicolítica como também pode ser produzido como uma reação secundária catalisada pela enzima ribulose bifosfato carboxilase (Andrews e Kane, 1991). Como a acetil-CoA possui um papel central em muitas vias metabólicas, mais que uma via contribui para manter a sua concentração. Uma outra via alternativa é a produção deste intermediário pela PDH mitocondrial, seguido pelo transporte de acetato livre até o plastídeo. Este acetato, é ativado no cloroplasto pela enzima acetil-CoA sintase produzindo acetil-CoA. Também tem sido proposto que o malato e a glicose 6-fosfato citosólicos sejam precursores de acetil-CoA para o plastídeo em sementes oleaginosas (Ohlrogge e Browse, 1995). A acetil-CoA para a produção de ácidos graxos pode ser proveniente de diversas fontes, podendo ainda variar em função do tecido, do estágio de desenvolvimento, das condições de luz/escuro e da espécie estudada (Ohlrogge e Browse, 1995) (Figura 2R).

A enzima acetil-CoA carboxilase (ACCCase) catalisa a primeira reação da via biossintética de ácidos graxos, transformando acetil-CoA+CO₂ em malonil-CoA. Esta reação é considerada o passo limitante da biossíntese de ácidos graxos (Post-Beittenmiller *et al.*, 1992). Em plantas existem pelo menos dois tipos diferentes de estrutura da enzima ACCCase. Estes podem diferir quanto à espécie e compartimentos celulares em que são encontrados, e independente do tipo, a ACCCase é formada por várias subunidades (Alban *et al.*, 1994). Vários genes e clones de cDNA já foram isolados para um dos tipos desta enzima em plantas (Töpfer e Martini, 1994), em animais e em fungos (Ohlrogge e Browse, 1995).

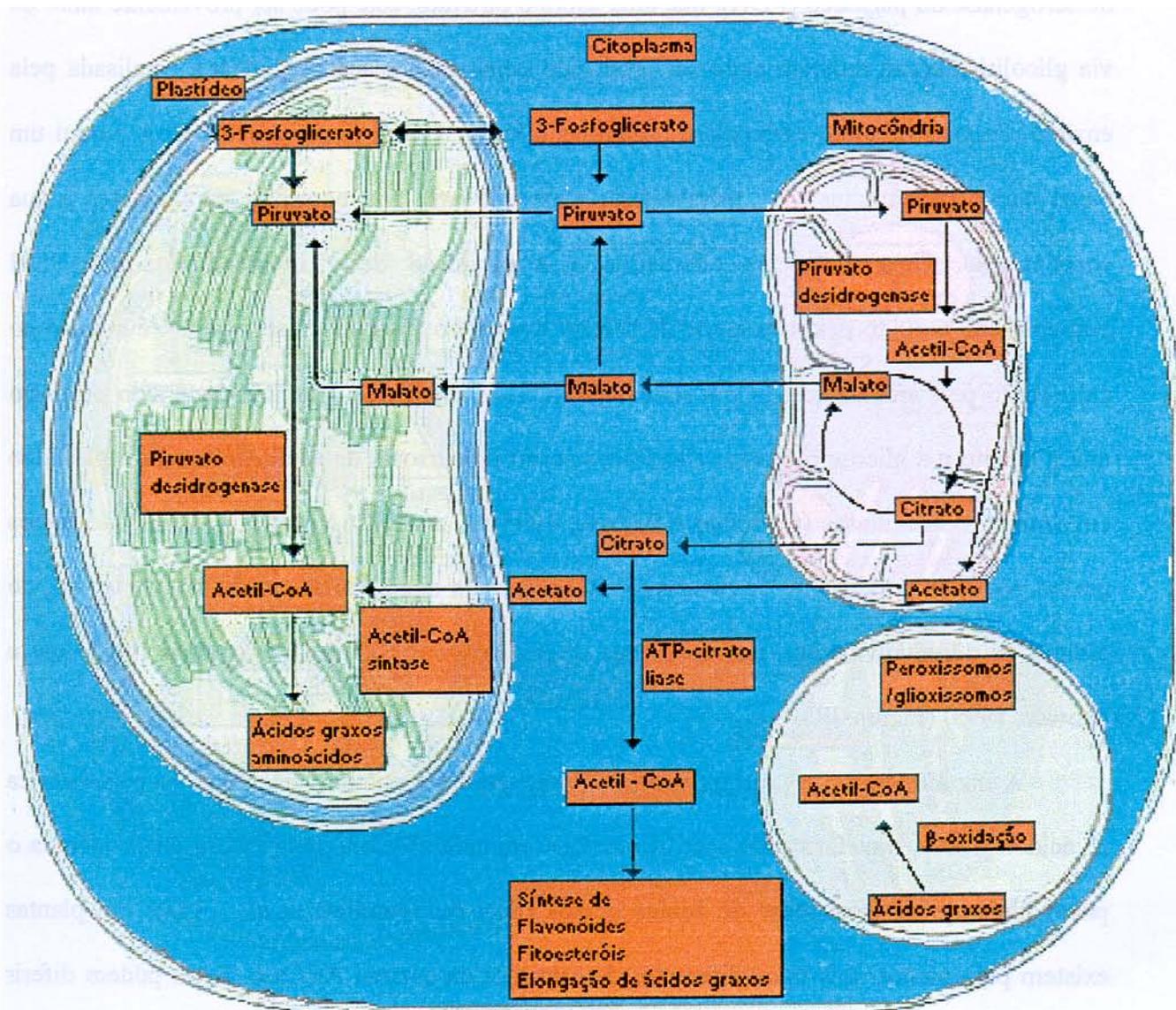


Figura 2R. O papel e a origem de acetil-CoA no metabolismo de ácidos graxos. A acetil-CoA é a principal intermediária no metabolismo celular, esta molécula promove uma ligação entre muitas vias durante a síntese de ácidos graxos em plantas.

A produção de um ácido graxo de 16 ou 18 carbonos a partir de acetil-CoA ou malonil-CoA requer a participação de pelo menos 30 enzimas. Em plantas, as enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos são componentes dissociáveis solúveis localizados no estroma dos plastídeos. O doador central de carbono para a síntese de ácidos graxos é o malonil-CoA produzido pela ACCase. O grupo malonil é transferido de CoA para a proteína acil carreadora (ACP). Todas as reações da via envolvem ACP, até que o produto com 16 ou 18 carbonos esteja pronto, podendo ser transferido para glicerolípídeos ou ser exportado do plastídeo.

Após a transferência de malonil para ACP, a enzima malonil-tioéster catalisa uma série de reações de condensação com aceptores acil-ACP resultando nas ligações carbono-carbono (Ohlrogge e Browse, 1995). Para produzir um ácido graxo com 18 carbonos são necessárias pelo menos 3 enzimas de condensação, as enzimas KASIII, KASI e KASII. O produto inicial de cada condensação é 3-cetoacil-ACP. Após a condensação ocorrem três reações adicionais. O 3-cetoacil-ACP é reduzido pela enzima 3-cetoacil-ACP redutase, o produto desta enzima é desidratado pela enzima hidroxiacil-ACP desidratase; finalmente, a enzima enoil-ACP redutase reduz a dupla ligação 2-trans, formando um ácido graxo saturado. A ação combinada dessas quatro enzimas produz um crescimento de 2 carbonos na cadeia de ácido graxo ainda ligada à ACP como tioéster (Figura 3R).

Na maioria dos tecidos de planta, 75% dos ácidos graxos são insaturados (Ohlrogge e Browse, 1995). A primeira dupla ligação é adicionada pela enzima estearoil-ACP desaturase, que é exclusiva do reino vegetal. A clonagem desta enzima permitiu estudos cristalográficos e da sua estrutura tri-dimensional.

Os ácidos graxos são transferidos de CoA para as posições 1 e 2 de glicerol-3-fosfato, resultando na produção de ácido fosfatídico (PA), o qual é defosforilado produzindo

diacilglicerol (DAG). No passo final de síntese de TAG, um terceiro ácido graxo é transferido da posição 3 do DAG pela enzima diacilglicerol aciltransferase (Ohlrogge e Browse, 1995).

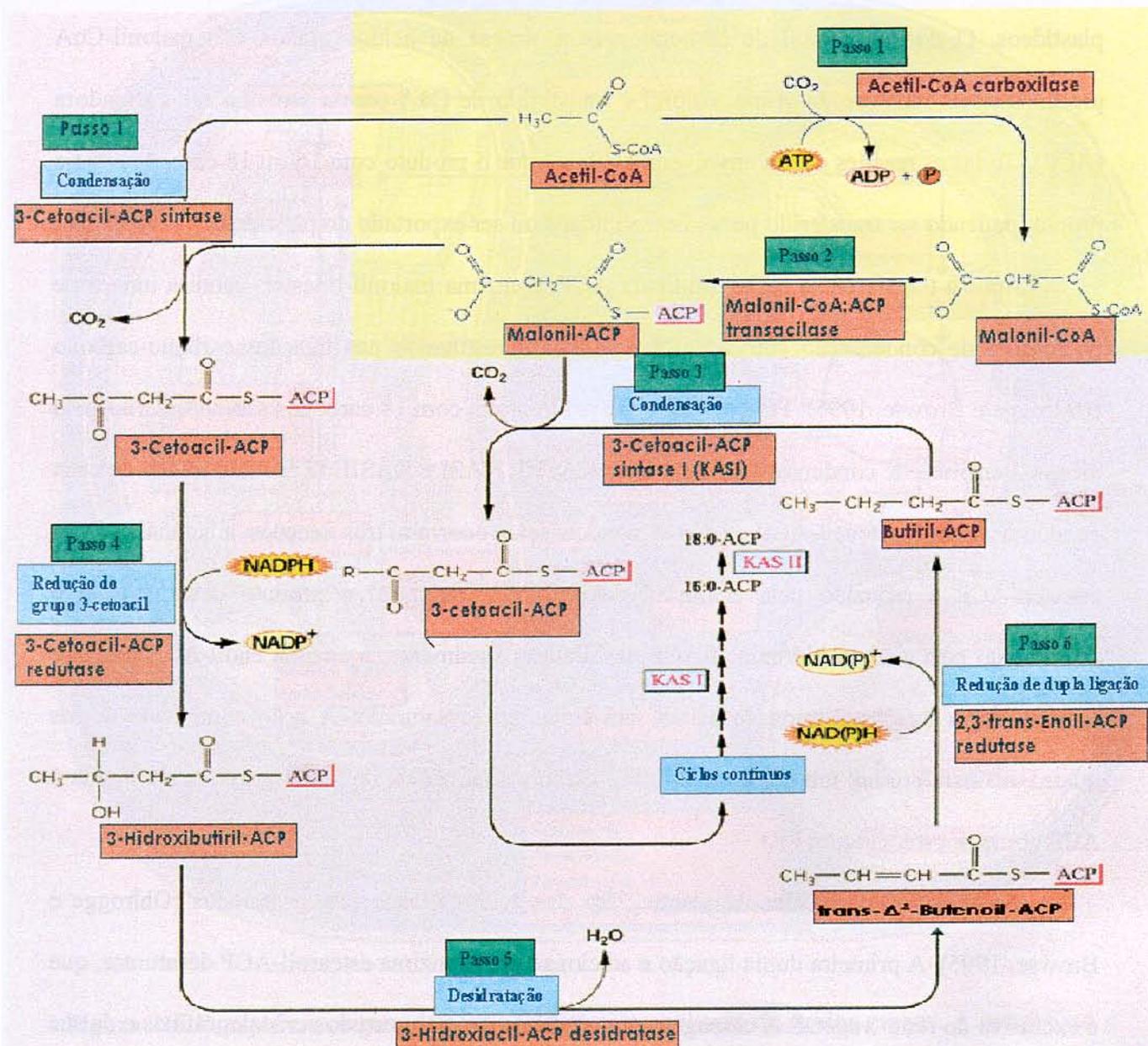


Figura 3R. Visão geral da síntese de um ácido graxo composto por 18 carbonos (18:0), mostrando a entrada de malonil-CoA e as reações catalisadas por enzimas para a síntese deste ácido graxo.

O conhecimento das vias de biossíntese de ácidos graxos em plantas tem aumentado nos últimos anos (Ohlrogge *et al.*, 1991; Murphy, 1993). Vários genes e cDNAs de enzimas que atuam na via de biossíntese de óleo em plantas já foram clonados. A clonagem de genes com a produção de cDNA para a enzima ACCase para várias espécies de plantas (Töpfer e Martini, 1994), inclusive em milho (Egli *et al.*, 1993a; 1993b; 1995) já foi publicada. O mesmo tem sido verificado para a proteína ACP, cujos genes que a codifica já foram clonados e cDNAs sintetizados para várias espécies de plantas (Töpfer e Martini, 1994), inclusive para milho (Souciet e Weil, 1992). Para as enzimas KAS, que catalisam as reações de condensação na via de biossíntese de óleo em espinafre (Tai e Jaworski, 1993), em *Cuphea wrightii* (Slabaugh *et al.*, 1993) em cevada (Kauppinen, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992) em *Ricinus communis* (Genez, 1993) genes foram clonados e cDNAs sintetizados. Os genes para 3-cetoacil-ACP-redutase em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (Slabas e Fawcett, 1992) e *Cuphea lanceolata* (Klein *et al.*, 1992; Klein e Töpfer, 1992) já foram clonados. A segunda reação da via de biossíntese de ácidos graxos é catalisada pela enoil-ACP redutase, um gene foi isolado e cDNA já foi produzido para esta enzima em *Brassica napus* (Stuitje *et al.*, 1993). O gene para a enzima acil-ACP desaturase também já foi clonado em feijão (Shanklin e Somerville, 1991).

A quantidade de óleo em diferentes espécies de plantas pode variar largamente indo de 1% a 60% do peso seco total da semente (Ohlrogge e Browse, 1995). A composição de ácidos graxos do óleo estocado é muito variável e mais de 300 diferentes ácidos graxos são encontrados em TAG de sementes (van de Loo *et al.*, 1993). A cadeia carbônica destes ácidos graxos varia de oito a mais de 22 carbonos. O número e a posição de duplas ligações podem ser diferentes, sendo que vários grupos (hidroxil ou epoxi) podem ser adicionados à cadeia acil (Ohlrogge e Browse, 1995).

Em quase todas as espécies de plantas a forma química de estocagem do óleo é o TAG, servindo como a forma mais importante de estoque de carbono (Ohlrogge e Browse, 1995). Na semente madura TAG é estocado em corpos lipídicos esféricos densamente empacotados com um diâmetro de 1 μ M (Huang, 1992; Murphy, 1993; Herman, 1994). O tamanho não muda durante o desenvolvimento das sementes, o acúmulo de óleo é acompanhado por um aumento do número destas organelas. Cada corpo oleoso possui uma matriz de TAG, que corresponde a 95% do peso destes corpos. Estes corpos são rodeados por uma monocamada de fosfolipídeos na qual se encontram embebidas proteínas denominadas oleosinas. As oleosinas são proteínas alcalinas de baixo peso molecular, sendo que elas estão presentes nas sementes em diferentes formas moleculares denominadas isoformas. Estas proteínas estabilizam os corpos de óleo, uma vez que elas interagem com a superfície dos fosfolipídeos e com a matriz de TAG, formando uma estável camada anfipática na superfície destes corpos. Outro papel atribuído a esta proteína, é a sua atuação como sítio de reconhecimento e de ligação específica de lípases durante a germinação de sementes (Huang, 1992).

Em milho existem proteínas oleosinas denominadas OLE 18, OLE 17 e OLE 16. Uma comparação das seqüências genômicas dos genes para estas três oleosinas já foi realizada, bem como uma comparação de suas seqüências deduzidas de aminoácidos já foi obtida (Lee e Huang, 1994). Estes genes são expressos em embriões e na camada de aleurona (Qu e Huang, 1990), sendo que a quantidade de transcrito foi maior entre 20 a 25 dias após a polinização (DAP); o valor máximo da proteína foi observado em 25 a 30 DAP. A localização para os genes de oleosina foi investigada utilizando RFLP, *ole 16* foi mapeado como gene de cópia única, estando localizado próximo ao gene *b1* no cromossomo 2; o *ole 18* também apresenta cópia única e está

localizado no braço curto do cromossomo 5, próximo ao gene *phya 2*; já a localização de *ole 17* foi predita para o cromossomo 1 próximo a *phya 1* (Lee e Huang, 1994).

Estudos da fisiologia de biossíntese de óleo podem ajudar no entendimento detalhado da regulação desta via, podendo melhorar em particular, a produção de lipídeo em cereais. A principal diferença fisiológica entre milho que apresenta alto e baixo teor de óleo é o tamanho do embrião (Curtis *et al.*, 1968; Dudley *et al.*, 1977), pois ele é o sítio primário de estocagem de óleo (Inglett, 1970; Doehlert, 1990). Estudos comparando propriedades metabólicas de semente de milho, com genótipos amplamente divergentes para proteína, amido e óleo, mostraram que diferentes atividades de enzimas estão associadas com acúmulo dos diferentes produtos de estocagem. A atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) em embriões isolados, foi correlacionada com a concentração de óleo em embriões; isto pode ser devido a um aumento no requerimento respiratório para a síntese de óleo. As enzimas sacarose sintase (SS), uridina difosfato-glicose piro fosforilase (UDPG), fosfoglicoisomerase (PGI), fosfofrutoquinase (PFK) e aldolase (ALDO) também foram relacionadas com o conteúdo de óleo.

A medida da atividade de enzimas indicou que não há uniformidade na distribuição destas dentro da semente (Doehlert *et al.*, 1988), mas que pode existir uma associação da atividade de enzimas específicas com os produtos de estocagem dentro da semente. Doehlert (1990), avaliou a atividade de 15 enzimas do metabolismo de açúcar e aminoácidos. As análises estatísticas sugeriram que a atividade das enzimas glicoquinase, frutoquinase e fosfofrutoquinase foi primariamente associada com o conteúdo de óleo. Os resultados desse trabalho sugerem também que a biossíntese de óleo utiliza a degradação de sacarose mediada pela invertase, em uma via que não requer fosfato. A seleção para concentração divergente para amido, óleo e proteína em sementes, tem resultado em atividades fisiológicas diferenciais associadas com cada um dos diferentes produtos de estocagem (Doehlert, 1990).

O conhecimento sobre a biossíntese de ácidos graxos em plantas tem aumentado substancialmente (Harwood, 1988; Ohlrogge *et al.*, 1991; Murphy, 1993). Mas apesar do progresso nesses estudos, o conhecimento sobre os genes que atuam nas vias metabólicas de biossíntese de lipídeos e compostos relacionados em plantas, está apenas sendo iniciado, pois esta é uma via bastante complexa. Uma estratégia para conhecer os genes envolvidos com determinada via metabólica, requer primeiramente o mapeamento de seqüências do genoma, associando as com o caráter em estudo. QTLs ligados em um intervalo podem ser separados por futura recombinação ou por mapeamento de fina escala. Este nível de resolução pode ser suficiente para utilizarmos QTLs em programas de cruzamentos seletivos, mas ainda não se consegue associar diferenças alélicas em um só loco como responsáveis por diferenças no fenótipo de um caráter quantitativo. Existe duas formas de identificar um gene detectado como um QTL em uma região particular do genoma, isto pode ser feito através de clonagem posicional e através de associação de variação no fenótipo do caráter quantitativo com marcadores polimórficos na mesma região em locos candidatos. Quando locos com função conhecida e relacionados com o fenótipo, podem ser identificados e clonados nestas regiões, eles são denominados genes candidatos. O procedimento para confirmar a idéia do envolvimento deste loco com o caráter é pesquisar a associação dos fenótipos com o polimorfismo molecular para este loco candidato. Para propor um gene candidato como atuante em caracteres quantitativos, há necessidade de relacionar este loco relevante com a expressão do caráter. Os genes candidatos podem ser aqueles envolvidos nas vias bioquímicas que atuam sobre um fenótipo de interesse. Com um clone em mãos, podemos fazer o seu seqüenciá-lo, estudar sua expressão diferencial em diferentes tecidos e em diferentes estágios de desenvolvimento e isolar seqüências homólogas a ele tanto em outras espécies como em outras populações. Portanto, quanto maior o nível de

conhecimento sobre as vias metabólicas de biossíntese de óleo, mais precisas poderão ser as inferências sobre a associação entre a região mapeada e o loco candidato.

2.3- Teor de óleo em milho

O melhoramento para concentração de proteína, óleo, amido, bem como o melhoramento para os caracteres físicos dos grãos de milho é importante para aumentar o valor comercial deste cereal (Letchworth e Lambert, 1998). Quando o milho apresenta concentração de óleo maior que 6% na semente, ele é comercialmente considerado como cultivar de milho com alto teor de óleo. Normalmente o valor convencional para teor de óleo em cultivares de milho estende-se de 3,5% a 5,0%. É estimado que de 80% a 84% deste óleo esteja armazenado no embrião, 12% na aleurona e 5% no endosperma (Watson, 1987).

O caráter teor de óleo em milho é controlado por múltiplos locos, que apresentam diferentes efeitos sobre a característica. Uma substancial variação na concentração de óleo na semente de milho tem sido observada entre diferentes linhagens; esta variação é explicada por herança quantitativa (Dudley *et al.*, 1974; Dudley, 1977). A variação exibida para este caráter estende-se de 0,5% a até mais que 20% de óleo nos grãos (Dudley e Lambert, 1992).

Frente à grande variação observada para o caráter teor de óleo em milho, programas de melhoramento foram desenvolvidos para produzir híbridos com alto teor de óleo nas sementes. O primeiro experimento de seleção realizado para milho, com o objetivo de melhorar a composição química das sementes, foi iniciado em 1896 por C. G. Hopkins na Universidade de Illinois. A seleção foi realizada para a concentração de óleo e de proteína nas sementes, utilizando-se a população de polinização aberta *Burr's White* (Hopkins, 1899). Após 90 gerações de seleção, o teor de óleo nas sementes aumentou de 4,7% para 19,3%, sendo esta população denominada de

Illinois High Oil (IHO). Um dos objetivos deste programa de seleção, foi o desenvolvimento de linhagens com alto teor de óleo para usá-las na produção de híbridos. Os híbridos desenvolvidos a partir de algumas linhagens selecionadas para alto teor de óleo, apresentaram somente um ligeiro aumento no valor de óleo. Mas para estes híbridos, a produção média de grãos foi reduzida em cerca de 5% a 10% quando comparados com híbridos normais. Quando linhagens IHO são incluídas como material genético em um novo projeto de cruzamentos, existe grande dificuldade para o desenvolvimento de linhagens que apresente desempenho superior na combinação de híbridos (Lambert, 1994). A seleção para baixo conteúdo de óleo na semente cessou após 87 gerações, pois nenhum progresso foi observado durante os 20 últimos ciclos de seleção. Após 87 gerações de seleção para diminuir o conteúdo de óleo, houve redução da porcentagem de óleo de 4,7% para menos que 1,0%; esta população foi denominada de *Illinois Low Oil* (ILO). As populações IHO e ILO apresentam grande variação quando comparadas com outros materiais. Nos materiais típicos do *Corn Belt* americano, o conteúdo de óleo varia de 2,5% a 5,5%, sendo que para os híbridos comerciais a variação está entre 4,0% e 4,5% (Dudley e Lambert, 1992).

Além do programa de melhoramento para desenvolver milho com alto teor de óleo utilizando a população *Burr's White*, vários outros foram desenvolvidos a partir do final da década de 40, tanto em instituições públicas como em companhias comerciais (Jugenheimer, 1961, Alexander e Creech, 1977; Weber, 1987; Alexander, 1988). O objetivo desses programas foi o desenvolvimento de linhagens com alto teor de óleo para a produção de híbridos. A maioria dos programas produziram milho híbrido com um valor de óleo entre 6,0% e 7,0%. Também foi desenvolvido um programa de melhoramento de populações através de seleção recorrente para aumentar a porcentagem de óleo na semente. Nesse programa foi utilizado um sintético, com objetivo de desenvolver fontes de germoplasma diferentes da população IHO. Neste programa,

através do uso de seleção recorrente fenotípica, realizada por vários ciclos, fez-se seleção para aumentar a concentração de óleo (Bauman *et al.*, 1963; Alexander *et al.*, 1967).

