

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Milena de Luna Alves Lima

“MAPEAMENTO DE QTL PARA PRODUÇÃO DE GRÃOS E CARACTERES DE PLANTA EM
MILHO TROPICAL UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutorado em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Júnior

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza

Campinas - SP

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia



Milena de Luna Alves Lima

"MAPEAMENTO DE QTL PARA PRODUÇÃO DE GRÃOS E CARACTERES DE PLANTA EM
MILHO TROPICAL UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES"

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Milena de Luna Alves Lima
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutorado em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Júnior
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza

Campinas - SP
2006

UNIDADE BC
 CHAMADA HUNICAMP
L628m
 EX
 OMBO BC/ 69279
 ROC. 16.123.06
 C ☐ D ☒
 REÇO 1.08
 DATA 11-07/10

BIB ID- 382151

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

L628m

Lima, Milena de Luna Alves

Mapeamento de QTL para produção de grãos e caracteres de planta em milho tropical utilizando marcadores microssatélites / Milena de Luna Alves Lima.
-- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Cláudio Lopes de Souza Júnior.

Co-orientadora: Anete Pereira de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Genética vegetal. 3. Mapeamento de QTL. 4. Microssatélites (Genética). I. Souza Júnior, Cláudio Lopes de. II. Souza, Anete Pereira de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Mapping QTL for grain yield and plant traits using microsatellite markers in a tropical maize population.

Palavras-chave em inglês: Corn; Plant genetics; QTL analysis; Microsatellites (Genetics).

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

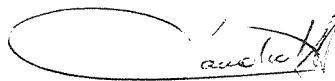
Banca examinadora: Cláudio Lopes de Souza Júnior, Louis Bernard Klaczko, Michel Georges Albert Vincentz, Carlos Augusto Colombo, Luciano Consoli, Ana Maria Lima de Azeredo-Espin, José Baldin Pinheiro, Marcelo Menossi Teixeira.

Data da defesa: 20/02/2006.

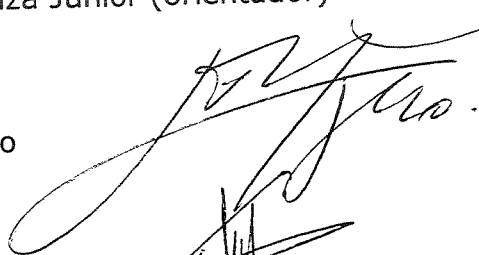
Campinas, 20 de fevereiro de 2006.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Júnior (orientador)



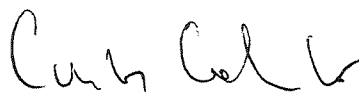
Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko



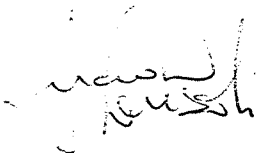
Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo



Dr. Luciano Consoli



Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

José Baldin Pinheiro

Marcelo Menossi Teieira

200614850

DEDICO

Aos meus pais Elza e Odamil

*pelo apoio irrestrito tornando
a minha vida científica possível.*

Ao meu marido Renato

pela escolha do caminho a dois.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Jr. pela orientação segura, disponibilidade e paciência, sempre com grandes ensinamentos a oferecer, pela amizade e por me ensinar a ver que Drummond não é apenas um poeta.

A Prof^a. Dr^a. Anete Pereira de Souza pela coorientação, direcionamento e disponibilidade indispensáveis para a realização desse trabalho, pela amizade e exemplo de profissional.

À Prof^a. Dr^a. Elza Áurea de Luna Alves Lima (UFPE) pela revisão do texto, sugestões e estímulos constantes.

A Dr^a. Luciana Aparecida Carlini-Garcia pelo auxílio durante toda parte de análise dos dados de campo e de mapeamento, pela amizade e pelos momentos agradáveis nas longas horas em frente ao computador.

Ao doutorando Dyeme Antônio Vieira Bento por conduzir com competência meus experimentos de campo, pela amizade e por sua paciência, sempre disposto a atender as minhas inúmeras dúvidas sobre os dados de campo.

Aos professores membros da pré-banca e banca pela disponibilidade em participar deste trabalho e pelas sugestões e considerações apresentadas.

Aos Professores do Departamento de Genética/IB/UNICAMP, pela minha formação acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Análise Genética e Molecular/CBMEG, pelas trocas de experiências e momentos de convivência agradáveis no dia-a-dia.

Aos colegas do “Barracão” do Departamento de Genética ESALQ/USP: Geovani, Gustavo, Mateus, Sidney, Tassiano e Ubirajara, por terem me acolhido tão bem no grupo e pelos momentos de descontração nas minhas horas de cansaço nas inúmeras idas até Piracicaba.