A estimativa do número de locos controlando o conteúdo de óleo em IHO e em ILO já foi realizada (Dudley, 1977; Dudley e Lambert, 1992; Moreno-Gonzalez *et al.*, 1975). Após 28 gerações de seleção para estas populações, foram estimados 33 locos atuando sobre o caráter teor de óleo e após 76 gerações de seleção o número estimado de locos foi de 54 (Dudley, 1977); após 90 gerações de seleção, estimou-se em 69 o número de locos que controlam o caráter (Dudley e Lambert, 1992). Portanto, à medida que os ciclos de seleção aumentaram, e que o progresso de seleção também aumentou para essas populações, a estimativa do número de locos controlando o teor de óleo também sofreu aumento. Isto ocorreu porque a estimativa do número de locos é decorrente do progresso de seleção e da variância genética aditiva. A primeira resposta à seleção é proveniente da variância genética aditiva da população. A taxa de resposta à seleção poderia diminuir gradualmente a medida que a variância aditiva diminui, mas após algumas gerações, nova variância proveniente de genes mutados começa contribuir para a resposta. Após algum tempo, todos os genes segregando na população estariam fixado pela seleção e, a resposta dependeria inteiramente das mutações acumuladas durante este processo. A resposta poderia então continuar em uma taxa constante indefinidamente. Não é esperado limite para a seleção quando a mutação afeta o caráter selecionado mas não a aptidão, como é o caso de seleção para conteúdo de óleo em milho (Falconer e Mackay, 1996). Esses resultados mostram que é possível grande aumento no conteúdo de óleo em milho (Lambert, 1994). A resposta contínua à seleção por várias gerações, bem como a resposta à seleção reversa em gerações avançadas, sugere que um grande número de locos segregantes estão envolvidos na herança de conteúdo de óleo em milho (Sprague *et al.*, 1952; Alexander, 1963; Dudley, 1977). Considerando que efeitos genéticos de dominância apreciável ou heterose não têm sido detectados quando linhagens são

cruzadas e, também, que não se observou depressão por endogamia, foi assumido que o caráter teor de óleo em milho está sob controle genético aditivo (Dudley, 1977; Silvela *et al.*, 1989).

Fatores ambientais podem afetar os valores de óleo em milho híbrido que apresentam alto teor, mas o efeito do genótipo no valor do conteúdo de óleo é muito maior. Jellum e Marion (1966) realizaram avaliações para teor de óleo ao longo de dois anos, em diferentes localidades e em diferentes períodos desses anos. Os resultados mostraram que o genótipo tem maior influência nos valores de óleo do que as condições ambientais. Isto justifica a alta herdabilidade estimada para este caráter. A média de diversas estimativas mostrou que o coeficiente de herdabilidade para este caráter é superior a 70% (El-Rouby e Penny, 1967; Moreno-Gonzalez *et al.*, 1975; Hallauer e Miranda Filho, 1988).

A principal diferença fisiológica entre milho com alto e baixo teor de óleo é o tamanho do embrião (Dudley *et al.*, 1977), uma vez que o embrião é o sítio primário de estocagem de óleo (Doehlert, 1990). As seleções iniciais para teor de óleo foram realizadas através de análise visual, relacionando o aumento no tamanho do embrião com o aumento para concentração de óleo. Uma forma mais eficiente e rápida para avaliar teor de óleo em sementes de milho foi desenvolvida através de espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NMR), esta técnica possibilitou a avaliação de um grande número de amostras para a concentração de óleo. Um impulso nos trabalhos de seleção e melhoramento para o caráter teor de óleo foi conseguido através do desenvolvimento de técnicas de avaliação deste componente químico sem que as sementes fossem destruídas. Através desta técnica de análise, pode-se trabalhar com uma só semente ou com um conjunto destas, obtendo-se os resultados rapidamente. Assim, o desenvolvimento e o uso desta técnica tem contribuído para a seleção e melhoramento da concentração de óleo em milho, permitindo o desenvolvimento de cultivares melhorados para o conteúdo de óleo (Alexander *et al.*, 1967; Henderson, 1976; Alexander, 1977).

Vários trabalhos têm apresentado a participação do efeito de xênia para o conteúdo de óleo (Bauman *et al.*, 1963; Curtis *et al.*, 1956; Alexander *et al.*, 1967; Alexander, 1977; Miller e Brimhall, 1951; Alexander e Lambert, 1968; Garwood *et al.*, 1970; Lambert, 1994). O efeito de xênia é definido como o efeito imediato dos genes do pólen no desenvolvimento de tecidos não maternos ou embriões e endosperma nas sementes. Miller e Brimhall (1951) concluíram que o óvulo representa a maior influência para a concentração de óleo na semente, mas o pólen apresenta um pequeno efeito. Alexander e Lambert (1968) descreveram que as mesmas plantas polinizadas pela população IHO apresentaram maior teor de óleo do que as polinizadas pela ILO. Letchworth e Lambert (1998) também observaram grande efeito do genótipo da planta mãe sobre o teor de óleo, mas concluíram que o pólen afetou significativamente esse caráter. Assim, somente quando a polinização para desenvolvimento de híbridos é feita de forma controlada, pode-se fazer uma estimativa do conteúdo de óleo. Em polinizações abertas, o teor de óleo de híbridos que apresentam baixo conteúdo desse componente aumentará quando polinizados com material que apresenta alto teor de óleo, híbridos que apresentam alto teor terão a sua concentração reduzida em função de efeito de xênia quando polinizados com material que apresente baixo teor de óleo (Lambert, 1994).

Apesar de existir variação genética suficiente para o desenvolvimento de híbridos que apresentam alto teor de óleo, a variação de óleo para os híbridos comerciais está entre 4,0% e 4,5% (Dudley e Lambert, 1992). Os valores fenotípicos de diferentes caracteres no mesmo indivíduo muitas vezes podem estar correlacionados, esta correlação entre dois caracteres pode originar como resultante de uma complexa via bioquímica, tanto para o desenvolvimento como regulatória. Um só gene quase sempre influenciará múltiplos caracteres através de um fenômeno conhecido como pleiotropia (Wright, 1968). Existe uma correlação negativa entre teor de óleo e produtividade de grãos, os alelos que melhoram para o caráter teor de óleo parecem ser

desvantajosos para produção de grãos, isto é existe efeito pleiotrópico entre estes dois caracteres. Estimativas negativas entre o teor de óleo nas sementes e produtividade foram obtidas por Miller e Brimhall (1951), Alexander (1962), Dudley *et al.* (1974; 1977) e Lambert *et al.* (1997), sendo esse o principal fator que limita a difusão do uso de milho híbrido com alto conteúdo de óleo. Em geral, a produtividade de grãos de híbridos com alto teor de óleo decresce quando os níveis são maiores que 8% de óleo (Dudley *et al.*, 1974; Miller *et al.*, 1981). A correlação negativa entre estes dois caracteres, é devida ao fato de que a síntese de uma determinada quantidade de óleo, requer duas vezes mais energia que a utilizada para produzir a mesma quantidade de amido (Alexander e Lambert, 1968).

O conhecimento da localização e do número dos locos que controlam a concentração de óleo e o peso de sementes em milho pode capacitar os melhoristas deste cereal a selecionar de forma mais eficiente híbridos que produzam alto teor de óleo e mantenham um nível adequado de produtividade, este conhecimento é importante pois estes dois caracteres parecem apresentar pleiotropia. O óleo e o amido são os principais componentes da semente, portanto não é surpreendente que aumento no teor de óleo seja acompanhado por decréscimo na deposição de amido. Locos de RFLP foram associados com o teor de óleo e com o amido, sendo associados de forma inversa com o conteúdo de óleo e peso de sementes (Berke e Rocheford, 1995). Nesse estudo, também foram mapeados locos associados independentemente com teor de óleo e peso de sementes. Os principais QTLs associados com a concentração de óleo não foram associados com mudança no peso de sementes; este fato é importante, pois mostra que a seleção para aumentar a concentração de óleo na semente pode ser realizada sem alterar o peso destas.

2.4- Marcadores moleculares e mapa genético

2.4-1 Aspectos gerais dos marcadores moleculares

Falconer e Mackay (1996) descrevem que a maioria dos caracteres de interesse agrônômico não apresentam classes fenotípicas distintas, sendo denominados de quantitativos. Dada a natureza contínua da variação dos caracteres quantitativos, o seu estudo deve ser iniciado pela distribuição de frequências originadas pelo caráter. Tal distribuição é caracterizada por parâmetros estatísticos, sendo a média e a variância os mais importantes. A variação contínua pode ser explicada pela ação conjunta de muitos genes, cada um com pequeno efeito sobre o caráter, os quais são denominados de poligenes. Estes genes podem sofrer maior ou menor ação de efeitos ambientais. Segmentos de DNA que contém locos gênicos associados ao controle de caracteres quantitativos são denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Um QTL é um segmento do cromossomo que afeta uma determinada característica, não sendo necessariamente um único gene (Falconer e Mackay, 1996).

Os primeiros trabalhos associando caracteres quantitativos com marcadores fizeram uso de marcas morfológicas (Sax, 1923): No entanto, o uso desses marcadores tornou-se limitado para a construção de mapas genéticos, pois são pouco polimórficos, sendo que um número reduzido deles estão disponíveis. Para suprir a deficiência de marcadores, novas classes foram desenvolvidas. O primeiro marcador molecular usado foi isozimas, que são proteínas variantes detectadas por diferença na migração em géis de amido em um campo elétrico. Este marcador foi extensivamente usado a partir do final da década de 60, mas apresenta um pequeno número de locos e um alto custo quando um grande número de indivíduos são avaliados (Lynch e Walsh, 1997). Com o desenvolvimento das técnicas modernas de biologia molecular, tornou-se possível

detectar variação genética diretamente em nível de DNA. Este fato foi importante, pois um grande número de marcadores moleculares tornou-se disponível para as espécies de interesse econômico, assim substituindo as isozimas (Lynch e Walsh, 1997).

O primeiro marcador molecular a ser utilizado para detectar variação genética em nível de DNA foi o *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980). Esta técnica é baseada na digestão do DNA genômico por várias enzimas de restrição. O polimorfismo é criado por exemplo quando mutações de ponto, inserções e deleções ocorrem, estes eventos determinam o aparecimento ou a perda de sítios de restrição. Os fragmentos digeridos são separados em gel de agarose e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A separação da seqüência polimórfica específica do restante do DNA genômico é realizada através da hibridização desta membrana com sondas de DNA marcadas. O resultado é observado em autoradiografia após exposição com a membrana marcada.

O marcador RFLP é importante, pois este apresenta herança codominante, sendo possível a identificação de indivíduos homocigotos e heterocigotos na população. Para as culturas de interesse econômico um grande número de sondas estão disponíveis, com a vantagem também de reprodutibilidade dos resultados obtidos. Em função dessas qualidades, o RFLP tem sido extensivamente usado na construção de mapas genéticos para muitas espécies cultivadas. Esta é a mais importante classe de marcador codominante em plantas. Mapas genéticos baseados no marcador RFLP têm sido construídos para trigo (Blanco *et al.*, 1998), sorgo (Dufour *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999), arroz (Korzun *et al.*, 1996; Loarce *et al.*, 1996) e outros vegetais. Em citrus, este marcador foi utilizado junto com outros marcadores para construção do maior mapa de ligação divulgado (Cai *et al.*, 1994). Em milho, mapas construídos com RFLP foram publicados por Coe *et al.* (1987), Burr *et al.* (1988) e Coe *et al.* (1995). Alguns grupos têm produzido mapas genéticos construídos com RFLP em milho e estes mapas foram utilizados com o objetivo de

mapear QTLs de interesse econômico (Beavis e Grant, 1991; Edwards *et al.*, 1992; Pe *et al.*, 1993; Ajmone-Marsan *et al.*, 1994; Sari-Gorla *et al.*, 1994; Veldboom e Lee, 1994; Veldboom *et al.*, 1994; Causse *et al.*, 1995; Agrama e Moussa, 1996; Austin e Lee, 1996a; 1996b; Bohn *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 1996; Lubberstedt *et al.*, 1997; Khairallah *et al.*, 1998 e Kraja e Dudley 2000).

Apesar do marcador RFLP ser usado para a construção de mapas genéticos para muitas espécies, esta técnica apresenta algumas desvantagens frente a outros marcadores. O primeiro fator limitante para o uso de RFLP como marcador é a ausência de bibliotecas de sondas para as espécies pouco estudadas. Esta técnica também é muito trabalhosa envolvendo várias etapas até a obtenção do resultado final, envolve alto custo e geralmente requer o uso de radioisótopos. Para o desenvolvimento desta técnica, uma grande quantidade de DNA de alta pureza se faz necessária; além disso, é uma técnica que não é passível de ser automatizada (Newbury e Ford-Lloyd, 1993). Ainda para outros organismos, o progresso do uso deste marcador é lento, pois o nível de polimorfismo tem sido baixo (Wu e Tanksley, 1993).

Com o desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mullis e Faloona, 1987), uma nova série de marcadores foi desenvolvida. A PCR foi a base para o desenvolvimento do marcador *Random Amplified Polymorphic DNAs* (RAPD) (Williams *et al.*, 1990). Este marcador faz uso de oligonucleotídeos com seqüência casual de bases como *primers* para a amplificação do DNA genômico. A técnica de RAPD baseia-se na amplificação de seqüências de DNA que são flanqueadas por duas regiões complementares aos *primers* utilizados. Para que um fragmento de DNA seja amplificado, estas duas regiões têm que estar a uma distância de até 2.000 pares de bases. Os produtos de amplificação são analisados em gel de agarose tratado com brometo de etídio. O polimorfismo para o RAPD é proveniente de mutações de ponto, deleções na região de pareamento do *primer* ou de inserções entre essas regiões que

impossibilitam a amplificação. Uma vez que o segmento de DNA é ou não amplificado, este é um marcador dominante na maioria dos casos estudados.

A simplicidade e rapidez da técnica de RAPD, a pequena quantidade de DNA necessária para a análise e o fato de RAPD usar *primers* aleatórios, tornando esta técnica aplicável para qualquer organismo, permitiram rápida difusão da mesma, com ampla utilização em análises genéticas, superando as muitas limitações da técnica de RFLP (Rafalski *et al.*, 1991, Waugh *et al.*, 1992). Outra vantagem de RAPD sobre RFLP é que um só *primer* de seqüência aleatória pode revelar vários locos em uma reação, cada um correspondendo a diferentes regiões do genoma. O marcador RAPD tem sido usado para a identificação de cultivares (Hu e Quiros, 1991), nos estudos filogenéticos e genealógicos (Heun e Helantjaris, 1993), na construção de mapas genéticos (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1991; Cai *et al.*, 1994) e para mensurar a similaridade genética e/ou diversidade genética no melhoramento (Lanza *et al.*, 1997). As desvantagens deste marcador é a sua baixa reprodutibilidade e também a não identificação da classe de heterozigoto, uma vez que este marcador é codominante, isto é, um segmento de DNA será ou não amplificado,

O genoma de eucariotos apresenta várias classes de seqüências de bases repetidas, e uma destas consiste de curtos motivos. Estes motivos são repetições em *tandem* de um a seis pares de bases (pb); dentre estes, as repetições de dinucleotídeos são as mais abundantes. Essas seqüências podem diferir no número de repetições entre os diferentes indivíduos (Schlötterer, 2000), as quais se distribuem aleatoriamente através do genoma (Jacob *et al.*, 1991). Com o advento da técnica de PCR, as propriedades de DNA microsatélites foram convertidas em um marcador genético altamente versátil. Estes marcadores foram denominados microsatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989).

Recentemente microssatélites têm sido usados como marcadores moleculares, pois eles são altamente polimórficos e podem ser amplificados por PCR. Gupta *et al.* (1996) descreveram que o marcador microssatélite é uma técnica baseada na amplificação das seqüências repetidas. As seqüências de DNA que flanqueiam a região variável dos SSRs são conservadas e são utilizadas para sintetizar *primers* (Schlötterer, 2000). Esse par de *primers* é utilizado para a amplificação dos locos de SSR. O polimorfismo é detectado quando existe diferença no produto amplificado. Esta diferença leva a produtos de amplificação com variação no comprimento (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989). Após a amplificação através de PCR, os produtos da amplificação de locos de SSR podem ser separados através de eletroforese em géis de agarose de alta resolução. Para a detecção de pequenas diferenças nos produtos de amplificação utilizam-se preferencialmente géis de poliacrilamida corados com prata. Os resultados também podem ser analisados em autoradiografias quando os produtos de SSR são marcados com isótopos radioativos. Amplificação de diferentes locos pode ser realizada através de PCR multiplex. Este tipo de avaliação é possível graças ao uso de corantes fluorescentes específicos para cada par de *primer* usado na amplificação dos diferentes locos de SSRs (Gupta *et al.*, 1996). Cada fragmento produzido através da amplificação, separado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), ou em gel de agarose de alta resolução (Becker e Heun, 1995), representa um alelo do loco (Gupta *et al.*, 1996).

A hipervariabilidade de microssatélites não é totalmente entendida, podendo ser originada através de *crossing-over* desigual ou deslizamento de seqüências durante a replicação do DNA. Durante a replicação do DNA, a fita nova pareia-se com a fita molde. Se o pareamento for feito com uma repetição errada na outra fita, a DNA polimerase pode adicionar ou deletar uma ou mais cópias da repetição na nova fita de DNA em um processo conhecido como *slippage* (Tautz *et al.*, 1986). Estes eventos podem resultar em variação do número de cópias da unidade básica

de repetição (Schlötterer e Tautz, 1992). Evolutivamente o DNA microssatélite é muito importante como marcador em função de sua altíssima taxa de mutação. É 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder uma repetição de uma geração para a próxima, do que o gene para hemoglobina sofrer mutação em uma única base, promovendo a desordem denominada anemia falciforme. Um microssatélite pode retornar ao seu estado de comprimento original dentro de poucas gerações (Moxon e Wills, 1999).

O extensivo uso de microssatélites para estudos de variação genética ocorre em função da sua abundância, hipervariabilidade no comprimento de seus alelos, distribuição casual nos diversos genomas e à pequena quantidade de DNA que é usada para a amplificação e subsequente análise (Kun-Sheng e Tanksley, 1993). Os microssatélites ocorrem freqüentemente e randomicamente em todo o DNA de eucarionte examinado (Beckmann e Soller, 1990), representando uma vasta fonte de marcadores altamente informativos (Zhao e Kochert, 1992; 1993). Trata-se de um marcador codominante apresentando segregação mendeliana simples e graças à sua hipervariabilidade, ele é um importante marcador para o mapeamento genético de espécies com pouco polimorfismo intraespecífico, como é o caso da maioria das espécies autógamas (Röder *et al.*, 1995).

Os microssatélites têm sido usados para análise genética em espécies de mamíferos (Moran, 1993), de insetos (Hughes e Queller, 1993), aves (Moran, 1993), peixes (Rico *et al.*, 1993), camundongo (Kondo *et al.*, 1993), gado (Bishop *et al.*, 1994) e plantas (Condit e Hubbell, 1991; Zhao e Kochert, 1992; 1993; Akkaya *et al.*, 1992; Vosman *et al.*, 1992; Langercrantz *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994; Röder *et al.*, 1995).

A maior limitação do método é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam as repetições. Para a obtenção destes *primers* há a necessidade da construção de bibliotecas

genômicas e do seqüenciamento de DNA em larga escala, um investimento inicial que é alto e requer infra-estrutura especializada de laboratório (Chin *et al.*, 1996).

Outra técnica utilizando PCR, é uma classe recente de marcadores denominada *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP). AFLP é uma técnica, na qual o polimorfismo é detectado após PCR. Esta técnica combina variações obtidas em sítios de restrição, iguais às variações obtidas em RFLP, com a amplificação exponencial dos sistemas baseados em PCR (Vos *et al.*, 1995; Lin e Kuo, 1995). A técnica é baseada em digestão simultânea do DNA genômico com enzimas de restrição, sendo que as mais comuns são a *EcoR I* e *Mse I*. Aos fragmentos de digestão são ligados adaptadores específicos. Estes adaptadores possuem seqüências específicas e são ligados às extremidades coesivas dos sítios de restrição, cada adaptador possuindo seqüências específicas para diferentes *primers* complementares. Esses *primers* contém ainda de um a três nucleotídeos adicionais na sua extremidade 3'. Assim, somente os fragmentos que possuem sítios de restrição para as enzimas utilizadas são amplificados. Uma população de fragmentos amplificados será separada em gel de poliacrilamida de alta resolução. A detecção dos fragmentos amplificados é feita pela marcação radioativa ou fluorescente de um dos *primers* seletivos.

Em um único gel de AFLP, pode-se encontrar até 100 bandas polimórficas. Dessa forma, a tecnologia de AFLP é considerada uma eficiente pesquisa para a geração de marcadores (Powell *et al.*, 1996; Pejic *et al.*, 1998). Esta técnica apresenta alta resolução e reprodutibilidade. O aumento de reprodutibilidade ocorre em função da utilização de *primer* específico ao adaptador utilizado, de forma que a condição de anelamento do *primer* pode ser mais estrigente aumentando a especificidade da reação (Vos *et al.*, 1995).

O marcador AFLP vem sendo utilizado para desenvolver mapas genéticos em várias espécies de vegetais (Maheswaran *et al.*, 1997; Alonso-Blanco *et al.*, 1998; Castiglioni *et al.*,

1998), incluindo o milho (Castiglione *et al.*, 1999; Vuylsteke *et al.*, 1999; Ajmone-Marsan *et al.*, 2001). Este marcador também tem sido usado para aumentar a saturação em regiões próximas de locos de interesse, como por exemplo para propiciar a clonagem de genes de resistência a patógenos em plantas (Meksem *et al.*, 1995; Rouppe van der Voort *et al.*, 1997).

2.4-2 Microsatélites em vegetais

Os estudos realizados indicaram que os microsatélites podem ser também característicos de genomas de plantas, mas pesquisas em bases de dados têm mostrado que eles são 5 vezes menos abundantes nestes genomas do que em animais. Análises revelaram que as repetições nos diferentes microsatélites de plantas e animais diferem consideravelmente (Morgante e Olivieri, 1993). O tipo de motivo das repetições e o grau de polimorfismo podem variar de uma espécie para outra. A repetição (CA)_n é uma das que ocorre com maior frequência em humanos e em muitos mamíferos (Hamada *et al.*, 1982; Beckmann e Weber, 1992), mas é relativamente menos freqüente em genoma de plantas (Langercrantz *et al.*, 1993). Em microsatélites de plantas a repetição (AT)_n é o dinucleotídeo mais comum. Entretanto, a maior abundância da repetição (GA)_n do que a repetição (CA)_n parece ser um aspecto consistente de genoma vegetal (Akkaya *et al.*, 1992; Bell e Ecker, 1994). Quando a frequência destes dois tipos de repetições é avaliada no genoma de arroz, (CA)_n é mais freqüente que (GA)_n (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), o mesmo ocorrendo para o genoma de trigo (Panaud *et al.*, 1995; Röder *et al.*, 1995). Em *Pinus radiata* os di-nucleotídeos (CA)₁₀ e (GA)₁₀ foram os microsatélites mais abundantes, o que contraria a informação de que a repetição (AT)_n é a mais comum em vegetais (Smith e Devey, 1994). Motivos com trinucleotídeos e tetranucleotídeos também são observados em genomas de

vegetais sendo os mais freqüentes o (AAG)_n e o (AAT)_n (Langercrantz *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994).

A aplicação de SSRs em pesquisas com vegetais é um processo relativamente recente (Bell e Ecker, 1994; Morgante *et al.*, 1994; Cregan *et al.*, 1994). O primeiro estudo publicado descrevendo SSR em genoma de vegetal, mostrou que este tipo de seqüência ocorre em alta freqüência em genoma de espécies de vegetais (Condit e Hubbell, 1991). Em poucos anos, locos de microssatélites foram descritos para uma grande variedade de espécies de vegetais, havendo aumento no desenvolvimento e identificação de *primers* para SSRs para várias espécies tais como soja (Rongwen *et al.*, 1995); arroz (Zhao e Rochert, 1993; Wu e Tanksley, 1993; Panaud *et al.*, 1996); milho (Senior e Heun, 1993; Taramino e Tingey, 1996; Senior *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1996); *Brassica* (Langercrantz *et al.*, 1993); trigo (Röder *et al.*, 1995); *Arabidopsis* (Bell e Ecker, 1994); árvores tropicais (Condit e Hubbell, 1991); uva (Thomas e Scott, 1993); cevada (Shagai-Marroof *et al.*, 1994); *Pinus radiata* (Smith e Devey, 1994) e em tomate (Vosman e Arens, 1997). Mapas genéticos estão sendo desenvolvidos para essas espécies (Bryan *et al.*, 1997; Röder *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1996; Taramino e Tingey, 1996; Milbourne *et al.*, 1998; Akkaya *et al.*, 1995; Cregan *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1997; McCouch *et al.*, 1997). Para algumas espécies vegetais, esses marcadores estão sendo utilizados juntamente com outros para a construção de mapas genéticos mais saturados (Nachit *et al.*, 2001; Korzun *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001).

Senior e Heun (1993) estudaram a presença e a herança de microssatélites em milho. Os resultados desse trabalho mostraram que SSR para essa espécie apresenta polimorfismo semelhante ao encontrado para o marcador RFLP. Para esse genoma uma relativa abundância de diferentes motivos de repetições foi observada, sendo o dinucleotídeo (AG)_n o mais encontrado (Chin *et al.*, 1996), mas uma baixa freqüência das repetições (AC)_n tem sido encontrada. Dentre

os trinucleotídeos, os mais comuns foram (TTG)_n, (TTC)_n, (CCT)_n e (CCG)_n. A distribuição de SSR através do genoma de milho parece ocorrer de forma casual (Taramino e Tingey, 1996; Senior *et al.*, 1996).

Atualmente um total de 1.855 pares de *primers* para microssatélites já estão disponíveis para milho na *Maize DB* (<http://www.agron.missouri.edu>). Esta base de dados tem se expandido rapidamente, aumentando o número de locos de microssatélites e possibilitando assim aumento na cobertura do genoma deste cereal. Este sistema aberto e acessível onde locos adicionais podem ser incorporados rotineiramente, aliado com as qualidades já descritas, tornam este marcador ideal para estudos que requerem análises de um grande número de amostras, tais como o estudo de caracteres quantitativos.

2.4-3 Mapa genético

O mapeamento genético de organismos superiores é possível porque o genoma é organizado e transmitido como unidades lineares denominadas cromossomos (Guimarães e Moreira, 1999). Os mapas genéticos apresentam a ordem dos locos ao longo do cromossomo e a relativa distância entre eles. Estes mapas são essenciais para a localização de QTLs. Com o desenvolvimento de marcadores moleculares, temos atualmente mapas genéticos para humanos, animais e plantas de interesse econômico.

Para a construção do mapa genético deve ser estabelecida tanto a posição dos marcadores como a distância entre eles (Lynch e Walsh, 1997). Os marcadores utilizados no mapeamento devem ser polimórficos entre os parentais e apresentar segregação mendeliana esperada para a progênie. Os mapas são construídos com base em análises de segregação dos marcadores em populações que apresentam desequilíbrio de ligação. A distância entre os marcadores é obtida

através da frequência de recombinação, que estima a probabilidade de ocorrência de permuta genética entre dois marcadores. Esta medida não é aditiva, pois ocorre interferência, isto é, a ocorrência de uma permuta genética afeta a ocorrência de outras permutas em regiões adjacentes. A distância de mapeamento, que é expressa em centiMorgans (cM), é calculada com base na frequência de recombinação através de funções de mapeamento. Estas predizem o número de *crossing-over* a partir da frequência de recombinação observada. A função de Haldane (1919) assume que o *crossing-over* ocorra casualmente e de forma independente ao longo do cromossomo, isto é sem interferência. Além da função de Haldane outras também podem ser usadas. Uma função bastante usada é a de Kosambi (1944), que considera uma moderada interferência.

Não há uma relação universal entre distância de mapa e a distância física entre os locos. Dependendo da espécie de planta a quantidade de DNA que corresponde a 1 cM varia amplamente. Em *Arabidopsis* 1 cM equivale a 140 Kb (1 Kb = 1.000 pares de bases); em milho equivale a 2.000 Kb (Lynch e Walsh, 1997). Esta relação dentro de um mesmo cromossomo pode sofrer uma marcante diferença, principalmente próximo aos telômeros e centrômeros (True *et al.*, 1996). A taxa de recombinação está sob controle genético e alguns genes influenciam esta taxa ao longo de todo o genoma e outros em regiões específicas do cromossomo (Brooks, 1988).

O número de marcadores necessário para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação genética. Um mapa pode ser considerado satisfatório quando o número de grupos de ligação obtidos pela análise dos marcadores for igual ao número de cromossomos gaméticos do organismo e quando todos os marcadores genéticos mapeados estiverem ligados, indicando que todas as regiões do genoma estão representadas (Guimarães e Moreira, 1999).

Marcadores cuja segregação se apresenta estatisticamente correta através de um teste de qui-quadrado são agrupados com base na análise de dois pontos e, posteriormente, ordenados em cada grupo de ligação de acordo com análise de três pontos. Finalmente, a ordem correta dos marcadores dentro do grupo de ligação pode ser realizada através de análise multiponto. Como houve grande aumento do número de marcas utilizadas na construção dos mapas, também havendo aumento no número de indivíduos genotipados, houve a necessidade do desenvolvimento de vários algoritmos e programas computacionais para a construção de mapas genéticos, como o MapMaker (Lander *et al.*, 1987), o Gmendel (Liu e Knapp, 1992) e o JoinMap (Stam, 1993).

O primeiro mapa construído com marcadores moleculares para milho foi publicado por Helentjaris *et al.* (1986). Coe *et al.* (1987) e Burr *et al.* (1988) construíram mapas com RFLP usando uma população F_2 e um conjunto de linhagens recombinantes. Gardiner *et al.* (1993) adicionaram 214 locos ao mapa construído com esta população F_2 . Mais recentemente foi publicado um mapa composto, baseado em 4 populações de mapeamento contendo 275 locos (Causse *et al.*, 1996). Vários mapas genéticos de milho têm sido construídos utilizando RFLP. Estes mapas foram construídos com objetivo de mapear caracteres que apresentam herança quantitativa (Beavis e Grant, 1991; Edwards *et al.*, 1992; Pe *et al.*, 1993; Ajmone-Marsan *et al.*, 1994; Damerval *et al.*, 1994; Frova e Sari-Gorla, 1994; Quarrie *et al.*, 1994; Sari-Gorla *et al.*, 1994; Veldboom e Lee, 1994; Veldboom *et al.*, 1994; Causse *et al.*, 1995; Lebreton *et al.*, 1995; Agrama e Moussa, 1996; Austin e Lee, 1996a; 1996b; Bohn *et al.*, 1996; Byrne *et al.*, 1996; Lubberstedt *et al.*, 1997). Marcadores utilizando a técnica de PCR também já estão sendo utilizados na construção de mapas em milho (Taramino e Tingey, 1996; Castiglione *et al.*, 1999; Vuylsteke *et al.*, 1999; Ajmone-Marsan *et al.*, 2001). O mapa genético de milho já divulgado com maior saturação foi construído com 1.736 locos, dos quais 1.156 locos foram produzidos

por cDNA, 545 são clones genômicos randômicos, 16 são SSRs, 14 são isozimas e cinco são clones anônimos (Davies *et al.*, 1999).

2.5- Detecção e mapeamento de QTLs

Importantes características de espécies vegetais e animais usualmente estão sob o controle de muitos locos gênicos. Estas características são denominadas de poligênicas ou características quantitativas, apresentando variação contínua em função da segregação genotípica, dos efeitos ambientais e da interação genótipo-ambiente (Allard, 1961). Os estudos de características poligênicas inicialmente foram baseados em modelos que consideram a soma dos efeitos de todos os locos segregando independentemente (Falconer e Mackay, 1996). Com o desenvolvimento de marcadores moleculares tornou-se possível o monitoramento de regiões cromossômicas que afetam um caráter quantitativo, regiões essas denominadas de QTLs (Stuber *et al.*, 1987; Keim *et al.*, 1990).

A introdução da teoria para interpretar a ligação entre um marcador e QTLs descrita por Thoday (1961; 1979), juntamente com o desenvolvimento de marcadores moleculares, que permitem detectar variação genética diretamente em nível de DNA, contribuíram para a elaboração de métodos de análise baseados em marcadores (Lynch e Walsh, 1997).

A idéia inicial para mapear e caracterizar um QTL usando a informação do mapa é simples: através do cruzamento entre duas linhagens, desequilíbrio de ligação é criado entre os locos que diferem entre as linhagens. Este desequilíbrio cria associação entre o loco marcador e o QTL segregante. Vários delineamentos experimentais e metodologias estatísticas têm sido desenvolvidas para explorar este desequilíbrio. Os delineamentos mais usuais para as espécies cultivadas, baseiam-se no uso de populações segregantes F_2 , ou de retrocruzamentos, obtidas

através do cruzamento entre duas linhagens fenotipicamente divergentes para o carácter quantitativo em estudo.

Segundo Lynch e Walsh (1997), a associação marcador-QTL pode ser avaliada utilizando-se uma, duas ou mais marcas simultaneamente. No método de análise onde um só marcador é utilizado (análise de marcas simples), a distribuição do valor do carácter é examinada separadamente para cada loco marcador. Assim, cada teste de associação carácter-marcador é realizado independente da informação dos outros locos marcadores. Para um cromossomo com n marcas, n testes são realizados. A estratégia para detectar QTL nesta análise, é fundamentada na comparação entre os valores médios da característica associados com os diferentes genótipos marcadores. Uma diferença significativa entre as médias das classes genotípicas dos marcadores, indica a possibilidade da presença de pelo menos um QTL associado ao marcador. Quando o delineamento experimental apresenta somente duas classes genotípicas (exemplo em RC's), a comparação entre eles pode ser realizada através de teste t . Para os delineamentos experimentais onde mais que duas classes genotípicas de marcadores estão presentes, as comparações são realizadas usando testes padrão da teoria de modelos lineares, tais como teste F em ANAVAS ou regressão linear.

As informações obtidas em Lynch e Walsh (1997), mostram que a análise de marcas simples é escolhida quando o objetivo é a simples detecção de um QTL ligado a um marcador, sem existir a preocupação da estimativa de sua posição e efeito. Do ponto de vista de análise de dados e implementação, este é um método simples, uma vez que não há a necessidade do conhecimento da posição de marcadores no genoma (mapa genético), não exige métodos computacionais complexos. Este método, porém apresenta algumas desvantagens:

- Não é possível a distinção entre um QTL de pequeno efeito situado muito próximo ao marcador de um QTL que apresenta grande efeito mas situado mais distante do marcador;
- Não existe independência entre os testes de hipótese para marcadores ligados. Este fato não permite que se obtenha uma precisa posição do QTL, não sendo também possível estimar a magnitude do efeito deste, assim o efeito do QTL é confundido com a distância de mapa do QTL do marcador.

Este método fica limitado mais a situações em que se deseja apenas a simples detecção de associações entre marcadores e QTLs, sendo muito utilizado como um passo preliminar para a utilização de métodos mais complexos. Através dele é feita uma varredura de todas as marcas do genoma. As marcas não informativas são eliminadas da análise, aumentando a eficiência para as técnicas mais poderosas como mapeamento por intervalo composto e múltiplo. Este método auxilia uma rápida seleção em programas de melhoramento.

Outro método de mapeamento é o mapeamento por intervalo (ou análise por marcadores flanqueadores) (Lander e Botstein, 1989). Neste método, uma análise é realizada para cada par de locos marcadores adjacentes, resultando em $n-1$ testes separados de associação caráter-marcador. Este método oferece aumento no poder de detecção e precisão na estimativa dos efeitos e posições dos QTLs. Tanto o método que utiliza um só marcador como o método de mapeamento por intervalo, apresentam desvios quando múltiplos QTLs estão ligados ao marcador ou ao intervalo de marcadores considerado.

Métodos usando simultaneamente três ou mais locos marcadores tentam reduzir ou remover este desvio. O mapeamento por intervalo composto (CIM) considera um intervalo de marcadores e um conjunto de marcadores previamente selecionados, sendo que $n-1$ testes são realizados em um cromossomo com n marcadores (Zeng, 1993; 1994; Jansen, 1993a; 1994;

Jansen e Stam, 1994). O mapeamento de múltiplos pontos considera todos os marcadores ligados em um cromossomo simultaneamente, resultando em uma única análise para um cromossomo (Kearsey e Hyne, 1994; Hyne e Kearsey, 1995; Wu e Li, 1996).

O elemento chave usado para construir a teoria formal de mapeamento de QTLs, em qualquer modelo, é a probabilidade condicional de que o genótipo do QTL é Q_k , dado que o genótipo do marcador observado é M_j . Usa-se a definição de probabilidade condicional, isto é:

$$\Pr(Q_k | M_j) = \frac{\Pr(Q_k M_j)}{\Pr(M_j)}$$

em que:

$\Pr(Q_k M_j)$ é a probabilidade conjunta de ocorrência do genótipo do QTL e do marcador. Por exemplo, $\Pr(Q_k M_j) = \Pr(qM/qM)$ é a probabilidade do genótipo qq do QTL ocorrer junto com o marcador MM na população; $\Pr(M_j)$ é a probabilidade marginal, isto é, é a probabilidade de ocorrência do genótipo do marcador. Por exemplo, $\Pr(M_j) = \Pr(MM)$ é a probabilidade do genótipo MM do marcador ocorrer na população.

Essas probabilidades, $\Pr(Q_k M_j)$ e $\Pr(M_j)$ são funções do delineamento genético empregado para produzir as populações, por exemplo populações F_2 e de retrocruzamentos, e do mapa de ligação.

Com base nesta probabilidade condicional, o valor da característica para os vários genótipos marcadores pode ser calculado. Supondo que existam N genótipos de QTLs, onde a

média do Q-ésimo genótipo do QTL é μQ_k , o valor médio para o genótipo do marcador M_j é dado por

$$\mu M_j = \sum_{k=1}^N \mu Q_k \Pr(Q_k | M_j)$$

O efeito do QTL entra como μQ_k e a posição do QTL entra através da probabilidade $\Pr(Q_k | M_j)$. Esta equação é geral, considerando múltiplos genótipos marcadores e múltiplos QTLs.

O uso da probabilidade condicional permite o emprego de dois métodos para detectar e estimar os efeitos dos QTLs. O método baseado em modelos lineares e o método baseado na função de máxima verossimilhança.

O modelo linear mais simples descrito por Lynch e Walsh (1997), considera o valor fenotípico z_{ik} do k -ésimo indivíduo de genótipo marcador i , como um valor médio μ mais um efeito de marcador b_i e o erro e_{ik} , isto é:

$$z_{ik} = \mu + b_i + e_{ik}$$

Este é o modelo da análise de variância, sendo que a presença de um QTL ligado é indicada por efeito significativo dos marcadores. Podemos expressar este modelo como regressão múltipla para várias marcas com o valor fenotípico para o indivíduo j dado por:

$$z_i = \mu + \sum_{k=1}^N b_k x_{ij} + e_j$$

onde x_{ij} são n variáveis indicadoras (uma para cada genótipo de cada marcador). Por exemplo, para um retrocruzamento,

$$x_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{se o indivíduo } j \text{ possui genótipo marcador } i \\ 0 & \text{se outros casos.} \end{cases}$$

O teste de máxima verossimilhança (ML) é bastante utilizado para o mapeamento de QTLs. Este é um método poderoso, pois usa a informação total da distribuição característica-marcador. Para este método, as equações são resolvidas com auxílio de programas computacionais, uma vez que para cada variante do modelo original uma nova função de probabilidade precisa ser construída.

Assumindo que a distribuição fenotípica para um indivíduo com genótipo do QTL Q_k seja normal com média μQ_k e variância σ^2 , a probabilidade para um indivíduo com valor fenotípico z e genótipo marcador M_j é

$$l(z|M_j) = \sum_{k=1}^N \varphi(z, \mu Q_k, \sigma^2) \Pr(Q_k|M_j)$$

onde $\varphi(z, \mu Q_k, \sigma^2)$ denota a função de densidade para a distribuição normal com média μQ_k e variância σ^2 ; N é número total de genótipos.

Esta probabilidade é uma distribuição de uma mistura de normais. As proporções da mistura (indicadas por $\Pr(Q_k|M_j)$) são funções do mapa genético e do delineamento experimental, enquanto os efeitos do QTL entram somente através das médias μQ_k e variância σ^2 que estão na distribuição.

O teste para verificar se um QTL está ligado ao marcador pode ser baseado na estatística da razão de verossimilhança (LR):

$$LR = -2 \ln \left[\frac{\max L(H_a)}{\max L(H_0)} \right]$$

- função de verossimilhança sob H_a e função de verossimilhança sob H_0
- \ln é o logaritmo neperiano

onde H_a refere-se à hipótese da presença de um QTL ligado ao marcador e H_0 refere-se a hipótese da ausência de QTL segregando, sob a pressuposição de que a distribuição dos fenótipos é uma única distribuição normal.

No mapeamento de QTL é muito comum o uso do LOD score. A diferença entre LOD score e estatística LR é a base do logaritmo usada no teste. O teste LR utiliza logaritmos naturais e o LOD score utiliza logaritmo na base 10. A estatística LR é interpretada como a probabilidade de ocorrência dos dados, sob a hipótese nula, a qual é testada usando a distribuição teórica de qui-quadrado. O LOD score não necessita de distribuição teórica para a sua interpretação. Por exemplo, um LOD score igual a 3 indica que a hipótese alternativa é $10^3 = 1.000$ vezes mais provável de ocorrer do que a hipótese nula. É óbvio que isso não elimina a necessidade de determinar a probabilidade de erro tipo I do teste.

A posição do QTL no mapa é estimada usando a estatística LR como uma função de posição de mapa do suposto QTL. As probabilidades de detecção e estimativa da posição de um QTL ligado estão acopladas. Se a razão de verossimilhança exceder o limiar crítico para aquele cromossomo, isto fornece evidência de QTLs ligados à marca, sendo a posição estimada pelo

pico da probabilidade do mapa. Se o pico não exceder o limiar crítico, não existem evidências para aceitar a presença de QTLs na região.

Os métodos de marcas simples e mapeamento por intervalo simples assumem um só QTL ligado a um marcador de interesse, não podendo detectar a presença de múltiplos QTLs e, portanto, discernir se um efeito significativo em vários intervalos ligados por marcadores é devido a um QTL comum ou a vários QTLs ligados.

A maioria dos métodos desenvolvidos para mapear um só QTL pode ser estendido para múltiplos QTLs. Para isso é necessário considerar marcadores adicionais e usar a probabilidade condicional para genótipos multilocos.

O procedimento mais utilizado atualmente para mapear QTLs é aquele em que se utiliza de informações que podem ser obtidas de todos os marcadores, associado à análise com marcadores flanqueadores. Este tipo de análise é denominado de mapeamento por intervalo composto (CIM). Nesta metodologia considera-se que os efeitos dos QTLs fora do intervalo de análise podem interferir na variância do caráter em estudo e, portanto, interferir na detecção e mapeamento de QTL(s) no intervalo em análise. Para minimizar os efeitos destes QTLs fora do intervalo em análise, estes são incluídos nela como cofatores (covariáveis), resultando em aumento considerável no poder de detecção, na estimativa da posição e nos efeitos genéticos dos QTLs nos intervalos considerados (Jansen, 1992; 1993a; 1993b; Jansen e Stam, 1994; Jansen *et al.*, 1995; Zeng, 1993; 1994).

Neste modelo para uma população F_2 , tem-se:

$$Y_j = b_0 + b_1 X_{1j} + b_2 X_{2j} + \sum_k b_k X_{jk} + e_j, \text{ em que}$$

Y_j : valor fenotípico médio da planta j ,

b_0 : intercepto ou a média do caráter,

b_1 : coeficiente de regressão relacionado com o efeito aditivo,

b_2 : coeficiente de regressão relacionado com o efeito de dominância,

b_k : coeficiente de regressão da k -ésima marca fora do intervalo considerado,

X_{1j} : é a variável indicadora para os efeitos aditivos, cujo valor depende da probabilidade condicional do QTL estar ligado aos marcadores flanqueadores,

X_{2j} : variável indicadora para os efeitos dominantes, cujo valor depende da probabilidade condicional do QTL estar ligado aos marcadores flanqueadores,

X_{jk} : variável indicadora que apresenta valor que depende do genótipo da k -ésima marca fora do intervalo considerado,

e_j : resíduo com $\cap N(0, \sigma^2)$.

Este modelo considera como cofatores as k marcas, fora do intervalo, que têm efeito significativo no fenótipo. Esses cofatores podem ser determinados previamente através de uma análise de regressão múltipla usando o procedimento *stepwise* (Zeng, 1994). Nessa situação é possível construir um modelo para cada posição no genoma, uma vez que X_{1j} e X_{2j} consideram as probabilidades condicionais do QTL estar ligado aos marcadores. Em cada posição do genoma é testada a significância dos efeitos aditivos e de dominância do modelo, sendo este teste realizado pela razão de verossimilhança (LR).

Sabe-se que a distribuição da razão de verossimilhança pode ser aproximada pela distribuição de qui-quadrado. Contudo, no caso de mapeamento de QTLs deve-se determinar o

nível de significância dessa estatística usando uma distribuição empírica, obtida com permutações, pelo fato de os parâmetros (fenótipos e marcadores) do modelo não serem independentes (Churchill e Doerge, 1994; Doerge e Churchill, 1996).

Para cada experimento de mapeamento, um grande número de testes de associação caráter-marcador é realizado. Assim o nível de significância (α) para esse grande número de testes pode ser obtido de diversas formas. O teste mais efetivo para a obtenção do nível de significância utiliza procedimento de reamostragem, como o teste de permutação. A análise é realizada muitas vezes em um conjunto de dados que são gerados pelo embaralhamento apropriado dos dados originais (Churchill e Doerge, 1994; Doerge e Churchill, 1996). Isso gera uma amostra com a informação original para os marcadores, mas com valores da característica designados casualmente sobre o genótipo e o teste estatístico é realizado nesta nova amostra. Este procedimento é repetido muitas vezes gerando uma distribuição empírica da estatística do teste sob a hipótese de não existir associação caráter-marcador. Há sugestões de que 1.000 reamostragens seriam suficientes para um nível de significância de 5% (Churchill e Doerge, 1994). Há outras propostas, como por exemplo usar o LOD score, mas que não são vantajosas.

2.6- Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo em milho

Apesar de existir pouca informação publicada entre a associação de locos marcadores moleculares com genes controlando o conteúdo de óleo em milho, tanto alterações nas frequências em locos de isozimas como associações com locos de RFLP já foram investigados, sendo estes trabalhos realizados com populações submetidas à seleção por longo período para o teor de óleo nos grãos (Goldman *et al.*, 1994).

Brown (1971) observou alterações nas frequências alélicas em seis locos de isozimas entre as populações *Illinois High Oil* (IHO) e *Illinois Low Oil* (ILO) após 68 ciclos de seleção, sugerindo que aqueles seis locos estão associados com teor de óleo. Kahler (1985) também observou alterações nas frequências de oito locos de isozimas quando o sintético de milho *Alexho* foi submetido a 25 ciclos de seleção para aumentar a concentração de óleo. Esses resultados sugeriram a presença de genes controlando teor de óleo situados próximos aos locos de isozimas.

Goldman *et al.* (1994) encontraram significativa associação entre conteúdo de óleo e 25 locos de RFLP localizados em 13 braços cromossômicos. Nos braços longos dos cromossomos 2, 4, 6 e 8 foram encontrados dois ou mais locos marcadores associados com este caráter. A organização de vários locos associados com esta característica em uma mesma região do genoma, isto é, a detecção de relativamente poucas regiões genômicas associadas com concentração de óleo, pode tornar mais fácil o processo de seleção assistida por marcadores utilizado para o desenvolvimento de cultivares de milho com alta concentração de óleo. Alguns dos locos de RFLP associados com teor de óleo apresentaram tanto efeito aditivo quanto efeito de dominância.

Berke e Rocheford (1995) trabalhando com as populações IHO e ILO (*EM-Early Maturity*) encontraram associação significativa entre 31 locos de RFLP e o teor de óleo, cujos locos estão localizados em 11 regiões cromossômicas. Os principais QTLs associados com a concentração de óleo naquele trabalho foram localizados nos cromossomos 2, 5, 6 e 9, próximos aos locos de RFLP *php90269r*, *php6012*, *umc65r* e *php90427a*, respectivamente. Sete locos de RFLP localizados nos cromossomos 2, 3, 5, 6, 8 e 9 explicaram 54% da variância fenotípica e 61% da variância genotípica para o caráter teor de óleo para este cruzamento. Os efeitos aditivos

foram predominantes para a maioria dos locos mapeados e o efeito de dominância, mesmo que em menor frequência que os aditivos, também foi observado para alguns dos locos mapeados.

De oito locos de isozimas associados com teor de óleo por Kahler (1985), seis deles estão localizados nos mesmos braços cromossômicos em que foram mapeados locos de RFLP associados com conteúdo de óleo por Goldman *et al.* (1994). Estes locos são *adh1*, *prx1*, *est4*, *pgd2*, *pgd1* e *est1* localizados nos braços longos dos cromossomos 1 e 2, no braço curto do cromossomo 3 e nos braços longos dos cromossomos 3, 6 e 7, respectivamente.

Sughrue e Rocheford (1994), empregando RFLP, caracterizaram a variabilidade genética entre e dentro das linhagens de *Illinois* submetidas à cerca de 90 gerações de seleção para teor de óleo. Esses autores obtiveram considerável polimorfismo dentro e entre as linhagens avaliadas. Neste trabalho o loco de RFLP *umc10* foi associado com o aumento do teor de óleo. O loco *umc10* está localizado próximo ao centrômero no cromossomo 3. Nesta região se encontram os locos para as isozimas PGD2 e EST4. Estes dois locos foram associados com o caráter teor de óleo na população *Alexho* por Kahler (1985). Os resultados apresentados nos trabalhos de Kahler (1985), de Sughrue e Rocheford (1994) e de Goldman *et al.* (1994), sugerem que existem regiões genômicas gerais associadas com a concentração de óleo e que essas regiões devem controlar esse caráter em diferentes materiais genéticos.

Em quase todas as espécies de plantas a forma química de estocagem do óleo é o triacilglicerol (TAG) (Ohlrogge e Browse, 1995). Na semente madura TAG é estocado em corpos lipídicos esféricos densamente empacotados (Huang, 1992; Murphy, 1993; Herman, 1994). Esses corpos são rodeados por uma monocamada de fosfolipídeos na qual se encontram embebidas proteínas denominadas oleosinas. Em milho estão presentes três oleosinas denominadas OLE 18, OLE 17 e OLE 16. Em estudo de localização dos genes de oleosina utilizando RFLP, o gene *ole 16* foi mapeado próximo ao gene *b1* no cromossomo 2, o *ole 18* foi

localizado no braço curto do cromossomo 5, próximo ao gene *phya 2* e a localização de *ole 17* foi predita para o cromossomo 1, próximo a *phya 1* (Lee e Huang, 1994). As localizações dos genes mapeados para as proteínas oleosinas são coincidentes com as regiões que foram associadas com alto teor de óleo por Sughrue e Rochefor (1994). As posições dos locos *ole16* e *ole18* coincidem, ou estão próximos dos locos de RFLP *umc134* e *npi13*, respectivamente. Estes dois locos foram associados com alto teor de óleo. A relação entre os locos *ole16* e *ole18* com os locos *umc134* e *npi13* ainda não é conhecida (Lee e Huang, 1994).