Aos meus colegas do Instituto de Botânica de São Paulo, sempre dispostos a ajudar, tornando menos árdua a etapa final da tese.

Aos técnicos do Laboratório da Unicamp pela ajuda e assistência durante a condução dos experimentos na bancada.

Aos técnicos agrícolas da ESALQ/USP Jocelino, Ariberto e Márcio pela condução e coleta de dados dos ensaios experimentais indispensáveis para o sucesso das pesquisas.

Aos meus pais, Elza e Odamil, pelo apoio incondicional durante todas as etapas na minha vida, e pelo exemplo de vida indispensável para me tornar uma pesquisadora.

Ao meu marido Renato pela presença constante, compreensão irrestrita, carinho, paciência, enfim, por estar ao meu lado, dando um novo sentido a minha vida.

A toda a família Terzi pelas horas de felicidade que me proporcionaram durante estes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado (FAPESP, 01/05702-6) e auxílio financeiro (99/11479-6; 99/12143-1).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xviii
SUMMARY.....	xix
1. Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	03
2.1. Milho.....	03
2.1.1. Origem.....	03
2.1.2. Importância genética.....	03
2.1.3. Importância econômica.....	05
2.1.4. Dados econômicos no Brasil e no mundo.....	06
2.2. Marcadores moleculares e os microssatélites.....	10
2.3. Mapeamento de QTL.....	16
2.3.1. Caracteres quantitativos e QTL.....	16
2.3.2. Marcador e mapeamento genético.....	17

2.3.3. Populações utilizadas no mapeamento.....	18
2.3.4. Mapa genético.....	21
2.3.5. Métodos de mapeamento.....	23
2.4. QTL em milho.....	28
2.4.1. Milho temperado.....	28
2.4.2. Milho tropical.....	30
2.4.3. QTL X ambiente.....	32
3. Referências Bibliográficas.....	35
4. Capítulos.....	49
Capítulo 1: MAPA GENÉTICO SATURADO EM UMA POPULAÇÃO F₂ DE MILHO TROPICAL UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	50
Capítulo 2: MAPPING QTL FOR GRAIN YIELD AND PLANT TRAITS IN A TROPICAL MAIZE POPULATION.....	72
5. Conclusões e Perspectivas.....	104
6. Anexo.....	106

LISTA DE TABELAS

2. Revisão da Literatura

Tabela 1. Dados dos últimos cinco anos da produção de grãos de milho, em milhões de toneladas, dos cinco maiores produtores no <i>ranking</i> mundial.....	08
---	----

Tabela 2. Estimativa dos três principais produtos cultivados no Brasil e os dados de área plantada, produção de grãos e o valor bruto de produção (2003/2004).....	08
---	----

4. CAPÍTULOS

Capítulo 1

Tabela 1. Comportamento dos 10 grupos de ligação do mapa genético da população F ₂ de milho tropical e suas distâncias em centimorgans (cM).....	71
--	----

Capítulo 2

Table 1. Estimates of variance components, heritability coefficients, means and ranges of the F _{2:3} families for several maize traits.....	100
--	-----

Table 2. Estimates of genetic (above diagonal) and phenotypic (below diagonal) correlations between several traits.....	101
--	-----

Table 3. Genomic positions, LR values, gene actions and average levels of dominance (ALD), and coefficients of determination (R ²) for the QTL mapped for grain yield and ears per plant evaluated in five environments (A, B, C, D, and E).....	102
---	-----

Table 4. Genomic positions, LR values, gene actions and average levels of dominance (ALD), and coefficients of determination (R^2) for the QTL mapped for plant lodging, plant height, and ear height evaluated in four environments (A, B, C, and D).....	103
---	-----

6. Anexo

Table 1A. Os 64 microssatélites selecionados e utilizados no mapa genético saturado, apresentados na ordem de sua localização no genoma do milho, denominação dos locos e o respectivo programa de amplificação.	108
--	-----

Table 2A. QTL mapeados para o caráter número de folhas acima da primeira espiga: posição genômicas, valores de LR, tipo de ação gênica, grau médio de dominância, e coeficiente de determinação (R^2).....	109
---	-----

LISTA DE FIGURAS

2. Revisão da Literatura

Figure 1. Produção de milho nos último dez anos agrícolas em milhares de toneladas.....	09
Figura 2. Suprimento mundial de milho em grãos; safra 2005/2006, estimativa; safra 2007/2008, previsão; em milhões de toneladas.....	09
Figura 3. Formação de mudança da matriz de leitura durante a replicação das fitas de DNA. Nesta etapa pode ocorrer um deslize em uma unidade de repetição, podendo ser formada por um ou mais pares de bases nucleotídicas. Ocorre a formação de alças que são estabilizadas pelo pareamento desigual das unidades de repetição nucleotídicas, causando inserções (I) ou deleções (II) nas fitas de DNA. Os números de 1 a 6 referem-se a unidade de repetição de um trinucleotídeo. As fitas de cor preta representam o DNA molde e as de cor azul representam o DNA recém-sintetizado complementar à fita molde.....	13
Figura 4. <i>Crossing-over</i> desigual entre diferentes cromossomos durante a meiose. Fenômeno que ocorre para explicar as mudanças mais drásticas nas unidades de repetição. A figura representa os cromossomos, após o <i>crossing-over</i> , com muitas (I) e poucas (II) unidades de repetições.....	13