A qualidade do óleo é uma importante consideração para o desenvolvimento de milho híbrido com alto teor de óleo. Entre os vários ácidos graxos estocados no embrião da semente os principais são: ácido linoleico (18:2) (40-60%), oléico (18:1) (20-50%), palmítico (16:0) (10-15%), esteárico (18:0) (2-3%) e linolênico (18:3) (1-2%); outros ácidos são encontrados somente em pequena quantidade (Coe *et al.*, 1988). A principal característica do óleo de milho, que o torna um óleo de alta qualidade, é seu alto nível de ácidos graxos insaturados (18:1 e 18:2) e seu baixo nível de ácidos graxos saturados (16:0 e 18:0) (Weber, 1987), também é importante seu alto nível de antioxidante natural (Weber, 1983). A alta taxa de ácidos graxos insaturados aumenta a qualidade do óleo de milho, pois quando estes são metabolizados pelo homem resultam em níveis reduzidos de colesterol no sangue.

Assim, existe preferência pela produção de óleos de milho com maior teor de ácido graxo linoleico (Weber, 1987). A produção de óleo de milho com esta qualidade é possível, uma vez que a composição deste é condicionada geneticamente (Alexander, 1988). Linhagens produzindo diferentes relações entre os ácidos graxos linolênico e linoleico já foram desenvolvidas, sendo que os cromossomos que possuem os genes responsáveis pela diferença de produção destes ácidos graxos, já começaram a ser identificados (Poneleit e Alexander, 1965; de la Roche *et al.*, 1971; Plewa e Weber, 1973; 1975; Shadley e Weber, 1980; 1986; Alrefai *et al.*, 1995).

Alrefai *et al.* (1995) utilizando marcadores moleculares do tipo RFLP, determinaram o número e a localização dos locos com caráter quantitativo que estão associados com a síntese dos cinco principais ácidos graxos em milho. Esses autores mapearam 15 locos de RFLP associados com o ácido palmítico, os quais se encontram em 12 regiões cromossômicas. Os principais QTLs associados com ácido palmítico foram mapeados nos cromossomos 3 e 7. Associados com o ácido graxo esteárico foram mapeados 17 locos situados em 10 regiões cromossômicas, sendo que os principais QTLs para este ácido graxo foram localizados nos cromossomos 5 e 6. QTLs associados tanto com a síntese do ácido graxo oléico como também com a síntese do ácido graxo linoleico, foram localizados na mesma região do genoma. Doze locos de RFLP distribuídos em oito diferentes localizações genômicas, foram associados com a concentração destes dois ácidos graxos. O principal QTL controlando a razão destes dois ácidos graxos foi mapeado no cromossomo 6 intimamente ligado ao loco *umc65*. Associação positiva com o ácido graxo linolênico foi encontrada para 17 locos, sendo que estes se encontram distribuídos em oito regiões genômicas. Os principais QTLs associados com esse ácido graxo foram localizados nos cromossomos 5 e 6.

A localização dos genes responsáveis pela síntese de ácidos graxos em óleo de milho é um aspecto importante, pois existe uma correlação negativa entre a porcentagem de óleo e o grau de insaturação dos ácidos graxos que o compõe (Quackenbush *et al.*, 1963; Sniegowski e Baldwin, 1954). Esta correlação negativa ocorre em função da diminuição do ácido graxo linoleico, ao mesmo tempo em que ocorre aumento do ácido graxo oléico durante processos de seleção que visam o aumento na porcentagem de óleo nos grãos (Sniegowski e Baldwin, 1954).

3- Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- 1- Construção de um mapa genético para linhagens tropicais de milho (*Zea mays* L.) utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite.
- 2- Mapear QTLs associados com o teor de óleo, utilizando 408 progênies F₂ obtidas a partir do cruzamento entre as linhagens Flint L-20-01 e Dentado L-02-03, contrastantes para o caráter.

4- Artigo

4.1- Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo em linhagens tropicais de milho (*Zea mays* L.)

Artigo a ser enviado para: Theoretical and Applied Genetics

**Mapeamento de QTLs associados com o teor de óleo em linhagens tropicais de milho
(*Zea mays* L.)**

Claudete A. Mangolin^{1,2,3}; Antonio Augusto F. Garcia⁴; Alexandre F. Garcia^{1,2}; Sergio T. Sibov^{1,2}; Luciana L. Benchimol^{1,2}; Adelmo R. Silva⁵; Anete P. de Souza^{1,2} e Cláudio L. de Souza Jr^{5*}.

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

²Departamento de Genética e Evolução – Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

³Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá-Pr, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), CP 9, CEP 13418-900, Piracicaba-SP, Brasil.

⁵Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), CP 83, CEP 13400-970, Piracicaba-SP, Brasil.

*Para quem as correspondências devem ser enviadas: E-mail: clsouza@carpa.ciagri.usp.br

Telefone: (55-19) 3429-4125 ou 3429-4126

Resumo

O teor de óleo em grãos de milho é um caráter que apresenta herança poligênica e do ponto de vista econômico é de alta importância. Este trabalho foi realizado para conhecer o número e a localização dos locos (QTLs) que controlam o teor de óleo dos grãos. Para este estudo foram cruzadas as linhagens de milho L-20-01 e a L-02-03 contrastantes para o conteúdo de óleo nos grãos. A partir deste cruzamento foram obtidas 408 plantas F_2 , usadas para a construção de um mapa genético com 75 locos de microssatélites, que se encontram distribuídos nos 10 cromossomos, formando 10 grupos de ligação com uma extensão de 1.438,6 cM. O número médio de marcadores para cada cromossomo foi de 7,5 e o intervalo médio entre marcadores foi de 19,18 cM. Para a avaliação de óleo foram utilizados os grãos das progênies $F_{2,3}$, das plantas F_2 autofecundadas. A média das progênies foi de 58,40 g kg^{-1} de óleo, variando de 44,93 a 72,63 g kg^{-1} . O coeficiente de herdabilidade para este caráter foi de 98%. Associações entre marcadores e QTLs foram realizadas através do método de mapeamento por intervalo composto (CIM) e foram consideradas significativas quando o valor da razão de verossimilhança (LR) ao longo do cromossomo ultrapassou o valor de 11,97, valor este calculado após 1.000 permutações. Associações significativas entre marcadores e QTLs foram obtidas em oito cromossomos, com um total de 13 QTLs mapeados. Juntos, esses QTLs explicaram 51,16% da variância genética. A principal contribuição para o caráter teor de óleo foi proveniente dos QTLs mapeados nos cromossomos 1 e 5. A maior parte dos alelos que contribuíram de forma favorável para o caráter foram provenientes da linhagem parental L-20-01, a qual apresentou o mais elevado teor de óleo. A ação gênica predominante para os QTLs mapeados foi aditiva e de dominância parcial, com grau médio de dominância de 0,47 evidenciando que este caráter apresenta dominância parcial. As posições de seis QTLs mapeados no presente trabalho foram

coincidentes com as posições descritas em trabalhos já publicados, sugerindo que eles possam ser os mesmos QTLs, mas mapeados em diferentes cruzamentos.

Palavras-chave conteúdo de óleo · locos de caracteres quantitativos · microssatélites · mapeamento por intervalo composto · Zea mays L.

Introdução

O milho cultivado é um componente essencial na alimentação de animais, sendo que 36% do milho total produzido no mundo é utilizado na elaboração de ração para aves e 18% é usado na alimentação de suínos (Perry 1988). Quando a ração é preparada com grãos que possui alto teor de óleo, suínos e aves apresentam acelerado ganho de peso (Han et al. 1987; Goss e Kerr 1992). O óleo de milho é um produto de grande aceitabilidade na alimentação humana graças ao alto teor de ácidos graxos insaturados. Quando este óleo é metabolizado pelo homem, baixo nível de colesterol é produzido (Weber 1987). Por essa razão, o desenvolvimento de milho com alto teor de óleo é um aspecto muito importante e possível, pois grande variação para este caráter tem sido detectada entre genótipos de milho. Essa variação é controlada por múltiplos locos de pequeno efeito, sendo portanto, um caráter quantitativo (Dudley 1974; 1977). Apesar de o alto teor de óleo em semente de milho ser um caráter importante, nenhuma informação sobre a associação de locos de microssatélites com genes controlando essa característica para material tropical se encontra publicada, todas as informações disponíveis a este respeito são provenientes de estudos realizados com linhagens temperadas utilizando isoenzimas e locos de RFLP. Mudanças na frequência alélica para locos de isozimas foram observadas quando seleção para o

conteúdo de óleo foi realizada, indicando que esses locos podem estar associados com o caráter teor de óleo (Brown 1971; Kahler 1985). Berke e Rocheford (1995) mapearam 31 locos de RFLPs associados com o teor de óleo, distribuídos em 11 regiões do genoma. Goldman et al. (1994) utilizando o cruzamento *Illinois High Protein* (IHP) x *Illinois Low Protein* (ILP), mapearam 25 locos de RFLP, distribuídos em 13 braços cromossômicos, associados com a concentração de óleo. Locos de RFLP também foram utilizados para o mapeamento de QTLs associados com diferentes ácidos graxos que compõe o óleo de milho (Alrefai et al. 1995).

Estes estudos foram possíveis graças ao desenvolvimento de marcadores moleculares, que tem ajudado a dissecar os caracteres herdados quantitativamente, uma vez que estes podem ser associados com seqüências do genoma que controlam tais caracteres. Através da construção de mapas genéticos, os marcadores têm se mostrado uma importante ferramenta acelerando o melhoramento de uma série de características de interesse, tornando possível a seleção assistida por marcadores (MAS) e clonagem posicional (Lee 1995).

Em milho, mapas construídos com RFLP têm sido utilizados principalmente para detecção de locos com caracteres quantitativos (QTLs) (Lee 1995; Khavkin e Coe 1997; Kraja e Dudley 2000). Entretanto, o sucesso deste estudo depende da disponibilidade de mapas altamente saturados e da capacidade para avaliar grandes populações. O uso de RFLP para estes estudos consome muito tempo e os custos são elevados. O desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Saiki et al. 1988), permitiu a elaboração de novos marcadores de DNA, que tem contribuído de forma efetiva para inúmeras aplicações genéticas. Dentre estes marcadores estão os microssatélites, também chamados de *Simple Sequence Repeats* (SSRs) (Litt e Luty 1989; Weber e May 1989). Este marcador apresenta vários aspectos interessantes tornando-o um marcador bastante utilizado. Eles são gerados através de PCR e o seu alto polimorfismo pode ser detectado em curto período de tempo, através de procedimentos

experimentais simples. Eles se comportam como marcadores codominantes e segregam de forma mendeliana simples (Beckmann e Soller 1990). A facilidade com a qual microssatélites podem ser amplificados e detectados, juntamente com a possibilidade de automatização do método, torna este um marcador ideal para estudos que requerem a análise de um grande número de amostras, tais como aqueles que envolvem caracteres quantitativos.

Os estudos de microssatélites em milho mostram que eles são altamente polimórficos, sendo distribuídos de forma abundante por todo o genoma (Senior e Heun 1993; Taramino e Tingey 1996; Senior et al. 1996; Chin et al. 1996). As seqüências para os pares de *primers* para microssatélites em milho são depositadas em uma base de dados pública. Esta base é um sistema aberto, onde seqüências podem ser adicionadas continuamente, aumentando a cobertura do genoma e melhorando o poder discriminatório deste marcador (Chin et al. 1996).

Os objetivos do presente trabalho foi construir um mapa de ligação com o marcador microssatélite para linhagens tropicais de milho, encontrar associações entre estes marcadores e QTLs associados com o teor de óleo para estas linhagens. Estimar a contribuição destes QTLs para o caráter e determinar a ação gênica dos QTLs mapeados.

Materiais e métodos

Material vegetal

Para a seleção das linhagens parentais contrastantes para o caráter teor de óleo nos grãos, foram avaliadas 147 linhagens endogâmicas (S_7) da população IG-1 e 224 linhagens endogâmicas (S_7) da população IG-2. Estas populações são tropicais, possuindo ciclo precoce e porte baixo, sendo que a população IG-1 possui grãos duros alaranjados e, a IG-2, grãos

dentados amarelos, estando alocadas em grupos heteróticos diferentes. Amostras de grãos destas 371 linhagens foram avaliadas para o teor de óleo nos grãos utilizando um aparelho de ressonância nuclear magnética (NMR) (Alexander et al. 1967; Henderson 1976). Foram selecionadas as linhagens denominadas de L-02-03, extraída da população IG-2, e L-20-01 extraída da população IG-1, com teores de óleo nos grãos de 29,24 g kg⁻¹ e 79,25 g kg⁻¹ respectivamente.

Estas linhagens foram cruzadas produzindo o híbrido simples (F₁). Através de avaliação com microssatélites para a presença dos alelos parentais, foram escolhidos 3 F₁s, estas foram autofecundados produzindo a geração F₂. Foram utilizadas aproximadamente 500 sementes para produzir a população F₂. Esta população foi cultivada no ano agrícola de 1998/99 em um *stand* de 62.500 plantas por hectare na Estação Experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP em Piracicaba, SP. Para a genotipagem foram coletadas folhas de 408 plantas, as quais foram autofecundadas para a obtenção de progênes F_{2:3}.

Estimativas de parâmetros genéticos do teor de óleo

Para realizar a avaliação do teor de óleo, foram utilizadas três amostras com aproximadamente 2,5 g de sementes. Estas amostras de grãos foram coletadas da região central de cada espiga das progênes F_{2:3}, seguindo o delineamento inteiramente casualizado. Foi realizada a análise de variância destes dados e estimadas as variâncias genética e fenotípica, utilizando-se

os quadrados médios e suas esperanças matemáticas: $\hat{\sigma}_G^2 = (QMG - QME)/r$ e

$\hat{\sigma}_F^2 = QMG/r$, onde QMG , QME e r referem-se ao quadrado médio das progênes, resíduo e

ao número de repetições ($r = 3$), respectivamente. O coeficiente de herdabilidade foi estimado por $\hat{h}^2 = \hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_F^2$ e os intervalos de confiança destas estimativas foram obtidos seguindo metodologia de Knapp et al. (1985) e Knapp et al. (1987).

Extração de DNA e amplificação de microssatélites

As folhas jovens das plantas F₂ coletadas foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, e liofilizadas (72h, -50°C, 05 a 10 microns de Hg). Após a liofilização foram moídas em moinho mecânico (Ciclotec-1093, "Sample Mill", Tecator) e acondicionadas separadamente em frascos armazenados à -20°C. O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994). Para a extração do DNA foram utilizados 300 mg de tecido de folhas liofilizadas. Após a extração, a quantificação do DNA foi feita através de espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech) e em géis de agarose 0,8% com tampão TAE (Tris/Acetato 0,04M e EDTA 0,001M pH 8.0), 80 Volts, utilizando como padrão diferentes concentrações de DNA de fago λ . O DNA extraído foi diluído em tampão TE (Tris/HCl 10mM e EDTA 1mM pH 8.0) e estocado à 4°C.

Para a escolha dos marcadores polimórficos entre as linhagens parentais, 648 microssatélites já mapeados foram avaliados, de modo que pelo menos um marcador a cada bin pudesse ser encontrado. Todos os microssatélites utilizados foram obtidos a partir do *site Maize DB* at <http://www.agron.missouri.edu>.

A PCR foi preparada em microplacas com 96 poços, usando um termociclador do tipo PTC-100 (MJ Research, Water-town, MA). Para cada reação foram utilizados 50 ng de DNA, 0,5 U de Taq DNA polimerase (GIBCO/BRL), 1 X o tampão que acompanha a enzima (20 mM

Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCL), 0,2 μ M do *primer* F e R específico, 2 mM de MgCl₂ e 100 μ M de uma mistura de dNTPs em um volume final de reação de 20 μ l. Para a amplificação dos microssatélites utilizou-se o programa *Touchdown* PCR (Don et al. 1991), e uma variação deste programa que foi denominado de PC1. Esta variação envolve somente a redução para a metade dos tempos de anelamento, extensão e desnaturação em relação aos ciclos de *Touchdown* PCR original. Programas específicos variando a temperatura de anelamento entre 46–56⁰C também foram utilizados para microssatélites que não produziram resultados satisfatórios quando amplificados com os programas citados acima. O produto da amplificação foi separado em gel de agarose MetaPhor : agarose Gibco/BRL (1:1) 4% com o tampão TBE 0,5 X (Tris/Borato 0,045M e EDTA 0,001M pH 8.3), por 2:30 h a 100 Volts. O gel foi corado em banho de brometo de etídio 0,5 μ g/ml, visualizado sobre transiluminador e fotografado sob luz ultravioleta. Os alelos de cada loco foram genotipados e a segregação dos mesmos foi avaliada usando um teste de Qui-quadrado ($P \leq 0,05$), e os locos que apresentaram desvios da segregação esperada (1:2:1) foram descartados.

Construção do mapa de ligação

O mapa genético para os microssatélites segregantes na proporção esperada para as plantas F₂ foi construído utilizando o programa Mapmaker/Exp 3.0 (Lander et al. 1987). As freqüências de recombinação foram convertidas em distância de mapa em centiMorgans (cM) usando a função de mapeamento de Kosambi (1944). A informação prévia de localização dos microssatélites, disponível na *Maize DB*, foi considerada para formar os grupos de ligação. Estes grupos foram construídos através do comando *group* com um LOD score de 3,0 e com distância

máxima de 0,50. Foram construídos 10 grupos de ligação que é equivalente ao número de cromossomos do milho. A ordem dos marcadores dentro de cada grupo de ligação foi obtida testando todas as possíveis ordens, e verificando qual delas apresentou a maior verossimilhança, o que indica que essa é a ordem mais provável. Isso foi obtido através do uso do comando *compare* do referido programa.

Mapeamento de QTLs

Para o mapeamento de QTLs foram utilizadas as médias do teor de óleo de cada progênie e as informações do mapa genético. Utilizou-se o mapeamento por intervalo composto (CIM), cujo modelo é: $Y_j = b_0 + b_1 X_{1j} + b_2 X_{2j} + \sum_k b_k X_{jk} + e_j$, em que Y_j é o valor fenotípico médio da j -ésima progênie, b_0 é o valor médio do caráter, b_1 e b_2 são os coeficientes de regressão associados aos efeitos aditivos e dominantes respectivamente, b_k é o coeficiente de regressão parcial relativo a k -ésima marca fora do intervalo em análise, X_{1j} e X_{2j} são variáveis indicadoras para os efeitos aditivos e dominantes, respectivamente, cujos valores dependem de probabilidades condicionais de supostos QTLs estarem dentro do intervalo em análise, X_{jk} é uma variável com valores 0 ou 1, indicando a ausência ou presença de possíveis QTLs na marca k . Este é um modelo de regressão linear múltipla com cofatores que ajustam os efeitos dos demais QTLs que se encontram fora do intervalo de análise. As marcas usadas no modelo como cofatores foram previamente escolhidas por uma análise de regressão múltipla com o procedimento *stepwise*, usando probabilidade de 0,10 para inclusão e exclusão de marcas. O teste de razão de verossimilhança foi utilizado em passos de 1 cM entre

marcadores e QTLs. Com este modelo foram estimados os valores dos efeitos genéticos aditivo e dominante e também a provável posição do QTL (Jansen 1994; Jansen e Stam 1994; Zeng 1994). Para esta análise empregou-se o programa QTLCartographer (Versão 1.14, Basten et al. 2000), considerando *window size* de 10 cM. O valor crítico de LR foi obtido através do teste de permutação, com probabilidade conjunta de 10%, através de 1.000 reamostragens (Churchill e Doerge 1994; Doerge e Churchill 1996). Assumiu-se a presença de QTL em uma dada posição no cromossomo quando os valores de LR ultrapassaram o limite crítico. Acima do limite, consider-se que cada pico contém as estimativas do efeito aditivo (a) e dominante (d) do QTL e da proporção da variância fenotípica do caráter explicada pelo QTL detectado (R^2).

Com as estimativas dos efeitos genéticos (a e d), foram estimados os graus de dominância ($GD = |d|/|a|$) para cada QTL e o grau médio de dominância obtido pela média, ponderada pelo R^2 , dos efeitos individuais de cada QTL. Para $GD < 0,2$ a ação do QTL foi considerada aditiva; para $0,2 \leq GD < 0,8$, como de dominância parcial; para $0,8 \leq GD < 1,2$, de dominância completa; e para $GD \geq 1,2$, sobredominante (Stuber et al. 1987).

Resultados

Médias e herdabilidade

A concentração média de óleo em grãos de milho para as 371 linhagens S_7 avaliadas foi de 48,20 g kg^{-1} . Para estas linhagens foi observada alta variação no conteúdo de óleo: a menor média para o conteúdo foi de 29,24 g kg^{-1} avaliada para a linhagem L-02-03 (P_2) e, a maior, de 79,25 g kg^{-1} avaliada para a linhagem L-20-01 (P_1), estas duas linhagens foram escolhidas para o

experimento em função do seu contraste para o caráter em estudo. Uma considerável variação também foi observada entre as progênies $F_{2:3}$. Para estas progênies o conteúdo de óleo variou de 44,93 g kg⁻¹ a 72,63 g kg⁻¹, com uma média de 58,40 g kg⁻¹. O coeficiente de variação experimental foi de 1,7% (Tabela 1A). A análise de variância revelou diferenças altamente significativas ($P \leq 0,01$) entre as progênies $F_{2:3}$. As variâncias genética ($\hat{\sigma}_G^2$) e fenotípica ($\hat{\sigma}_F^2$) estimadas para o caráter teor de óleo para estas progênies foram 20,31 e 20,64 (g kg⁻¹)², respectivamente. Em função da pequena diferença entre as variâncias, a estimativa do coeficiente de herdabilidade (h^2) foi de 98% (Tabela 2A).

Mapa genético

O DNA genômico das linhagens L-20-01 e L-03-02 e das progênies F_1 foram avaliados com 648 microssatélites, dos quais 162 (25%) foram polimórficos. Dentre os polimórficos, 87 deles não foram utilizados para a construção do mapa genético devido a: (1) desvios de segregação; (2) ausência do alelo de um dos parentais nos F_1 s; (3) pequena diferença entre os dois alelos parentais quando separados em gel de agarose de alta resolução; e (4) os microssatélites UMC1177, BNLG572 e PHI116 originalmente mapeados nos bins 1.01, 7.03 e bin 7.06 não foram ligados a qualquer marcador dos respectivos grupos de ligação.

Somente 75 microssatélites polimórficos, ou seja, 11,57% dos microssatélites avaliados para as duas linhagens foram utilizados para construir o mapa genético da população F_2 . Estes locos formaram 10 grupos de ligação, representando os 10 cromossomos do milho, com uma extensão de 1.438,6 cM. O número de marcadores para cada grupo de ligação variou de 10

marcadores no cromossomo 1 a quatro marcadores no cromossomo 10. Os grupos de ligação variaram de 232,4 cM no cromossomo 4 a 80,7 cM no cromossomo 10. O número médio de marcadores por cromossomo foi de 7,5, com intervalo médio entre marcadores de 19,18 cM. A distância entre marcadores mapeados variou de 0,6 cM a 99,4 cM, ambas no cromossomo 4. Algumas regiões em todos os cromossomos apresentaram distâncias relativamente grandes entre marcadores, como é o caso dos cromossomos 2 e 4, em que pode-se observar distâncias entre marcadores com valores acima de 70 cM (Figura 1A).

Algumas alterações nas posições de marcadores foram encontradas para os cromossomos 2 e 4. No cromossomo 2, o marcador BNLG166 foi mapeado na sua extremidade, ao invés de no bin 2.04, como está apresentado no *Maize DB*. Para este cromossomo houve também uma inversão de posição entre os marcadores BNLG1045 (bin 2.07) e PHI127 (bin 2.08). Inversão também foi observada entre os marcadores UMC1550 (bin 4.03), NC005 (bin 4.05) e BNLG252 (bin 4.06) no cromossomo 4. A seqüência obtida para o grupo de ligação entre estes marcadores foi: BNLG1370 (bin 4.00), BNLG252 (bin 4.06), NC005 (bin 4.05), UMC1088 (bin 4.05), UMC1550 (bin 4.03) (Figura 1A).

Mapeamento de QTLs

O valor limiar de LR para uma significância conjunta de 10%, determinado através de 1.000 permutações, foi de 11,97. Associações significativas entre marcadores e QTLs foram consideradas quando o valor de LR ao longo do cromossomo ultrapassou este valor obtido. Associações significativas foram observadas em oito dos 10 cromossomos do milho, exceto para os cromossomos 8 e 10, um total de 13 QTLs foram mapeados (Figura 2A). A localização e o comportamento dos QTLs associados com teor de óleo estão apresentadas na Tabela 3A.

Um só QTL foi mapeado nos cromossomos 2, 3, 7 e 9. Esses QTLs explicam 3,63, 3,27, 2,28, 2,76 e 3,10% da variação fenotípica (R^2), respectivamente. Para o cromossomo 1 foram mapeados dois QTLs, que juntos explicam 12,77% da variância fenotípica. Para os cromossomos 5 e 6, foram mapeados três QTLs, que explicam 12,36 e 9,64% da variância fenotípica, respectivamente. Os 13 QTLs juntos explicam 50,13% da variância fenotípica, a maior contribuição para o caráter teor de óleo sendo proveniente dos QTLs mapeados nos cromossomos 1 e 5. O maior valor de R^2 para teor de óleo foi atribuído ao QTL-1b mapeado na posição 62,08 cM do cromossomo 1. Esse QTL explica 8,40% da variância fenotípica, sendo o principal QTL mapeado para o teor de óleo no cruzamento estudado (Tabela 3A). A maior parte dos alelos que contribuem de forma favorável para o caráter teor de óleo são provenientes da linhagem L-20-01 (P_1), que apresentou o maior teor de óleo. A contribuição através de alelos favoráveis por esta linhagem foi efetiva para nove QTLs. Para os demais QTLs os alelos favoráveis são provenientes da linhagem L-03-02 (P_2), que apresentou o menor teor de óleo.

As estimativas dos efeitos genéticos mostraram que a ação gênica predominante para os QTLs mapeados é aditiva e de dominância parcial (observadas para cinco QTLs); dois QTLs apresentaram efeito de dominância completa e um de sobredominância que, juntos, apresentaram um grau médio de dominância de 0,47 evidenciando que este caráter apresenta em média dominância parcial (Tabela 3A).

Discussão

Os resultados mostraram que 25% dos microssatélites avaliados foram polimórficos, indicativo, portanto, de um baixo nível de polimorfismo quando comparado com os descritos na literatura. Um alto nível de polimorfismo foi descrito para microssatélite em milho (Taramino e

Tingey 1996). Em seu trabalho estes autores comparam o nível de polimorfismo deste marcador com o obtido com o emprego de RFLP. Chin et al. (1996) encontraram polimorfismo de 34,5% para os microssatélites avaliados. A porcentagem de polimorfismo obtida em milho por esses autores é considerada moderada quando comparada com a porcentagem obtida para outras espécies de cereais (Bell e Ecker 1994). No presente estudo todos os marcadores avaliados para a construção do mapa genético, foram aqueles desenvolvidos para material temperado. As linhagens Flint L-20-01 e Dentado L-02-03 avaliadas neste trabalho são materiais exclusivamente tropicais, este fato pode explicar a diferença no nível de polimorfismo obtido quando comparado com os resultados publicados.

Somente 11,57% dos microssatélites avaliados puderam ser utilizados para a construção do mapa genético, porque além do baixo polimorfismo encontrado, observou-se distorção para a segregação mendeliana esperada para este marcador. Ausência de alelo de uma das linhagens parentais nos híbridos simples, também contribuiu para o baixo aproveitamento deste marcador. Esta ausência pode ser caracterizada como alelo nulo. Alelos nulos para SSRs também foram detectados em 5% das linhagens de milho estudadas por Taramino e Tingey (1996). A não amplificação de um alelo foi explicada por Taramino e Tingey (1996) como podendo ser em função de polimorfismo apresentado por uma seqüência de nucleotídeos de um dos *primers*, não permitindo o seu anelamento e como consequência a não amplificação.

O mapa descrito no presente trabalho, que apresenta extensão de 1.438,6 cM, é comparável com a extensão de outros mapas construídos por Ribaut et al (1996) e Jiang et al (1999). Mas o presente mapa é menor que o comprimento de 1.883,6 cM determinado por Matz et al. (1995), 1.765 cM, por Causse et al. (1996) e 1.727,4 cM, por Davies et al. (1999). Essa diferença em tamanho pode ser em função da baixa quantidade de locos marcadores em várias regiões, onde grandes distâncias entre marcadores podem ser observadas (Figura 1A).

Os valores calculados para a estimativa das variâncias fenotípica e genética para o cruzamento estudado foram muito próximos, mostrando que o componente genético é o fator mais relevante para o caráter teor de óleo. Jellum e Marion (1966) também mostraram que o genótipo exerce maior influência nos valores de óleo do que as condições ambientais. O cálculo da estimativa da herdabilidade (h^2) foi de 98% para o cruzamento em estudo. Este valor é concordante com o descrito na literatura, que aponta este caráter como de alta herdabilidade, podendo ser maior que 0,70 (Hallauer e Miranda Filho 1988; Alexander 1988). A herdabilidade para concentração de óleo em famílias S_1 provenientes do cruzamento entre IHO X ILO foi calculada como 0,80 (Goldman et al. 1994) e para uma população de linhagens S_1 originada do cruzamento de planta IHO e ILO(EM) o coeficiente de herdabilidade foi de 0,89 (Berke e Rocheford 1995).

Antes do desenvolvimento de marcadores moleculares caracteres quantitativos tradicionalmente eram investigados através de modelos estatísticos. Através desta metodologia o número de locos controlando o conteúdo de óleo foi estimado para as populações IHO e ILO (Dudley 1977; Dudley e Lambert 1992; Moreno-Gonzalez et al. 1975), a medida que os ciclos e o progresso de seleção aumentam há também um aumento na estimativa do número de locos controlando este caráter (Lambert, 1994). Após 96 gerações de seleção, Dudley e Lambert (1992) estimaram que 69 locos controlam o teor de óleo em grãos de milho. Marcadores moleculares têm se tornado uma ferramenta importante para o estudo de genética quantitativa. No presente estudo foram mapeados 13 QTLs associados com teor de óleo. O número de regiões do genoma associadas com este caráter, detectadas com o uso de microssatélites é diferente do número registrado na literatura. Goldman et al. (1994) descreveram 25 locos marcadores associados com teor de óleo, 31 locos de RFLP foram associados com este caráter por Berke e Rocheford (1995). Alrefai et al. (1995) detectaram associação entre vários locos de RFLP e a

concentração de cinco diferentes ácidos graxos que compõe o óleo de milho. As diferenças quanto ao número de QTLs associados com concentração de óleo no presente trabalho e os descritos na literatura podem ser decorrentes de algumas regiões do mapa genético apresentarem grandes distâncias entre marcadores, de diferenças de metodologia de análise empregada e do material genético analisado.

A posição nos cromossomos, para 17 QTLs mapeados e associados com teor de óleo no trabalho realizado por Goldman et al. (1994), se encontra disponível na *Maize DB*. Quando são comparadas as posições dos QTLs mapeados no presente trabalho com os resultados descritos por Goldman et al. (1994), observa-se que os locos *qoilc3*, *qoil7*, *qoil8* e *qoil14* associados com conteúdo de óleo foram mapeados por esses autores nas mesmas posições dos QTL-2, QTL-4, QTL-6c e QTL-7, sendo possível que estes quatro QTLs sejam os mesmos para os dois experimentos. Outras regiões associadas com teor de óleo, descritas por outros autores, também foram confirmadas no presente estudo. O QTL-1b mapeado no bin 1.06 pode corresponder ao loco *olc1*; este loco está descrito na *Maize DB* como localizado entre os bins 1.06 e 1.12. O gene *olc1* está associado com o nível de ácido oleico encontrado em embrião de milho (Alrefai et al. 1995).

Três dos principais QTLs associados com teor de óleo e localizados nos cromossomos 5, 6 e 9 no trabalho de Berke e Rocheford (1995), são coincidentes com os QTLs 5b, 6c e 9 respectivamente, indicando que estes QTLs possam ser os mesmos para os 2 trabalhos. O QTL mapeado no cromossomo 6 no trabalho de Berke e Rocheford (1995) está intimamente ligado ao loco de RFLP *umc65*. Há indicações de que o loco *umc65* esteja firmemente ligado ao gene *linoleic (ln1)*. Foi proposto que este gene controla a razão entre os ácidos graxos oléico (18:1) e linoléico (18:2) (Poneleit 1976). Alrefai et al. (1995) mapearam o principal QTL que controla a razão destes 2 ácidos graxos no cromossomo 6 próximo ao loco *umc65*. A conversão do ácido

graxo 18:1 para 18:2 é feita pela enzima omega-6 desaturase, assim há indicações de que o loco *lnl* possa ser o loco da omega-6 deaturase em milho (Alrefai et al. 1995). No presente trabalho, no cromossomo 6 na mesma posição do loco *umc65*, foi mapeado o QTL-6c, sugerimos que este seja o mesmo QTL descrito no trabalho de Berke e Rocheford (1995) e que esteja envolvido com a conversão dos ácidos graxos 18:1 para 18:2 como descrito por Alrefai et al. (1995).

Os locos associados com teor de óleo localizados nos braços cromossômicos 2L, 3L, 6L e 7L, no presente trabalho, estão localizados nos mesmos braços cromossômicos em que Kahler (1985) verificou mudança na frequência para oito locos de isozimas. Mudanças estas associadas com seleção para aumento na concentração de óleo no sintético Alexho. Goldman et al. (1994) mapearam QTLs associados com o teor de óleo nestes mesmos braços cromossômicos. O loco RFLP UMC10 localizado no bin 3.05, próximo ao centrômero, foi associado com concentração de óleo nas *Illinois Oil Strains* por Sughroue e Rocheford (1994). Goldman et al. (1994) também detectaram associação para concentração de óleo com esse loco. O loco para a isozima PGD2, um dos associados com teor de óleo por Kahler (1985), está localizado próximo ao centrômero no cromossomo 3. No presente experimento, na região do bin 3.05, onde está mapeado o microssatélite PHI073, mapeou-se o QTL-3, sugerindo que este seja o mesmo descrito nos demais trabalhos. Dos 13 QTLs associados com concentração de óleo mapeados no presente trabalho, oito foram coincidentes com QTLs já descritos para outros cruzamentos, sugerindo que deve haver consistência para a localização dos locos que controlam a concentração de óleo para os diferentes germoplasmas de milho. Para os demais QTLs (1a, 5a, 5c, 6a e 6b) mapeados no presente trabalho, não se observou coincidência com a posição de QTLs mapeados para outros cruzamentos, mas estes se encontram nos mesmos braços cromossômicos em que Berke e Rocheford (1995) e Goldman et al. (1994) mapearam QTLs associados com esta característica. Este resultado reforça a sugestão de que a localização de alguns QTLs associados com teor de

óleo seja dependente do material genético e dos cruzamentos realizados. Alguns *gaps* maiores que 40 cM, presentes nos cromossomos 1, 2, 4, 7, 9 e 10, diminuem a eficiência de mapeamento, de forma que novos microssatélites deverão ser utilizados para essas regiões, podendo aumentar a precisão de mapeamento e o número de QTLs associados com concentração de óleo para o cruzamento em questão.

Neste trabalho nenhum segmento dos cromossomos 8 e 10 foi associado com teor de óleo, diferindo dos resultados publicados. Para o cromossomo 10, somente quatro microssatélites foram utilizados na construção do mapa de ligação (Figura 1A). Com estes marcadores, o mapa de ligação apresenta um intervalo de 50,30 cM entre os microssatélites BNLG1526 (bin 10.04) e BNLG1330 (bin 10.07). Esta distância entre marcadores diminui a precisão de mapeamento, pois a resolução do mapeamento é baseada no número de eventos de recombinação entre um marcador e um QTL (Liu 1998). Associações de QTLs para os ácidos graxos palmítico (16:0); esteárico (18:0); oléico (18:1) e linoléico (18:2), foram descritas para segmentos do cromossomo 10 por Alrefai et al. (1995). A associação do cromossomo 10 com teor de óleo foi também descrita por Goldman et al. (1994) e por Berke e Rocheford (1995). Portanto, o presente resultado não é conclusivo, havendo necessidade de maior saturação entre os bins 10.04 e 10.07 deste cromossomo.

O mapa de ligação do cromossomo 8 foi construído com uma distância média entre marcadores de 12,06 cM, sendo que o intervalo entre marcadores não excedeu a 24 cM (Figura 1A). A distância entre os marcadores utilizados para este cromossomo foi menor que a ideal sugerida por Lander e Botstein (1989), sustentando, portanto, os resultados do presente trabalho, indicando a não associação do cromossomo 8 com o teor de óleo. Alrefai et al. (1995) encontraram associação desse cromossomo com a concentração dos ácidos graxos esteárico (18:0) e linolênico (18:3). Goldman et al. (1994) observaram a associação com teor de óleo para

mais que um loco de RFLP no braço longo do cromossomo 8. Berke e Rocheford (1995) também descreveram a associação deste cromossomo com o teor de óleo. Estes resultados sugerem que algumas regiões genômicas associadas com esta característica podem ser específicas para determinados cruzamentos e materiais genéticos. O mapeamento realizado neste estudo e os experimentos realizados por Berke e Rocheford (1995), mostrando QTLs associados com teor de óleo localizado no cromossomo 9, em contraste aos resultados obtidos para o cruzamento realizado por Goldman et al. (1994) mostrando que esse foi o único cromossomo que não apresentou associação com teor de óleo, suportam a proposta de que alguns QTLs associados com teor de óleo são específicos de genótipos de milho. Esta mesma idéia é reforçada pelos resultados observados para o cromossomo 1. Associações positivas entre marcadores e QTLs foram obtidas no presente trabalho e para o trabalho de Goldman et al. (1994). Mas este foi o único cromossomo não associado com o teor de óleo por Berke e Rocheford (1995).

Os 13 QTLs mapeados no presente trabalho, explicam 50,13% da variância fenotípica (R^2) e 51,16% da variância genética. O principal QTL associado com o teor de óleo foi mapeado na posição de 62,08 cM no cromossomo 1, contribuindo com 8,40% da variância fenotípica, e a contribuição para os demais QTLs ficou entre 2,35% e 5,59%. O grau médio de dominância para este cruzamento foi de 0,47, indicando que o efeito de dominância parcial é o mais importante para o caráter. Silvela et al. (1989) assumiram que o caráter teor de óleo em milho está sob controle genético aditivo. Dudley (1977) descreveu efeito de dominância para conteúdo de óleo em milho, mas sugeriu que este efeito é relativamente sem importância para este caráter. Nos experimentos realizados por Dudley e Lambert (1992) alta proporção de QTLs com efeito aditivo foram observados. Goldman et al. (1994) e Berke e Rocheford (1995), descreveram que a maior parte dos QTLs associados com teor de óleo também apresentaram efeito aditivo. Alrefai et al. (1995) mapearam QTLs envolvidos com a síntese de ácidos graxos componentes do óleo

de milho, e o número de QTLs com efeito aditivo foi predominante, para este trabalho dois QTLs associados com o ácido graxo esteárico apresentaram efeito de sobredominância. O QTL-1a mapeado no presente trabalho apresentou efeito de sobredominância. Sobredominância pode ser assumida como rara, podendo ser atribuída à ligação de mais que um gene em repulsão, isto é a presença de um bloco gênico. Estes genes devem apresentar ação gênica de dominância parcial ou de dominância. Sobredominância também foi observada para regiões associadas com peso de grãos e caracteres relacionados (Edwards et al. 1987), e para este caso foi sugerido a existência de mais que um gene nestas regiões (Edwards et al. 1992).

Os alelos dos QTLs 1b, 2, 4, 5a, 5c, 6a, 6b, 6c e 9, que contribuem de forma favorável para o caráter teor de óleo estão concentrados na linhagem L-20-01, que apresentou o maior teor de óleo. A contribuição através de alelos favoráveis por esta linhagem foi efetiva para nove QTLs. Para os demais QTLs, os alelos que contribuem de forma favorável para o aumento do conteúdo de óleo nos grãos foram provenientes da linhagem L-03-02, que apresentou o menor teor de óleo.

Para as populações de Illinois, seleção para aumento na concentração de óleo foi associado com diminuição do tamanho das sementes (Dudley 1977), as mesmas regiões do genoma devem estar envolvidas na alocação de fotoassimilados para produção de amido e/ou deposição de óleo nas sementes de milho, existe efeito pleiotrópico para os QTLs que controlam as duas características. Através dos resultados obtidos no trabalho de Berke e Rocheford (1995), vemos que é possível a realização de seleção para os dois caracteres independentemente, pois estes autores mapearam QTLs específicos para estas duas características. Uma vez que a posição destes QTLs seja conhecida, podemos realizar seleção para aumento no teor de óleo na semente sem diminuir o peso. Este tipo de seleção pode facilitar o desenvolvimento de milho híbrido de interesse.

Apesar do caráter teor de óleo apresentar alta herdabilidade, o uso de marcadores para a seleção é importante, pois o óleo é uma característica que só poderá ser avaliada após o florescimento. Assim, os locos marcadores associados com este caráter podem ser testados através de seleção assistida por marcadores (MAS) antes deste período para todas as gerações, diminuindo o tempo gasto neste processo. Como a herdabilidade para este caráter é alta, existe maior probabilidade de detectarmos os mesmos QTLs em experimentos realizados como os mesmos materiais genéticos, mas em diferentes ambientes. A estratégia mais promissora para MAS, parece ser a descrita por Hospital et al. (1997), esta estratégia mostra que é possível a realização de dois ou três ciclos de seleção em marcadores somente após o primeiro ciclo de seleção combinada, reavaliando os efeitos dos QTLs. Uma vez que se obtenha associação QTL-marcador no primeiro ciclo, para os demais ciclos serão realizadas genotipagens de indivíduos somente para os marcadores localizados próximos aos QTLs detectados. Desde que nenhuma avaliação fenotípica e nenhuma genotipagem completa são necessárias, estes ciclos podem ser realizados de forma mais rápida e com menos custo do que ciclos de seleção fenotípica ou combinada. Com esta estratégia MAS é eficiente para caracteres que apresentam média e alta herdabilidade, por causa da redução de tempo (Moreau et al. 2000).

O desenvolvimento de germoplasma de milho tropical com alto teor de óleo pode ser acompanhado e facilitado com o emprego de microssatélite, pois um pequeno número de QTLs controlando conteúdo de óleo foram mapeados, a variância fenotípica explicada por cada QTL é praticamente genética, o que confere alta herdabilidade, e ainda que 8 dos 13 QTLs mapeados estão em um intervalo entre marcadores menor que 20 cM, isto é importante pois, quanto menor o intervalo de marcadores flanqueando o QTL melhor será a resposta genética para esta seleção.

Referências

- Alexander DE, Silvela SL, Collins FI, Rodgers RC (1967) Analysis of oil content of maize by wide-line NMR. *J. Am. Oil Chem Soc* 44:555-558
- Alexander DE (1988) Breeding special nutritional and industrial types. In: Sprague GF, Dudley JW (eds). *Corn and corn improvement*. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI
- Alrefai R, Berke TG, Rocheford TR (1995) Quantitative trait locus analysis of fatty acid concentrations in maize. *Genome* 38: 894-901
- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2000) QTL Cartographer, Version 1.14. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC
- Beckmann JS, Soller M (1990) Towards unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. *Bio/Technology* 8:930-932
- Bell CJ, Ecker JR (1994) Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* 19:137-144
- Berke TG, Rocheford TR (1995) Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height, and kernel traits in maize. *Crop Sci* 35:1542-1549
- Brown AHD (1971) Isozyme variation under selection in *Zea mays*. *Nature* 232:570-571
- Causse M, Santoni S, Damerval C, Maurice A, Charcosset A (1996) A composite map of expressed sequences in maize. *Genome* 39:418-432
- Chin ECL, Senior ML, Shu H, Smith JCS (1996) Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39:866-873
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-971

- Davis GL, McMullen MD, Baysdorfer C, Musket T, Grant D, Staebell M, Xu G, Polacco M, Koster L, Melia-Hancock S, Houchins K, Chao S, Coe EH (1999) A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map. *Genetics* 152:1137-1172
- Doerge RW, Churchill GA (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142:285-294
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Res* 19:4008
- Dudley J, Lambert RJ, de la Roche IA (1977) Genetic analysis of crosses among corn strains divergently selected for percent oil and protein. *Crop Sci* 17:111-117
- Dudley JW, Lambert RJ (1992) Ninety cycles of selection for oil and protein in maize. *Maydica* 37:1-7
- Dudley JW, Lambert RJ, Alexander DE (1974) Seventy generations of selection for oil and protein concentration in the maize kernel. In: Dudley JW (ed). *Seventy generations of selection for oil and protein in maize*. CSSA, Madison, Wi, pp 181-212
- Edwards MD, Helentjaris T, Wright S, Stuber CW (1992) Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. *Theor. Appl Gen* 83:765-774
- Edwards MD, Stuber CW, Wendel JF (1987) Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116:113-125
- Goldman IL, Rocheford TR, Dudley JW (1994) Molecular marker associated with maize kernel oil concentration in an Illinois high protein x Illinois low protein cross. *Crop Sci* 34:908-915
- Goss J, Kerr PS (1992) Challenges and opportunities for identity preserved varieties. In: *Proc 47th Annu. Corn and Sorghum Res. Conf. Am. Seed Trade Assoc., Washington, DC*, pp 1-31

- Hallauer AR, Miranda Filho JB (1988) Quantitative genetics in maize breeding, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 468 p
- Han Y, Parsons CM, Alexander DE (1987) The nutritive value of high-oil corn for poultry. *J Poult Sci* 66:103-111
- Henderson CB (1976) Maize Research and Breeders Manual No. VIII, Illinois Foundation Seeds Inc., Champaign, IL 61820
- Hoisington D, Khairallah M, González-de-León D (1994) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd ed. Mexico, D.F.: CIMMYT p 51
- Hospital F, Moreau L, Charcosset A, Gallais A (1997) More the efficiency of marker assisted selection. *Theor. Appl Gen* 95:1181-1189
- Jansen RC (1994) Mapping of quantitative trait loci by using genetic markers: an overview of biometrical models. In: van Ooijen JW, Jansen RC (eds). *Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers*, CPRO-DLO, Netherlands, pp 116-124
- Jansen RC, Stam P (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447-1455
- Jellum MD, Marion JE (1966) Factors affecting oil content and oil composition of corn (*Zea mays* L.) grain. *Crop Sci* 6:41
- Jiang C, Edmeades GO, Armstead I, Lafitte HR, Hayward MD, Hoisington D, (1999) Genetic analysis of adaptation differences between highland and lowland tropical maize using molecular markers. *Theor Appl Genet* 99:1106-1119
- Kahler AL (1985) Association between enzyme marker loci and agronomic traits in maize. In: *Proc. 40th Annu. Corn and Sorghum Res. Conf. Am. Seed Trade Assoc., Washington, DC*, pp 66-89

- Khavkin E, Coe E (1997) Mapped genomic locations for developmental functions and QTLs reflect concerted groups in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 95:343-352
- Knapp SJ, Ross WM, Stroup WW (1987) Precision of genetic variance and heritability estimates from sorghum populations. *Crop Sci* 27:265-268
- Knapp SJ, Stroup WW, Ross WM (1985) Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Sci* 25:192-194
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175
- Kraja AT, Dudley JW (2000) QTL analysis of two maize inbred line crosses. *Maydica* 45:1-12
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Lee M (1995) DNA markers and plant breeding programs. *Adv Agron* 55:265-344
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:398-401.
- Liu BH (1998) *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press, Boca Raton, 611 p
- Matz EC, Burr FA, Burr B (1995) Molecular map based on TxCM and CoxTx recombinant inbred families. *Maize Gen Coop Newsl* 69:257-267
- Moreau L, Lemarié S, Charcosset A, Gallais A (2000) Economic efficiency of one of marker-assisted selection *Crop Sci* 40:329-337

- Perry TW (1988) Corn as a livestock feed. In: Sprague GF, Dudley JW (eds). Corn and corn improvement. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wi, pp 941-963
- Poneleit CG (1976) Chromosome location for control of oleic and linoleic acids in corn oil. *Agron Abs* 8:59
- Ribaut JM, Hoisington DA, Deutsch JA, Jiang C, Gonzalez-de-Leon D (1996) Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor Appl Genet* 92:905-914
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horu GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Senior ML, Chin ECL, Lee M, Smith JSC, Stuber CW (1996) Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. *Crop Sci* 36:1676-1683
- Senior ML, Heun M (1993) Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36:884-889
- Silvela L, Rodgers R, Barrera A, Alexander DE (1989) Effect of selection intensity and population size on percent oil in maize, *Zea mays* L. *Theor Appl Genet* 78:298-304
- Stuber CW, Edwards MD, Wendel JF (1987) Molecular marker-facilitated investigation of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci* 27:639-648
- Sughroue JR, Rocheford TR (1994) Restriction fragment length polymorphism genotypic frequency differences among Illinois Long-Term selection oil strains. *Theor Appl Genet* 87:916-924

- Taramino G, Tingey S (1996) Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39:277-287
- Weber EJ (1987) Lipids of the kernel. In: Watson SA and Ramstad PE (eds). *Corn: Chemistry and technology*. Am Assoc of Cereal Chemists, St. Paul, pp 311-350
- Weber JL, May PE (1989) An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Gen* 44:388-396
- Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1466

Tabela 1A. Apresentação da análise de variância para o teor de óleo em grãos de milho estimada para as progênes F_{2:3}.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Progênes	407	61,91**
Erro	816	0,98

C V 1,70

**** P ≤ 0,01**

Tabela 2A. Valores médios, intervalo de variação e estimativas das variâncias genética e fenotípica e do coeficiente de herdabilidade para teor de óleo nos grãos da população F_{2:3}.

Parâmetros	Teor de óleo (g kg⁻¹)	Intervalo de confiança ^a
Média	58,40	57,51 – 59,29
Intervalo de variação	44,93 – 72,63	
σ^2_G	20,31	17,75 – 23,47
σ^2_F	20,64	18,07 – 23,79
h²	0,98	0,98 – 0,99

^a P ≤ 0,05

Tabela 3A. Localização, estimativas dos efeitos genéticos e dos coeficientes de determinação dos QTLs associados com o caráter teor de óleo em grãos de milho tropical, obtidos através de análise de mapeamento por intervalo composto (CIM).

Cromossomo	QTL	Marcadores do Intervalo	Posição estimada do QTL (cM) ^a	Efeito genético		Grau de dominância ^b	Origem do alelo favorável	R ² _F ^c %	R ² _G ^d %
				Adit.	Dom.				
01S	1a	BNLG1083-BNLG439	8,01	0,088	0,150	SD (1,70)	P2	4,11	4,20
01C	1b	BNLG1057-BNLG2057	62,08	0,198	-0,064	DP (0,32)	P1	8,40	8,57
02L	2	PHI127-BNLG1045	142,57	0,117	-0,068	DP (0,58)	P1	3,63	3,71
03L	3	PHI073-DUPSSR017	120,06	-0,129	-0,035	DP (0,27)	P2	3,27	3,34
04L	4	BNLG252-NC05	113,43	0,121	0,033	DP (0,27)	P1	2,86	2,92
05S	5a	UMC1365-BNLG1700	15,01	0,176	-0,010	A (0,06)	P1	5,59	5,70
05L	5b	DUPSSR010-MMC0282	56,03	-0,124	0,110	D (0,89)	P2	4,42	4,51
05L	5c	BNLG2305-BNLG386	129,19	0,082	-0,080	D (0,98)	P1	2,35	2,40
06S	6a	BNLG238-BNLG426	0,01	0,106	-0,013	A (0,12)	P1	2,66	2,71
06L	6b	UMC1133-UMC1614	55,31	0,121	0,073	DP (0,60)	P1	3,73	3,81
06L	6c	UMC1614-NC013	73,01	0,128	0,019	A (0,15)	P1	3,25	3,32
07L	7	UMC1112-BNLG1805	95,61	-0,116	0,005	A (0,04)	P2	2,76	2,81
09	9	BNLG1714-BNLG1209	69,74	0,124	0,023	A (0,19)	P1	3,10	3,16
						GMD DP (0,47)	R ² Total	50,13	51,16

^aPosição do QTL relativo ao primeiro microssatélite no cromossomo.

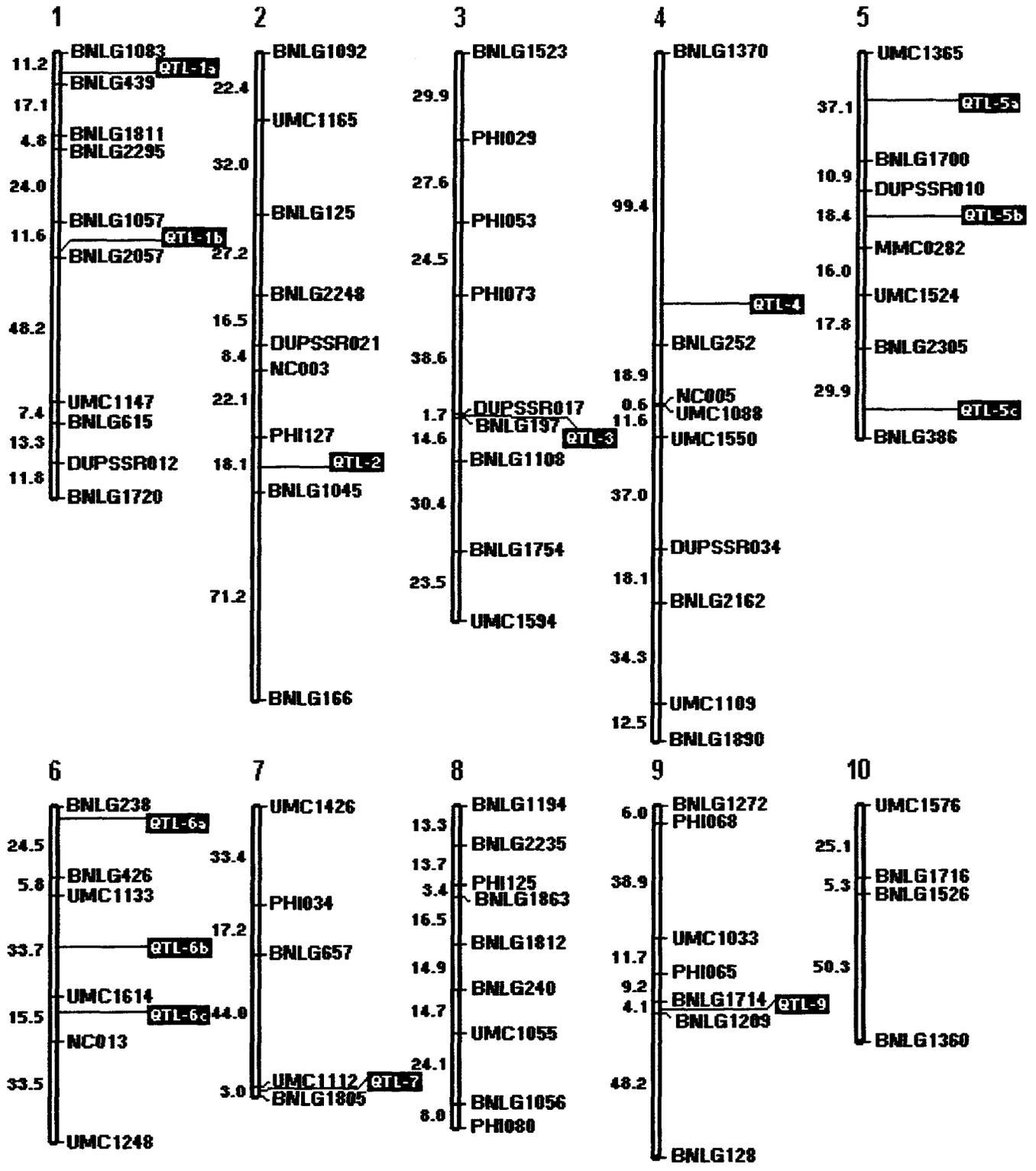
^bGrau de dominância: A=aditiva ($|d/a| < 0,2$), DP=dominância parcial ($0,2 < |d/a| < 0,8$), D=dominância ($0,8 < |d/a| < 1,2$), SD=sobredominância ($|d/a| \geq 1,2$); GMD: grau médio de dominância.

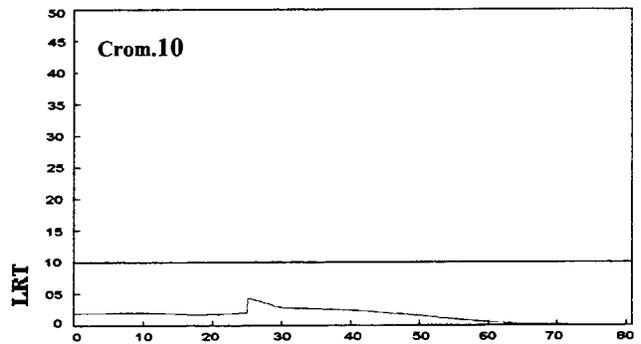
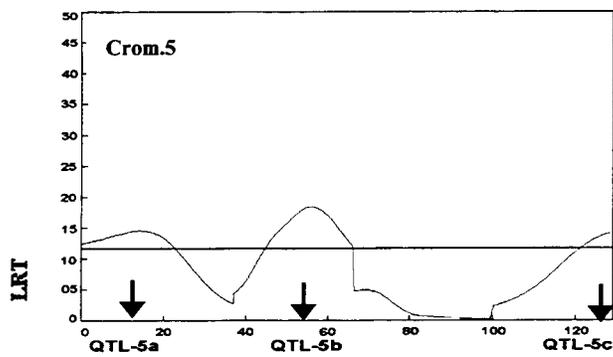
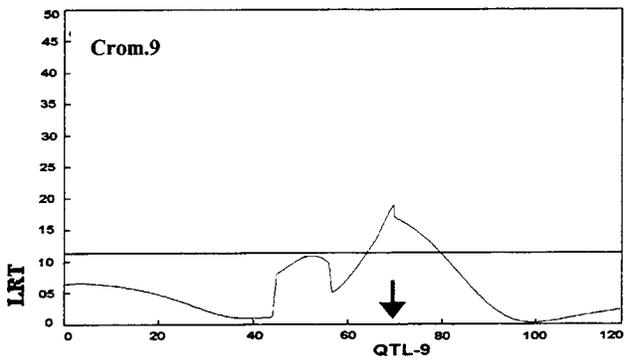
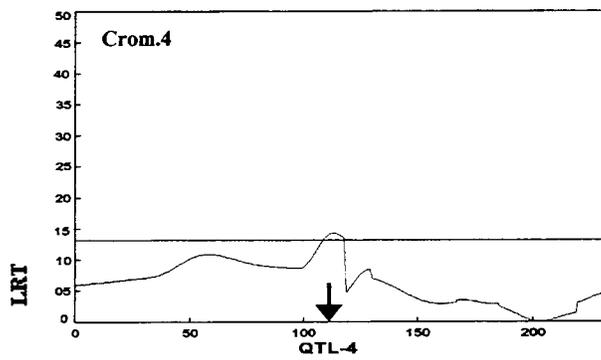
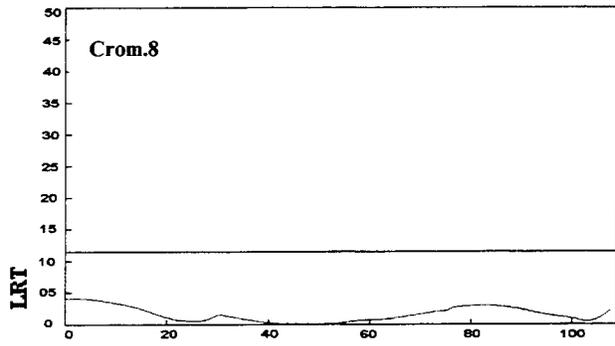
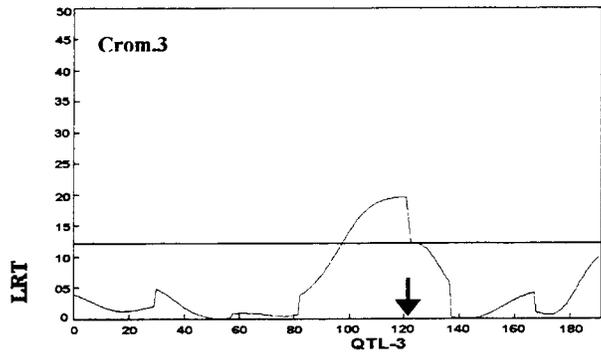
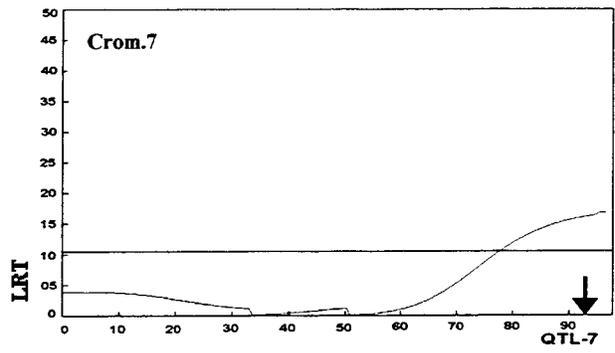
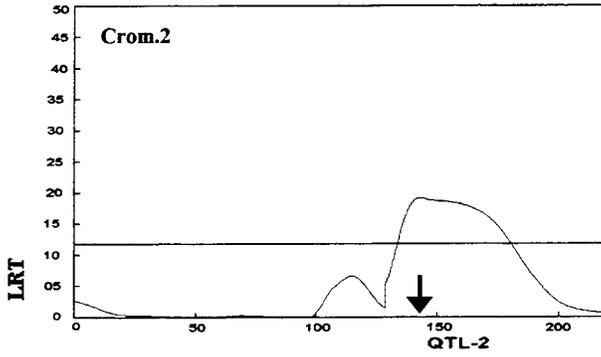
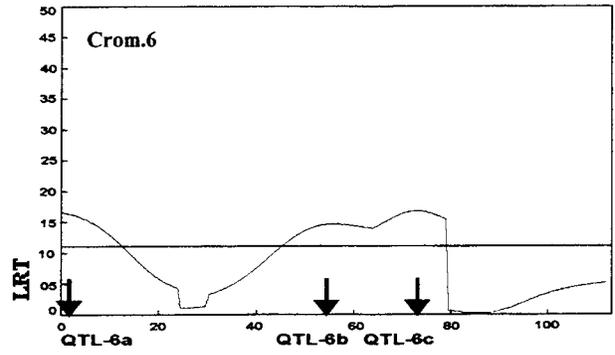
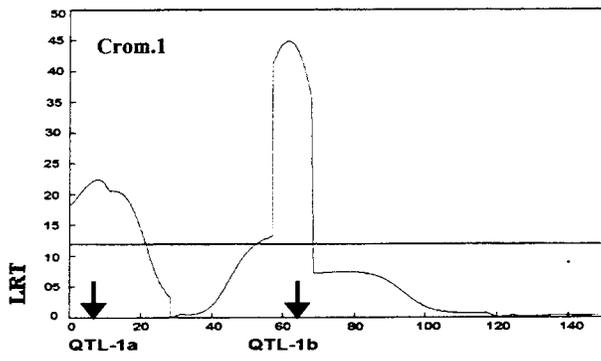
^cR²_F = Porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL.

^dR²_G = Porcentagem da variação genética explicada pelo QTL (R^2_F/h^2).

Figura 1A. Mapa genético dos 10 cromossomos de milho construído com 75 microssatélites. Os marcadores estão listados à direita da linha de mapa. O número à esquerda do cromossomo indica a distância em centimorgan (cM) entre marcadores determinada através da função de Kosambi. A posição de cada QTL associado com o teor de óleo nos grãos de milho, no intervalo entre marcadores, está apresentada à direita do cromossomo.

Figura 2A. Mapeamento de QTLs associados com teor de óleo nos grãos obtido por mapeamento por intervalo composto (CIM). O limite crítico de LRT para uma significância conjunta de 10%, foi obtido através de 1.000 permutações. As posições dos QTLs nos cromossomos estão indicadas por seta.





5- Resultados complementares

5.1- Estatística descritiva para o teor de óleo

Foram avaliadas 371 linhagens endogâmicas (S_6 e S_7) de milho para o teor de óleo nos grãos. A avaliação foi realizada para a seleção das duas linhagens contrastantes que foram utilizadas como genitoras para produzir a população F_2 . A média do teor de óleo nos grãos destas linhagens foi de $48,20 \text{ g kg}^{-1}$ (gramas de óleo por quilogramas de grãos), com intervalo de variação de $29,24 \text{ g kg}^{-1}$ (L-02-03) a $79,25 \text{ g kg}^{-1}$ (L-20-01). A distribuição de freqüências deste caráter para estas 371 linhagens encontra-se na Figura 1RC A.

A população F_2 , obtida destas linhagens contrastantes (L-02-03 X L-20-01), foi autofecundada gerando 408 progênies $F_{2,3}$, cujos grãos foram avaliados para teor de óleo com três repetições. A média da população foi de $58,40 \text{ g kg}^{-1}$ de óleo, com intervalo de variação de $44,93 \text{ g kg}^{-1}$ a $72,63 \text{ g kg}^{-1}$ de óleo. A distribuição de freqüência das médias em teor de óleo dessas progênies encontra-se na Figura 1RC B. O coeficiente de variação experimental (CV) foi de 1,7%, indicando que essa avaliação apresentou elevada precisão experimental.

5.2- Amplificação dos microssatélites e construção do mapa de ligação

O DNA genômico das duas linhagens de milho e das progênies F_1 foi amplificado com 648 microssatélites. A amplificação teve como objetivo avaliar e escolher os marcadores polimórficos. Os microssatélites polimórficos foram utilizados para a construção do mapa genético. A avaliação inicial dos microssatélites foi realizada utilizando o programa *Touchdown* PCR (Don *et al.*, 1991) e uma variação desse programa, denominado PC1 (Quadro 1). A

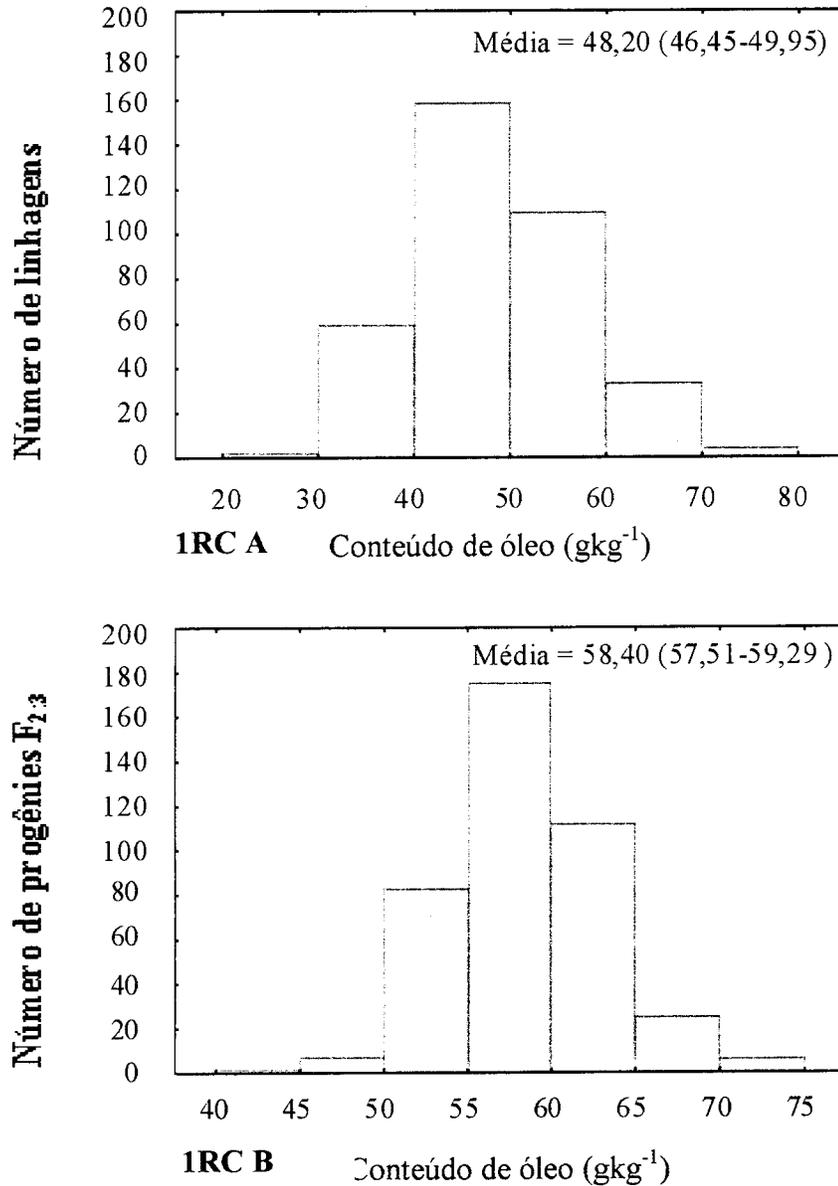


Figura 1RC. Distribuição do conteúdo de óleo em sementes de milho de 371 linhagens endogâmicas (**IRC A**) e em 408 progênies $F_{2.3}$ (**IRC B**).

amplificação dos microssatélites utilizando o programa *Touchdown* PCR teóricamente satisfaz as condições de anelamento de qualquer par de *primer*, e o uso da variação deste programa

genérico, o PC1, objetivou diminuir o tempo e melhorar a qualidade de amplificação dos microssatélites. Os resultados mostraram que os programas *Touchdown* PCR e PC1 inicialmente utilizados, são importantes para uma primeira seleção dos microssatélites, pois esses dois programas foram eficientes para amplificar 61% dos microssatélites utilizados na construção do mapa de ligação (Tabela 1RC). Para os microssatélites que não apresentaram padrões aproveitáveis com esses programas, optou-se pelo uso de programas com temperatura específica de anelamento (Quadro 2). Todos os microssatélites utilizados para a construção do mapa, suas localizações e os programas utilizados para a sua amplificação estão apresentados na Tabela 1RC.

Quadro 1. Programa de Amplificação *Touchdown* PCR com temperatura variando de 65°C a 55°C e o programa PC 1, variante do primeiro programa.

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo	
			Programas	
			Touchdown PCR	PC 1
1	Desnaturação inicial	94 °C	1 min	2 min
2	Desnaturação	94 °C	1 min	30 s
3	Anelamento	65 °C(-1 °C/Ciclo)	1 min	30 s
4	Extensão	72 °C	2 min	1 min
5	Desnaturação	94 °C	1 min	30 s
6	Anelamento	65 °C(-1 °C/Ciclo)	1 min	30 s
7	Extensão	72 °C	2 min	1 min
8	Volta ao passo 2, 9 vezes			
9	Desnaturação	94 °C	1 min	30 s
10	Anelamento	55 °C	1 min	30 s
11	Extensão	72 °C	2 min	1 min
12	Volta ao passo 9, 17 vezes			
13	Extensão Final	72 °C	2 min	2 min
14	Imersão	15 °C	-	-

Quadro 2. Programa de amplificação com temperatura específica de anelamento (46^o-56^oC), dependendo do microssatélite utilizado.

Passo	Etapa	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação inicial	94 ^o C	2 min
2	Desnaturação	94 ^o C	1 min
3	Anelamento	46 ^o -56 ^o C	1 min
4	Extensão	72 ^o C	2 min
5	Volta ao passo 2, 30 vezes		
6	Extensão final	72 ^o C	5min
7	Imersão	72 ^o C	-

Dos 648 microssatélites testados, 162 apresentaram polimorfismo entre as duas linhagens parentais, e a diferença entre os dois alelos parentais pode ser visualizada na Figura 2RC. O nível de polimorfismo obtido para esses microssatélites foi de 25%. Apesar de 162 microssatélites apresentarem polimorfismo, 87 deles não foram utilizados para a construção do mapa de ligação. Vinte desses microssatélites (12,35%) apresentaram pequena diferença entre os dois alelos parentais quando separados em gel de agarose de alta resolução. Essa pequena diferença dificultou a leitura dos alelos parentais, razão porque não foram utilizados neste experimento. Senior e Heun (1993), descreveram a agarose MetaPhor como efetiva para separar alelos de SSRs, mas esta condição de separação não resolve diferenças menores que 4 bp. A maior parte desses microssatélites possui repetições de dinucleotídeos. A distinção de indivíduos heterozigotos para os locos onde os alelos diferem por somente dois bp é difícil com essa agarose. Para esta resolução se faz necessário o uso de géis de poliacrilamida desnaturante.

Oito microssatélites polimórficos (4,94%) localizados em quatro dos 10 cromossomos do milho não foram utilizados para a construção do mapa, pois através de teste de χ^2 com um nível

Tabela 1RC. Locos de microssatélites polimórficos distribuídos através do genoma de milho e usados para a construção do mapa genético, com os programas utilizados para a amplificação destes locos marcadores.

Locos de microssatélite	Localização no cromossomo	Programa de amplificação	Locos de microssatélite	Localização no cromossomo	Programa de amplificação
BNLG1083	1.02	PC1	BNLG1700	5.03	PC1
BNLG439	1.03	55 °C	DUPSSR010	5.04	PC 1
BNLG1811	1.04	PC 1	MMC0282	5.05	50 °C
BNLG2295	1.05	56 °C	UMC1524	5.06	55 °C
BNLG1057	1.06	PC 1	BNLG2305	5.07	50 °C
BNLG2057	1.06	50 °C	BNLG386	5.09	53 °C
UMC1147	1.07	55 °C	BNLG238	6.00	Touchdown PCR
BNLG615	1.07	50 °C	BNLG426	6.01	PC 1
DUPSSR012	1.08	PC 1	UMC1133	6.01-6.03	PC 1
BNLG1720	1.09-1.10	50 °C	UMC1614	6.04-6.05	55 °C
BNLG1092	2.01	50 °C	NC013	6.05	PC 1
BNLG125	2.02	PC 1	UMC1248	6.07-6.08	PC 1
UMC1165	2.02	PC 1	UMC1426	7.00-7.01	50 °C
BNLG2248	2.03	50 °C	PHI034	7.02	PC 1
BNLG166	2.04	Touchdown PCR	BNLG657	7.02	PC 1
DUPSSR021	2.05	Touchdown PCR	UMC1112	7.03	50 °C
NC003	2.06	48 °C	BNLG1805	7.04	PC 1
BNLG1045	2.07	Touchdown PCR	BNLG1194	8.01-8.02	PC 1
PHI127	2.08	Touchdown PCR	BNLG2235	8.02	PC 1
BNLG1523	3.02	PC 1	PHI125	8.03	PC 1
PHI029	3.04	PC 1	BNLG1863	8.04	50 °C
PHI053	3.05	PC 1	BNLG1812	8.05	PC 1
PHI073	3.05	PC 1	BNLG240	8.06	PC 1
DUPSSR017	3.06	PC 1	UMC1055	8.07	50 °C
BNLG197	3.07	55 °C	BNLG1056	8.08	PC 1
BNLG1108	3.08	PC 1	PHI080	8.08	PC 1
BNLG1754	3.09	50 °C	BNLG1272	9.00	PC 1
UMC1594	3.10	55 °C	PHI068	9.01	PC 1
BNLG1370	4.00	56 °C	UMC1033	9.02	50 °C
UMC1550	4.03	PC1	PHI065	9.03	PC 1
UMC1088	4.04	50 °C	BNLG1714	9.04	PC 1
NC005	4.05	PC 1	BNLG1209	9.05	PC 1
BNLG252	4.06	PC 1	BNLG128	9.07	PC 1
DUPSSR034	4.07	PC 1	UMC1576	10.02	55 °C
BNLG2162	4.08	50 °C	BNLG1716	10.03	PC 1
UMC1109	4.10	50 °C	BNLG1526	10.04	50 °C
BNLG1890	4.11	PC 1	BNLG1360	10.07	PC 1
UMC1365	5.01	50 °C			

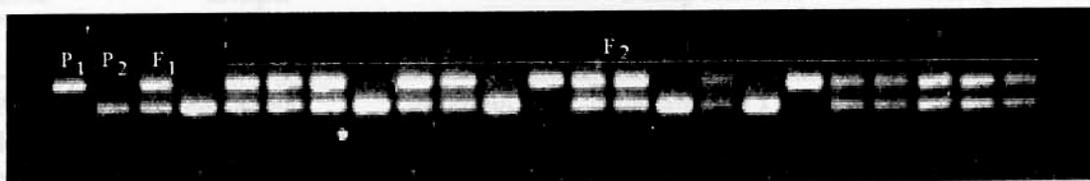


Figura 2RC. Perfil de separação dos alelos do microsatélite polimórfico PHI029 em gel de agarose metaphor 4 %. P₁ corresponde à linhagem L-20-01 e, P₂, à linhagem L-02-03. O F₁ é um dos híbridos simples proveniente do cruzamento entre as duas linhagens, e apresentando os dois alelos parentais. Pode-se notar que os dois alelos segregam na amostra da progênie F₂.

de significância de 5%, estes marcadores apresentaram desvio de segregação para a proporção mendeliana esperada (Tabela 2RC). No cromossomo 1 entre os bins 1.10 e 1.11, dois marcadores apresentaram distorção de segregação, apresentando um número muito pequeno de heterozigotos, prevalecendo, portanto, os alelos parentais; no bin 2.09 um marcador apresentou excesso de alelos da linhagem L-20-01, e dois apresentaram excesso de heterozigotos, o mesmo sendo observada para um microsatélite do bin 9.06. Para os marcadores localizados no bin 5.00 foi observada uma baixa frequência do alelo do parental 1 (L-20-01).

Os microsatélites UMC1177 (bin 1.01), BNLG572 (bin 7.03) e PHI116 (bin 7.06) (1,85% dos microsatélites polimórficos) foram excluídos, pois não apresentaram ligação a qualquer marcador dos respectivos grupos de ligação com LOD 3,0.

Os demais microsatélites não foram utilizados, pois o alelo de um dos parentais não foi observado em uma ou em todas as progênies F₁, caracterizando um alelo nulo (Figura 3RC A,

3RC B). A fim de obter uma amplificação uniforme, tentando resolver este problema, fez-se a otimização das concentrações de DNA, *Taq* DNA polimerase e $MgCl_2$, sendo obtido melhor padrão de amplificação com as concentrações apresentadas no Quadro 3. O padrão de ausência do alelo de um dos parentais em progênes F_1 não foi alterado, assim indicando que a concentração dos reagentes não é o fator determinante para amplificação dos alelos. Dentre os microssatélites polimórficos não utilizados, apenas oito ainda não estão mapeados.

Dos 162 microssatélites polimórficos, 86 foram amplificados com o DNA das 408 progênes F_2 . O comportamento desses microssatélites para cada grupo de ligação está apresentado na Tabela 2RC.

Quadro 3. Concentrações de reagentes utilizados para cada reação de amplificação dos microssatélites.

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	1 Reação
Água			9,7 μ l
Tampão	10X	1X	2,0 μ l
MgCl₂	25 mM	2,0 mM	1,6 μ l
Mix dNTPs	2,5 mM/cada	100 μ M/cada	0,8 μ l
Taq/DNA polimerase	5 U/ μ l	0,5 U	0,1 μ l
Primer F	50 ng/ μ l	20 ng ou 0,2 μ M	0,4 μ l
Primer R	50 ng/ μ l	20ng ou 0,2 μ M	0,4 μ l
DNA	10 ng/ μ l	50 ng	5,0 μ l
Total			20 μ l

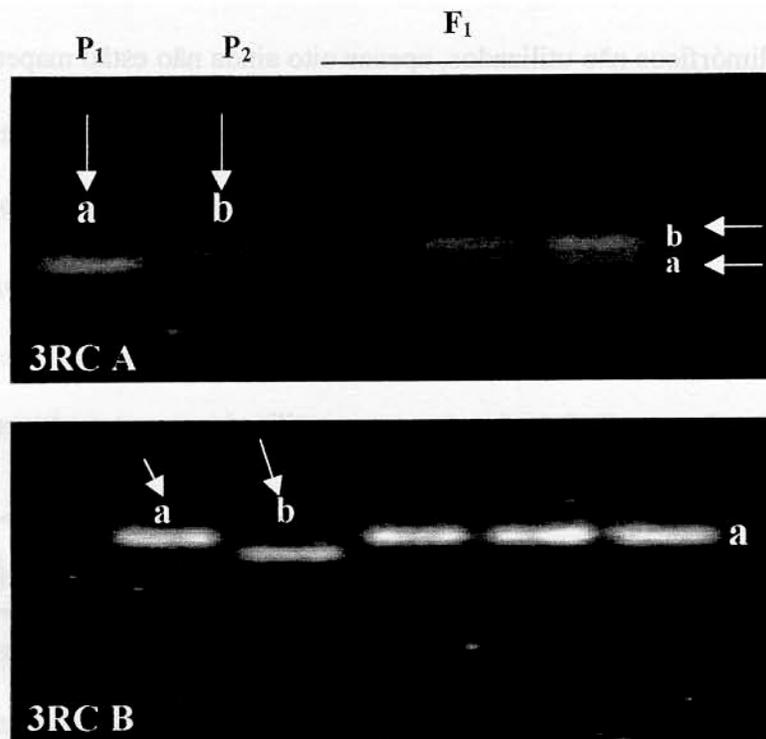


Figura 3RC. Amplificação de locos de microssatélites para as duas linhagens parentais (P₁ e P₂) e para os três híbridos simples (F₁). Em **3RC A**, na amplificação do microssatélite BNLG210 o alelo de P₁ denominado **a** não foi amplificado para um híbrido F₁. Em **3RC B**, o alelo de P₂, denominado **b** para o loco BNLG249, não foi amplificado para os três híbridos F₁, caracterizando alelo nulo em microssatélites.

Tabela 2RC. Comportamento dos microssatélites para cada grupo de ligação do mapa genético construído e localização de marcadores que não formaram grupo de ligação e que apresentaram segregação não mendeliana.

Grupo de ligação	Número total de microssatélites	Comprimento do cromossomo	Distância média entre marcadores	Marcador não ligado	Maiores distâncias	Distorção para a razão de segregação
		cM	cM	bin	cM	Número/bin
1	13	149,4	14,94	1,01	48,2	1.10; 1.11
2	12	217,9	24,21		71,2	3/2.09
3	09	190,8	21,20		38,6	
4	09	232,4	25,82		99,4	
5	09	130,1	18,59		37,1	2/5.00
6	06	113	18,83		33,7	
7	07	97,6	19,52	7.03; 7.06	44,0	
8	09	108,6	12,07		24,1	
9	08	118,1	16,87		48,2	9.06
10	04	80,7	20,18		50,3	
Total	86	1438,6		03		08

6- Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. O nível de polimorfismo obtido para os microssatélites testados para as linhagens de milho tropical Flint L-20-01 e Dentado L-02-03 foi de 25%, um valor menor que o descrito na literatura para linhagens de clima temperado;
2. Apesar do baixo aproveitamento dos marcadores testados (11,57% dos microssatélites avaliados), foi possível a construção de um mapa de ligação utilizando uma população de 408 progênies F_2 , indicando assim, que mapas podem ser construídos de forma mais rápida e eficiente utilizando microssatélite como marcador em trabalhos que envolvem grandes populações;
3. No cruzamento entre as linhagens Flint L-20-01 e Dentado L-02-03 foram mapeados 13 QTLs associados com teor de óleo, que juntos explicam 50,13% da variância fenotípica e 51,16% da variância genética;
4. Os QTLs mapeados estão localizados em quase todos os cromossomos, exceto nos cromossomos 8 e 10. A maior concentração de QTLs encontra-se nos cromossomos 5 e 6, onde foram detectados 3 QTLs em cada um;
5. O grau de dominância dos QTLs mapeados variou muito, apresentando valores de sobredominância (1 QTL), dominância completa (2 QTLs), dominância parcial (5 QTLs) e

aditivo (5 QTLs). O grau médio de dominância do conjunto destes QTLs é de dominância parcial;

6. Algumas regiões de todos os cromossomos apresentaram grandes distâncias entre marcadores, principalmente nos cromossomos 1, 2, 4, 7, 9, e 10. Estas regiões podem conter QTLs que controlam o teor de óleo nos grãos que não foram detectados. Portanto os treze QTLs mapeados podem representar apenas parte do número total que controlam este caráter nesta população. Saturações com microssatélites nestas regiões devem ser consideradas para a continuidade desta pesquisa.

7- Referências bibliográficas

- Adams, K.L. e Jensen, A.H. High-fat maize in diets for pigs and sows. *Anim Feed Sci. Tech.* v.17, p. 201-212, 1987.
- Agrama, H.A.S. e Moussa, M.E. Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica.* v.91, p. 89-97, 1996.
- Ajmone-Marsan, P.; Gorni, C.; Chittò, A.; Radaelli, R.; van Vijk, R.; Stam, P. e Motto. Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using AFLP map, different testers, and cofactor analysis. *Theor. Appl. Genet.* v.102, p. 230-243, 2001.
- Ajmone-Marsan, P.; Monfredini, G.; Ludwig, W.F.; Melchinger, A.E. e Franceschini, P. Identification of genomic regions affecting plant height and their relationship with grain yield in an elite maize cross. *Maydica.* v.39, p. 133-139, 1994.
- Akkaya, M.S.; Bhagwat, A.A. e Cregan, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics.* v.132, p. 1131-1139, 1992.
- Akkaya, M.S.; Shoemaker, R.C.; Specht, J.E.; Bhagwat, A.A. e Cregan, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.* v.35, p. 1439-1445, 1995.
- Alban, C.; Baldet, P. e Douce, R. Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Biochem. J.* v.300, p. 557-565, 1994.
- Alexander, D.E. Corn as an oil crop. In *Proc.17th of the Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference*, Vol. 17, 1962. Washington, D.C.

- Alexander, D.E. Breeding special nutritional and industrial types. In: Sprague, G.F. e Dudley, J.W. (eds.). *Corn and corn improvement*. 3rd edn. Agron. Monogr 18. 1988. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wi. p. 869-880.
- Alexander, D.E. Corn as an oil crop. In *Proc 17th Annu Hybrid Corn Ind Res Conf American Seed Trade Association*. 1963. Washington, D.C.
- Alexander, D.E. e Creech, R.G. 1977. Breeding special industrial and nutritional types. In: Sprague, G.F. (ed.). *Corn and Corn Improvement*. 2nd. edn. Agron. Monogr 18. 1977. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wi. pp. 363-391.
- Alexander, D.E. e Lambert, R.J. Relationship of kernel oil content to yield in maize. *Crop Sci*. v.8, p. 272-274, 1968.
- Alexander, D.E. High-oil. Current status of breeding and utilization. In *Proc. 13th Annual Illinois Corn Breeders School*. 1977. University of Illinois, Urbana-Champaign, IL. Mar. p. 6-7.
- Alexander, D.E. Oil content versus grain yield in corn. *Maydica*. v.44, p. 111-112, 1999.
- Alexander, D.E.; Silvela, L.; Collins, F.I. e Roggers, R.C. Analysis of oil content of maize by wide-line NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v.44, p. 555-558, 1967.
- Allard, R.W. *Principles of Plant Breeding*. 1961. John Wiley and Sons, New York. 485p.
- Alonso-Blanco, C.; Peeters, A.J.; Koornneef, M.; Lister, C.; Dean, C.; van den Bosch, N.; Pot, J. e Kuiper, M.T. Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J*. v.14, p. 259-271, 1998.
- Alrefai, R.; Berke, T.G e Rocheford, T. R. Quantitative trait locus analysis of fatty acid concentrations in maize. *Genome*. v.38, p. 894-901, 1995.
- Andrews, T.J. e Kane, H.J. Pyruvate is a by-product of catalysis by ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* v.266, p. 9447-9452, 1991.

- Austin, D.F. e Lee, M. Comparative mapping in F2:3 and F2:6 generations of quantitative trait loci for grains yield and yield components in maize. *Theor. Appl. Genet.* v.92; p. 817-826, 1996a.
- Austin, D.F. e Lee, M. Genetic resolution and verification of quantitative trait loci for flowering and plant height with recombinant inbred lines of maize. *Genome.* v.39, p. 957-968, 1996b.
- Bauman, L.F.; Conway, T.F. e Watson, S.A. Heritability of variations in oil content of individual corn kernels. *Science.* v.139, p. 498, 1963.
- Beavis, W.D. e Grant, D. A linkage map based on information from four F₂ populations of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* v.82, p. 636-644, 1991.
- Becker, J. e Heun, M. Barley microsatellites: Allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* v.27, p. 835-845, 1995.
- Beckmann, J.S. e Soller, M. Towards unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. *Bio/Technology.* v.8, p. 930-932, 1990.
- Beckmann, J.S. e Weber, J.L. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics.* v.12, p. 627-631, 1992.
- Bell, C.J. e Ecker, J.R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics.* v.19, p. 137-144, 1994.
- Berke, T.G. e Rocheford, T.R. Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height, and kernel traits in maize. *Crop Sci.* v.35, p. 1542-1549, 1995.
- Bishop, M.D.; Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; Sunden, S.L.F.; Hawkins, G.A.; Toldo, S.S.; Fries, R.; Grosz, M.D.; Yoo, J. e Beattie, C.W. A genetic linkage map for cattle. *Genetics.* v.136, p. 619-636, 1994.

- Blanco, A.; Bellomo, M.P.; Cenci, A.; De Giovanni, C.; D'Ovidio, R.; Iacono, E.; Laddomada, B.; Pagnotta, M.A.; Porceddu, E.; Sciancalepore, A.; Simeone, R. e Tanzarella, O.A. A genetic linkage map of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* v.97, p. 721-728, 1998.
- Bohn, M.; Khairallah, M.; Gonzalez de Leon, D.; Hoisington, D.A. Utz, H. QTL mapping in tropical maize. 1. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. *Crop Sci.* v.36, p. 1352-1361, 1996.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, Me e Davis, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* v.32, p. 314-331, 1980.
- Brandalitze, W. Nova realidade do mercado de milho. In: Francelli, A.L.; Dourado-Neto, D. (eds.). *MILHO tecnologia e produtividade*. 2001. ESALQ/LPV. Piracicaba-São Paulo. pp. 1-9.
- Brooks, L.D. The evolution of recombination rates. In: Michod, R.E. e Levin, B.R. (eds.). *The evolution of sex*. 1988. Sinauer Assoc., Sunderland, MA. pp. 87-105.
- Brown, A.H.D. Isozyme variation under selection in *Zea mays*. *Nature*. v.232, p. 570-571, 1971.
- Bryan, G.J.; Collins, A.J.; Stephenson, P; Orry, A. e Smith, J.B. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* v.94, p. 557-563, 1997.
- Burr, B.; Burr F.A.; Thompson, K.H.; Albertsen, M.C. e Stuber, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics*. v.118, p. 519-526, 1988.
- Byrne, P.F.; McMullen, M.D.; Snook, M.E.; Musket, T. e Theuri, J.M. Quatitative trait loci and metabolic pathways: genetic control of concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.93, p. 8820-8825, 1996.

- Cai, Q.; Guy, C.L. e Moore, G.A. Extension of the genetic linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl. Genet.* v.89, p. 606-614, 1994.
- Castiglioni, P.; Ajmone-Marsan, P.; van Wijk, R. e Motto, M. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor. Appl. Genet.* v.99, p. 425-431, 1999.
- Castiglioni, P.; Pozzi, C.; Heun, M.; Terzi, V.; Muller, K.J.; Rohde, W. e Salamini F. An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics.* v.149, p. 2039-2056, 1998.
- Causse, M.; Rocher, J.P.; Henry, A.M.; Charcosset, A. e Prioul, J.L. Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzymes loci. *Mol. Breed.* v.1, p. 259-272, 1995.
- Causse, M.; Santoni, S.; Damerval, C.; Maurice, A.; Charcosset, A. A composite map of expressed sequences in maize. *Genome.* v. 39, p.418-432, 1996.
- Chen, X.; Temnykh, S.; Xu, Y.; Cho, Y.G. e McCouch, S.R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* v.95, p. 553-567, 1997.
- Chin, E.C.L.; Senior, M.L.; Shu, H. e Smith, J.C.S. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome.* v.39, p. 866-873, 1996.
- Churchill, G.A. e Doerge, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics.* v.138, p. 963-971, 1994.
- Coe JR, E.H.; Neuffer, M.G. e Hoisington, D.A. The genetics of corn. In: Sprague, G.F. e Dudley, J.W. (eds.). *Corn and corn improvement.* 1988. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wi. pp. 81-258.

- Coe, E.H.; Davis, G.L.; McMullen, M.D.; Musket, T. e Polacco, M. Gene list and working maps. *Maize Genet. Coop. Newslett.* v.69, p. 191-192, 1995.
- Coe, E.H.; Hoisington, D.A. e Neuffer, M.G. Linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.). *Maize Genet. Coop. Newslett.* v.61, p. 116-147, 1987.
- Condit, R. e Hubbell, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. *Genome.* v.34, p. 66-71, 1991.
- Cregan, P.B.; Bhagwat, A.A.; Akkaya, M.S. e Rongwen, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods Mol. Cell. Biol.* v.5, p. 49-61, 1994.
- Cregan, P.B.; Jarvik, T.; Bush, A.L.; Shoemaker, R.C.; Lark, K.G.; Kahler, A.L.; Kaya, N. VanToai, T.T.; Lohnes, D.G.; Chung, J. e Specht, J.E. An integrated molecular genetic linkage map of soybean genome. *Crop. Sci.* v.39, p. 1464-1490, 1999.
- Curtis, J.J.; Brunson, A.M.; Hubbard, J.E. e Earle, F.R. Effect of the pollen parent on oil content of the corn kernel. *Agron. J.* v.48, p. 551-555, 1956.
- Curtis, P.E.; Leng, E.R. e Hageman, R.H. Developmental changes in oil and fatty acid content of maize strains varying in oil content. *Crop Sci.* v.8, p. 689-693, 1968.
- Damerval, C.; Maurice, A.; Josse, J.M. e de Vienne, D. Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics.* v.137, p. 289-301, 1994.
- Davis, G.L.; McMullen, M.D.; Baysdorfer, C.; Musket, T.; Grant, D.; Staebell, M.; Xu, G.; Polacco, M.; Koster, L.; Melia-Hancock, S.; Houchins, K.; Chao, S. e Coe, E.H. A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map. *Genetics.* v.152, p. 1137-1172, 1999.
- de la Roche, I.A.; Alexander, D.E e Weber, E. J. Inheritance of oleic and linoleic acids in *Zea mays* L. *Crop Sci.* v.11, p. 856-859, 1971.

- Doehlert, D.C. Distribution on enzyme activities within the developing maize (*Zea mays*) kernel in relation to starch, oil, and protein accumulation. *Physiol. Plant.* v.78, p. 560-567, 1990.
- Doehlert, D.C.; Kuo, T.M. e Felker, F.C. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. *Plant. Physiol.* v.86, p. 1013-1019, 1988.
- Doerge, R.W. e Churchill. G.A. Permutation Tests for Multiple Loci Affecting a Quantitative Character. *Genetics.* v.142, p. 285-294, 1996.
- Don, R.H.; Cox, P.T.; Wainwright, B.J.; Baker, K; Mattick, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* v.19, p. 4008-4008, 1991.
- Dudley, J.; Lambert, R.J. e de la Roche, I.A. Genetic analysis of crosses among corn strains divergently selected for percent oil and protein. *Crop Sci.* v.17, p. 111-117, 1977.
- Dudley, J.W. e R.J. Lambert. Ninety cycles of selection for oil and protein in maize. *Maydica* v.37, p. 1-7, 1992.
- Dudley, J.W.; Lambert, R.J. e Alexander D.E. Seventy generations of selection for oil and protein concentration in the maize kernel. In: Dudley, J.W. (ed.). *Seventy generations of selection for oil and protein in maize.* 1974. CSSA, Madison, Wi. pp. 181-212.
- Dufour, L; Deu, M.; Grivet, A.; D'Hont, A.; Paulet, F.; Bouet, A.; Lanaud, D.; Glaszmann, J.C. e Hamon, P. Construction of a composite sorghum genome mapa and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.* v.94, p. 409-418. 1997.
- Edwards, M.D.; Helentjaris, T.; Wright, S. e Stuber, C.W. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphisms markers. *Theor. Appl. Genet.* v.83, p. 765-774, 1992.
- Egli, M.A.; Lutz, S.M. e Gengenbach, B.G. Cloning and sequence analysis of a maize acetyl-CoA carboxylase gene. *Plant Physiology (Supplement)* v.102, p. 70, 1993a.

- Egli, M.A.; Lutz, S.M.; Gengenbach, B.G.; Gronwald, J.W.; Somers, D.A. e Wyse, D.L. Characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* v.191, p. 499-506, 1993b.
- Egli, M.A.; Lutz, S.M.; Somers, D.A. e Gengenbach, B.G. A maize acetyl-coenzyme A carboxylase cDNA sequence. *Plant Physiol.* v.108, p. 1299-1300, 1995.
- El-Rouby, M.M. e Penny, L.H. Variation and covariation in a high oil population of corn (*Zea mays* L.) and their implications in selection. *Crop Sci.* v.7, p. 216-219, 1967.
- Falconer, D.S. e Mackay, T.F.C. *Introduction to Quantitative Genetics*. 1996. Addison Wesley Longman, Harlow. 464p.
- Frova, C. e Sari-Gorla, M. Quantitative trait loci (QTLs) for pollen thermo tolerance detected in maize. *Mol. Gen. Genet.* v.245, p. 424-430, 1994.
- Gardiner, J.; Coe, E.Jr.; Melia-Hancock, S.; Hoisington, D. e Chao, S. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F₂ population. *Genetics.* v.134, p. 917-930, 1993.
- Garwood, D.L.; Webwe, E.J.; Lambert, R.J. e Alexander, D.E. Effect of different cytoplasms on oil, fatty acids, plant height and ear height in maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* v.10, p. 39, 1970.
- Genez, A.L.C. Cloning and molecular characterization of -ketoacyl-[ACP] synthases from endosperm of *Ricinus communis*. *Genbank* # L13241 e # L13242, 1993.
- Goldman, I.L.; Rocheford, T.R. e Dudley, J.W. Molecular marker associated with maize kernel oil concentration in an Illinois high protein x Illinois low protein cross. *Crop Sci.* v.34, p. 908-915, 1994.
- Goss, J. e Kerr, P.S. Challenges and opportunities for identity preserved varieties. In: *Proc 47th Ann. Corn and Sorghum Res. Conf. American Seed Trade Association*, 1992. Washington, D.C. pp. 1-31.

- Guimarães, C.T. e Moreira, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. (ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. 1999. Editora UFV Viçosa-Minas Gerais. pp. 715-740.
- Gupta, P.K.; Balyan, H.S.; Sharma, P.C. e Ramesh, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Current Science*. v.70, p. 45-54, 1996.
- Haldane, J.B.S. The recombination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linkage factors. *J. Genet.* v.8, p. 299-309, 1919.
- Hallauer, A.R. e Miranda Filho J.B. *Quantitative genetics in maize breeding*. 1988. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 468p
- Hamada, H.; Petrina, M.G. e Kakunaga, T. A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.79, p. 6465-6469, 1982.
- Han, Y.; Parsons, C.M. e Alexander, D.E. The nutritive value of high-oil corn for poultry. *J. Poult. Sci.* v.66, p. 103-111, 1987.
- Harwood, J.L. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. plant Physiol. Mol. Biol.* v.39, p. 101-138, 1988.
- Helentjaris, T.; Slocum, M.; Wright, S.; Schaefer, A.; Nienhuis, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* v. 72, p. 761-769, 1986.
- Henderson, C.B. *Maize Research and Breeders Manual N° VIII*, Illinois Foundation Seeds Inc., Champaign, IL 61820, 1976.
- Herman, E.M. Cell and molecular biology of seed oil bodies. In: Kigel, H. e Galili, G. (eds.). *Seed Development and Germination*, 1994. New York, Marcel Dekker. pp. 195-214.

- Heun, M. e Helantjaris, T. Inheritance of RAPD in F1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* v.85, p. 961-968, 1993.
- Hopkins, C.G. Improvement in the chemical composition of the corn kernel. In: *III. Agric. Exp. Stn. Bull.* 55. pp. 205-240, 1899.
- Hu, J. e Quiros, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell. Rep.* v.10, p. 505-511, 1991.
- Huang, A.H.C. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v.43, p. 177-200, 1992.
- Hughes, C.R. e Queller, D.C. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.* v.2, p. 131-137, 1993.
- Hyne, V. e Kearsey, M.J. QTL analysis: further uses of "marker regression". *Theor. Appl. Genet.* v.91, p. 471-476, 1995.
- Inglett, G.E. Kernel structure composition and quality. In: Inglett, G.E. (ed.). *Corn: Culture, Processing, Products.* 1970. Avi. Publ. Avi. CT. pp. 123-137.
- Jacob, H.J.; Lindpainter, K.; Lincoln, S.E.; Kusumi, K.; Bunker, R.K.; Mao, Yi-Pei; Ganten, D.; Dzau, V.J. e Lander, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell.* v.67, p. 213-224, 1991.
- Jansen, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. *Biometrics.* v.49, p. 227-231, 1993a.
- Jansen, R.C. A general mixture model for mapping quantitative trait loci by using molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* v.85, p. 252-260, 1992.
- Jansen, R.C. e Stam, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics.* v.136, p. 1447-1455, 1994.

- Jansen, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*. v.135, p. 205-211, 1993b.
- Jansen, R.C.; van Ooijen, J.W.; Stam, P.; Lister, C. e Dean, C. Genotype-by-environment interaction in genetic mapping of multiple quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* v.91, p. 33-37, 1995.
- Jansen, R.C. Mapping of quantitative trait loci by using genetic markers: an overview of biometrical models. In: van Ooijen JW, Jansen RC (eds). *Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers*. 1994. CPRO-DLO, Netherlands, pp. 116-124.
- Jellum, M.D. e Marion, J.E. Factors affecting oil content and oil composition of corn (*Zea mays* L.) grain. *Crop Sci.* v.6, p. 41, 1966.
- Jugenheimer, R.W. Breeding for oil and protein content in maize. *Euphytica*. v.10, p. 152, 1961.
- Kahler, A.L. Association between enzyme marker loci and agronomic traits in maize. In: *Proc. 40th Annu. Corn and Sorghum Res. Conf. Am. Seed Trade Assoc.* 1985. Washington, DC. pp. 66-89.
- Kauppinen, S. Structure and expression of the Kas 12 gene encoding a -ketoacyl-acyl carrier protein synthase I isozyme from barley. *J. Biol. Chem.* v.267, p. 23999-24006, 1992.
- Kearsey, M.J. e Hyne, V. QTL analysis: a simple "marker regression" approach. *Theor. Appl. Genet.* v.89, p. 698-702, 1994.
- Keim, P.; Diers, B.W. e Shoemaker, R.C. Genetic analysis of soybean hard seediness with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* v.79, p. 465-469, 1990.
- Khairallah, M.M.; Bohn, M.; Jiang, C.; Deutsch, J.A.; Jewell, D.C.; Mihm, J.A.; Melchinger, A.E.; Gonzalez-de-Leon, D.; Hoisington, D.A. molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. *Plant Breeding*. v.117, p. 309-318.

- Klein, B. e Töpfer, R. Characterization of cDNAs encoding β -ketoacyl-ACP reductases of *Cuphea lanceolata*. In: Cherif, A.; Ben Miled-Daoud, D.; Marzouk, B. Smaoui, A. e Zaroux, M. (eds.). *Metabolism Structure and Utilization of Plant Lipids*. 1992. Centre National Pédagogique, Tunis. pp. 156-159.
- Klein, B.; Pawlowski, K.; Hörnicke-Grandpierre, C.; Schell, J., e Töpfer, R. Isolation and characterization of a cDNA from *Cuphea lanceolata* encoding a β -ketoacyl-ACP reductase. *Mol. Gen. Genet.* v.233, p. 122-128, 1992.
- Kondo, Y.; Mori, M.; Kuramoto, T.; Yamada, J.; Beckmann, J.S.; Simon-Chazottes, D.; Montagutelli, X.; Guenet, J.L. e Serikawa, T. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mammal Genome.* v.4, p. 571-576, 1993.
- Korzun, V.; Malyshev, S.; Voylokov, A.V. e Borner, A. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, isozyme, protein, microsatellite and gene loci. *Theor. Appl. Genet.* v.102, p. 709-717, 2001.
- Korzun, V.; Melz, G e Borner, A. RFLP mapping of the dwarfing (*Ddw1*) and hairy penduncle (*Hp*) genes on chromosomes 5 of a rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* v.92, p. 1073-1077, 1996.
- Kosambi, D.D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* v.12, p. 172-175, 1944.
- Kraja, A.T. e Dudley, J.W. QTL analysis of two maize inbred line crosses. *Maydica.* v.45, p. 1-12, 2000.
- Kun-Sheng, W. e Tanksley, S.D. Abundance, Polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen. Genet.* v.241, p. 225-235, 1993.
- Lambert, R.J. High-oil corn hybrids. In: Hallauer, A.R. (ed.). *Speciality corns*. 1994. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 123-145.

- Lambert, R.J.; Alexander, S.E. Mollring, E.L. e Wiggins. B. Selection for increased oil concentration in maize kernels and associated changes in several kernel traits. *Maydica*. v.42, p. 39-43, 1997.
- Lander, E.S. and Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. v.121, p. 185-199, 1989.
- Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M.J.; Lincoln, S.E. e Newburg, L. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* v.1, p. 174-181, 1987.
- Langercrantz, U.; Ellegren, H. e Anderson, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* v.21, p. 1111-1115, 1993.
- Lanza, L.L.B.; Souza Jr., C.L.; Ottoboni, L.M.M.; Vieira, M.L.C. e Souza, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* v.94, p. 1023-1030, 1997.
- Leath, M.N. e Hill. L.D. Economics of production, marketing, and utilization. In: Watson, S.A e Ramstad, P.R (eds.). *Corn: Chemistry and technology*. 1987. Am. Assoc. of Cereal Chemistris, St. Paul. pp. 201-253.
- Lebreton, C.; Lazic-Jancic, V.; Steed, A.; Pekic, S. e Quarrie, S.A. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *J. Exp. Bot.* v.46, p. 853-865, 1995.
- Lee, K.; e Huang, A.H.C. Genes encoding oleosins in maize kernel of inbreds Mo17 and B73. *Plant Mol. Biol.* v.26, p. 1981-1987, 1994.
- Letchworth, M.B. e Lambert, R.J. Pollen parent effects on oil, protein, and starch concentration in maize kernels. *Crop sci.* v.38, p. 363-367, 1998.

- Lin, J.J. e Kuo, J. AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus*. v.17, p. 66-71, 1995.
- Litt, M. e Luty, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* v.44, p. 398-401, 1989.
- Liu, B.H. e Knapp, S.J. G. Mendel: a program for mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. *J. Hered.* v.81, p. 407, 1992.
- Loarce, Y.; Hueros, G. e Ferrer, E. A molecular linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* v.93, p. 1112-1118, 1996.
- Lubberstedt, T.; Melchinger, A.E.; Schon, C.C.; Utz, H. e Klein, D. QTL mapping testcrosses of European flint lines of maize. 1. Comparison of different testers for forage yield traits. *Crop Sci.* v.37, p. 921-931, 1997.
- Lynch, M. e Walsh, B. *Genetics and analysis of quantitative traits*. 1998. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 980p.
- Ma, X.F.; Wanous, M.K.; Houchins, K.; Rodriguez Milla, M.A.; Goicoechea, P.G.; Wang, Z.; Xie, M. e Gustafson, J.P. Molecular linkage mapping in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* v.102, p. 517-529, 2001.
- Maheswaran, M.; Subudhi, P.K.; Nandi, S.; Xu, J.C.; Parco, A.; Yang, D.C. e Huang, N. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled-haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* v.94, p. 39-45, 1997.
- McCouch, S.R.; Chen, X., Panaud, O.; Temnykh, S. Xu, Y.; Cho, Y.G.; Huang,, N.; Ishii, T. e Blair, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* v.35, p. 89-99, 1997.

- Meksem, K.; Leister, D.; Peleman, J.; Zabeau, M.; Salamini, F. e Gebhardt, C. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on Chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* v.249, p. 74-81, 1995.
- Milbourne, D.; Meyer, R.C.; Collins, A.J.; Ramsay, L.D.; Gebhardt, C. e Waugh, R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* v.259, p. 233-245, 1998.
- Miller, R.L. e Brimhall, B. Factors influencing the oil and protein content of corn grain. *Agron. J.* v.43, p. 305-311, 1951.
- Miller, R.L.; Dudley, J.W. e Alexander, D.E. High intensity selection for percent oil in corn. *Crop Sci.* v.21, p. 433-437, 1981.
- Moran, C. Microsatellite repeats in pig *sus-domestica* and chicken *gallus-domesticus* genomes. *J. Hered.* v.84, p. 274-280, 1993.
- Moreno-Gonzalez, J.; Dudley, J.W. e Lmabert, R.J. A design III study of linkage disequilibrium for percent oil in maize. *Crop Sci.* v.15, p. 840-843, 1975.
- Morgante, M. e Olivieri, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers for plant genetics. *Plant J.* v.3, p. 175-182, 1993.
- Morgante, M.; Rafalski, A.; Biddle, P.; Tingey, S.e Olivieri, A.M. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome.* v.37, p. 763-769, 1994.
- Moxon, E.R. e Wills, C. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Scientific American.* v. 280 p. 94-99, 1999.
- Mullis, K. e Faloona, F. Specific synthesis of DNA in vitro via an polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* v.155, p. 335-350, 1987.
- Murphy, D.J. Structure, function, and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res.* v.32, p. 247-280, 1993.

- Nachit, M.M.; Elouafi, I.; Pagnotta, M.A.; El Saleh, A.; Iacono, E.; Labihilili, M.; Asbati, A.; Azrak, M.; Hazzam, H.; Benschel, D.; Khairallah, M.; Ribaut, J.M.; Tanzarella, O.A.; Porceddu, E. e Sorrells, M.E. Molecular linkage map for na intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Theor. Appl. Genet.* v.102, p. 177-186, 2001.
- Newbury, H.J. e Ford-Lloyd, B.V. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Reg.* v.12, p. 43-53, 1993.
- Ohlrogge, J. e Browse, J. Lipid Biosynthesis. *The Plant Cell.* v.7, p. 957-970, 1995.
- Ohlrogge, J.B.; Browse, J. e Somerville, C.R. The genetics of plant lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1082, p. 1-26, 1991.
- Panaud, O.; Chen, X. e McCouch, S.R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* v.252, p. 579-607, 1996.
- Panaud, O.; Chen, X. e McCouch, S.R. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome.* v.38, p. 1170-1176, 1995.
- Paterniani, E. e Campos, M.S. Melhoramento do milho. In: Borém, A. (ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas.* 1999. Editora UFV, Viçosa-Minas Gerais. pp. 429-485.
- Paterniani, E. Importância do milho na agroindústria. In: Osuna, J.A. e Moro, J.R. (eds.). *Produção e melhoramento do milho.* 1995. FUNEP, Jaboticabal-São Paulo. pp. 1-12.
- Paterniani, E. Maize breeding in the tropics. In: *Crit. Ver. in Plant Sci.* v.9, p. 125-154, 1990.
- Pe, M.E.; Gianfranceschi, L.; Taramino, G.; Taechini, R e Angelini, P. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize. *Mol. Gen. Genet.* v.241, p. 11-16, 1993.

- Pejic, I.; Ajmone-Marsan, P.; Morgante, M.; Kozumplick, V.; Castiglioni, P.; Taramino, G e Motto M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* v.97, p. 1248-1255, 1998.
- Peng, Y.; Schertz, K.F.; Cartinhour, S. e Hart, G.E. Comparative genome mapping of *Sorghum bicolor* (L.) Moench using an RFLP map constructed in a population of recombinant inbred lines. *Plant Breed.* v.118, p. 22-235, 1999.
- Perry, T.W. Corn as a Livestock Feed. In: Sprague, G.F. e Dudley, J.W. (eds.). *Corn and corn improvement.* 1988. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wi. pp. 941-963.
- Plewa, M.J. e Weber, D.F. Monosomic analysis of fatty acid composition in embryo lipids of *Zea mays* L. *Genetics.* v.81, p. 277-286, 1975.
- Plewa, M.J. e Weber, D.F. The use of monosomics to detect genes conditioning lipid content in *Zea mays* L. embryos. *Can. J. Genet. Cytol.* v.15, p. 313-432, 1973.
- Poneleit, C.G. e Alexander, D.E. Inheritance of linoleic and oleic acids in maize. *Science.* v.147, p. 1585-1586, 1965.
- Post-Beittenmiller, D.; Roughan, G. e Ohlrogge, J.B. Regulation of plant fatty acid biosynthesis: analysis of acyl-CoA and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. *Plant Physiol.* v.100, p. 923-930, 1992.
- Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey M.; Vogel, J.; Tingey, S. e Rafalsky, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Mol. Breed.* v.2, p. 225-238, 1996.
- Qu, R. e Huang, A.H.C. Oleosin KD18 on the surface of oil bodies in maize. Genomic and cDNA sequences and the deduced protein structure. *J. Biol. Chem.* v.265, p. 2238-2243, 1990.

- Quackenbush, F.W.; Firch, J.G.; Brunson, A.M. e House, L.R. Carotenoid, oil, tocopherol content of corn inbreds. *Cereal Chem.* v.40, p. 250, 1963.
- Quarrie, S.A.; Steed, A.; Lbreton, C.; Gulli, M. e Calestani, C. QTL analysis of ABA production in wheat and maize and associated physiological traits. *Russ. J. Plant. Physiol.* v.41, p. 565-571, 1994.
- Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. e Williams, J.G.K. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech. News. Inform.* v.3, p. 645-648, 1991.
- Rico, C.; Zadworny, D.; Kuhnlein, U. e Fitzgerald, G.J. Characterization of hypervariable microsatellite loci in the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Mol. Ecol.* v.2, p. 271-272, 1993.
- Röder, M.S.; Korzun, V.; Wendehake, K.; Plaschke, J.; Tixier, M.H.; Leroy, P. e Ganal, M.W. A microsatellite Map of Wheat. *Genetics.* v.149, p. 2007-2023, 1998.
- Röder, M.S.; Plaschke, J.; König, S.U.; Börner, A.; Sorrells, M.E.; Tanksley, S.D. e Ganal, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* v.246, p. 327-333, 1995.
- Rongwen, J.; Akkaya, M.S.; Bhagwat, A.A.; Lavi, U. e Cregan, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl. Genet.* v.90, p. 43-48, 1995.
- Roupe, van der Voort, J.N.A.M.; van Zandvoort, P.; van Eck, H.J.; Folkertsma, R.T.; Hutten, R.B.C.; Draaistra, J.; Gommers, F.J.; Jacobsen, E.; Helder, J. e Bakker, J. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* v.255, p. 438-447, 1997.
- Sari-Gorla, M.; Pe, M.E. e Rossini, L. Detection of QTLs controlling pollen germination and growth in maize. *Heredity.* v.72, p. 332-335, 1994.

- Sax, K. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*. v.8, p. 552-560, 1923.
- Schlötterer, C. e Tautz, D. Slippage synthesis of sample sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* v.20, p. 211-215, 1992.
- Schlötterer, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. v.109, p. 365-371, 2000.
- Senior, M.L. e Heun, M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome*. v.36, p. 884-889, 1993.
- Senior, M.L.; Chin, E.C.L.; Lee, M.; Smith, J.S.C. e Stuber, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. *Crop Sci.* v.36, p. 1676-1683, 1996.
- Shadley, J.D. e Weber, D.F. Identification of a factor in maize that increases embryo fatty acid unsaturation by trisomic and B-A translocational analyses. *Can. J. Genet. Cytol.* v.22, p. 11-19, 1980.
- Shadley, J.D. e Weber, D.F. Location of chromosomal regions controlling fatty acid composition of embryo oil in *Zea mays* L. *Can. J. Genet. Cytol.* v.28, p. 260-265, 1986.
- Shagai-Marroof, M.A.; Biyashev, R.M.; Yang, G.P.; Zhang, Q. e Allard, R.W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and populations dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.91, p. 5466-5470, 1994.
- Shanklin, J. e Somerville, C. Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.88, p. 2510-2514, 1991.
- Silvela, L.; Rodgers, R.; Barrera, A. e Alexander, D.E. Effect of selection intensity and population size on percent oil in maize, *Zea mays* L. *Theor Appl. Genet.* 78,298-304, 1989.

- Slabas, A.R. e Fawcett, T. The biochemistry and molecular biology of plant lipid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* v.19, p. 169-191, 1992.
- Slabaugh, M.; Leonard, J.; Tai, H.; Jaworski, J. e Knapp, S. Condensing enzymes and thioesterases expressed in immature embryos of *Cuphea wrightii*. *Plant Lipid Symposium held in Mineapolis*, Minnesota. July 29-31, 1993.
- Smith, D.N. e Devey, M.E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome.* v.37, p. 977-983, 1994.
- Sniegowski, M.S. e Baldwin, A.R. Fatty acid composition of corn oil in relation to oil content of the kernel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v.31, p. 414-416, 1954.
- Souciet, G. e Weil, J.H. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the (*Zea mays* L.) acyl carrier protein (ACP)-comparison to other ACP genes and ACPs. *Plant Sci.* v.81, p. 215-225, 1992.
- Souza Jr., C.L. Genetic variances of molecular markers of F₂ and related populations. *Rev. Brasil. Genet.* v.15, p. 913-926, 1992.
- Sprague, G.F.; Miller, P.A. e Brimhall, B. Additional studies of the relative effectiveness of two systems of selection for oil content of the corn kernel. *Agron J.* v.44, p. 329-331, 1952.
- Stam, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant. J.* v.3, p. 739-744, 1993.
- Stuber, C.W.; Edwards, M.D. e Wendel, J.F. Molecular marker-facilites investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its components traits. *Crop. Sci.* v.27, p. 639-648, 1987.
- Stuitje, A.R.; Kater, M.M.; Verwoert, I.I.G.S.; Fawcet, T.; Slabas, A.R. e Nijkamp, H.J.J. Molecular genetic studies of plant enoyl-ACP reductase and bacterial malonyl CoA-ACP transacylase genes. In: Murata, N. e Somerville, C. (eds.). *Current Topics in Plant*

- Physiology: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants.*
1993. American Society of Plant Physiologists, Rockville. v.9, p. 121-132.
- Sughroue, J.R. e Rocheford, T.R. Restriction fragment length polymorphism genotypic frequency differences among Illinois Long-Term selection oil strains. *Theor Appl. Genet.* v.87, p. 916-924, 1994.
- Tai, H. e Jaworski, J.G. 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach (*Spinacia oleracea*) is not similar to other condensing enzymes of fatty acid synthase. *Plant Physiol.* v.103, p. 1361-1367, 1993.
- Taramino, G. e Tingey, S. Simple sequence repeats for germoplasm analysis and mapping in maize. *Genome.* v.39, p. 277-287, 1996.
- Tautz, D; Trick, M. e Dover, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature.* v.322, p. 652-656, 1986.
- Thoday, J.M. Location of polygenes. *Nature.* 191, p. 368-370, 1961.
- Thoday, J.M. Polygene mapping uses and limitations. In: Thompson, J.N. e Thoday, J.M. (eds.). *Quantitative genetic variation.* 1979. Academic Press, NY. pp. 219-233.
- Thomas, M.R. e Scott, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* v.86, p. 985-990, 1993.
- Töpfer, R. e Martini, N. Molecular cloning of cDNAs or genes encoding proteins involved in *de novo* fatty acid biosynthesis in plants. *Plant Mol. Biol.* v.143, p. 416-425, 1994.
- Töpfer, R.; Martini, N. e Schell, J. Modification of plant lipid synthesis. *Science* v.268, p. 681-686, 1995.
- True, J.R.; Mercer, J.M. e Laurie, C.C. Differences in crossover frequency and distribution among three sibling species of *Drosophila*. *Genetics.* v.142, p. 507-523, 1996.

- van de Loo, F.J.; Fox, B.G. e Somerville, C. Unusual fatty acids. In: Moore, Jr. T.S. (ed.). *Lipid Metabolism in Plants*. 1993. FL CRC Press, Boca Raton pp. 91-126.
- Veldboom, L.R. e Lee, M. Molecular-markers-facilitated studies of morphological traits in maize.2. Determination of QTLs for grain yield and yield components. *Theor. Appl. Genet.* v.89, p. 451-458, 1994.
- Veldboom, L.R.; Lee, M. e Woodman, W.L. Molecular-marker-facilitated studies in an elite maize population. 1. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. *Theor. Appl. Genet.* v.88, p. 7-16, 1994.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. e Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* v.23, p. 4407-4414, 1995.
- Vosman, B.; Arens, P. Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. *Genome.* v.40, p. 25-33, 1997.
- Vosman, B.; Arens, P.; Rus-Kortekaas, W. e Smulders, M.J.M. Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theor. Appl. Genet.* v.85, p. 239-244, 1992.
- Vuylsteke, M.; Mank, R.; Antonise, R.; Bastiaans, E., Senior, M.L.; Stuber, C.W.; Melchinger, A.E.; Lubberstedt; Xia, X.C.; Stam, P.; Zabeau, M. e Kuiper, M. Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* v.99, p. 921-935, 1999.
- Wang, G-L.; Mackill, D.J.; Bonman, J.M.; McCouch, S.R.; Champoux, M.C. e Nelson, R.J. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar. *Genetics.* v.136, p. 1421-1434, 1994.
- Watson, S.A. Corn marketing, processing, and utilization. In: Sprague, G. F e Dudley, J.W. (eds.). *Corn and corn improvement*. 1988. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wi, pp. 881-940.

- Watson, S.A. Structure and composition. In: Watson, S.A. (ed.). *Corn chemistry and technology*. 1987. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, chap 3.
- Waugh, R.; Baird, E. e Powell, W. The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. *Plant Cell Rep.* v.11, p. 466-469, 1992.
- Weber, E.J. Lipids of the kernel. In: Watson, S.A e Ramstad, P.E. (eds.). *Corn: Chemistry and technology*. 1987. Am. Assoc. of Cereal Chemists, St. Paul, pp. 311-350.
- Weber, E.J. Variation in corn (*Zea mays* L.) for fatty acid compositions of triglycerides and phospholipids. *Biochem. Genet.* v.21, p. 1-13, 1983.
- Weber, J.L. e May, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Gen.* v.44, p. 388-396, 1989.
- Weissenbach, J.; Gyapay, G.; Dib., C.; Vignal, A.; Morissette, J.; Millasseau, P.; Vaysseix, G. e Lathrop, M. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* v.359, p. 794-801, 1992.
- Welsh, J.; Honeycutt, R.J.; Mcclelland, M. e Sobral, B.W.S. Parentage determination in maize hybrids using the arbitraly primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl. Genet.* v.82, p. 473-476, 1991.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. e Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* v.18, p. 6531-6535, 1990.
- Wright, S. *Evolution and the genetics of populations I. Genetic and biometric foundations*. Univ. Chicago Press, Chicago, 1968.
- Wu, K. e Tanksley, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* v.241, p. 225-235, 1993.

- Wu, W.R. e Li, W.M. Model fitting and model testing in the method of joint mapping of quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* v.97, p. 477-482, 1996.
- Yang, G.P.; Shagai Maroof, M.A.; Xu, C.G.; Zhang, Q. e Biyashev, R.M. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* v.245, p. 187-194, 1994.
- Yu, Y.G.; Shagai Maroof, M.A.; Buss, G.R.; Maughan, P.J. e Tolin, S.A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology.* v.84, p. 60-64, 1994.
- Zeng, Z.-B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics.* v.136, 1457-1466, 1994.
- Zeng, Z.-B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.90, p. 10972-10976, 1993.
- Zhao, X. e Kochert, G. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeat, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* v.231, p. 353-359, 1992.
- Zhao, X. e Kochert, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molec. Biol.* v.21, p. 607-614, 1993.