4. CAPÍTULOS

Capítulo 1

Figura 1. Mapa genético com 139 marcadores microssatélites da população F_2 de milho tropical obtida pelo cruzamento das linhagens parentais L-02-03D e L-20-01F. O nome de cada marcador está identificado do lado direito de cada cromossomo, do lado esquerdo estão suas distâncias em centimorgans (cM). Os círculos pretos nos cromossomos indicam as posições estimadas dos centrômeros, obtidas por Gardiner *et al.* (1993). A extensão total do mapa foi de 1.858,61 cM com intervalo médio de 13,47 cM entre microssatélites..... 69

Figura 2. Distribuição do polimorfismo alélico entre as linhagens parentais e a população F_2 de milho tropical com os 392 microssatélites testados..... 70

Figura 3. Distribuição da frequência por tipo de repetição em *tandem* dos 72 microssatélites polimórficos selecionados..... 70

6. Anexo

Figura 1A. Perfil do polimorfismo alélico da população F_2 sob mapeamento, utilizando o microssatélite (GGAGA)₆ denominado umc1069, localizado no braço longo do cromossomo 8. No gel os três primeiros correspondem, ao parental 1 (P_1), parental 2 (P_2) e a geração F_1 , em seguida 45 progênies F_2 . A eletroforese foi realizada em um gel de agarose de alta resolução (agarose/MetaPhor) a 4%, corado com brometo de etídio e digitalizada pelo equipamento GeneGenius (Syngene Ltda.)..... 107

Figura 2A. Mapa genético dos 10 cromossomos da população F_2 de milho tropical derivada das linhagens L-02-03D e L-20-01F, construído com 139 marcadores microssatélites. Os nomes de cada marcador estão identificados do lado direito de cada cromossomo e do lado esquerdo estão suas distâncias em *centimorgans* (cM). A extensão total do mapa é de 1.858,61 cM com intervalo médio de 13,47 cM entre marcadores. As posições dos 47 QTL mapeados estão indicadas pelos triângulos. Cada QTL foi chamado pelas iniciais do nome do caráter em inglês (ex. *gy*, *grain yield*), seguido por um número (número do cromossomo) e por uma letra (para mais de um QTL no mesmo cromossomo)..... 110

Figura 3A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 1 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 111

Figura 4A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 2 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os

caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 112

Figura 5A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 3 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 113

Figura 6A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 4 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 114

Figura 7A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 5 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta

(EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 115

Figura 8A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 6 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 116

Figura 9A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 7 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados

em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 117

Figura 10A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 8 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 118

Figura 11A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 9 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 119

Figura 3A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 10 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento

(AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas $LR(1)=22,68$ para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, $LR(2)=20,73$ para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e $LR(3)=18,68$ para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes..... 120

RESUMO

A maior parte dos caracteres de importância agronômica e econômica do milho estão sob o controle de diversos locos gênicos, denominados locos de caracteres quantitativos (QTL). A possibilidade do uso de marcadores moleculares e o aperfeiçoamento dos modelos estatístico-genéticos possibilitaram o mapeamento desses locos gênicos que afetam tais caracteres. Pouco enfoque no estudo de mapeamento de QTL foi dado em populações derivadas do germoplasma do milho tropical, o qual possui uma base genética ampla com maior diversidade do que o germoplasma temperado. Da mesma forma, pouco se conhece sobre as interações dos QTL nos diferentes ambientes (QTL X E). Duzentos e cinquenta e seis progênies $F_{2:3}$, derivadas do cruzamento de duas linhagens de milho tropical, foram avaliadas em cinco ambientes. O mapa genético foi desenvolvido com 139 marcadores microssatélites, utilizando o programa MAPMAKER/EXP versão 3.0b. As análises de mapeamento de QTL e a detecção da interação QTL X E foram realizadas utilizando o procedimento JZmapQTL do programa Windows QTL-Cartographer versão 2.5, que se baseia na análise de mapeamento em ambientes múltiplos (mCIM). A extensão total do mapa genético foi de 1.858,61 cM com intervalo médio entre marcadores de 13,47 cM. Dezesesseis QTL foram mapeados para produção de grãos, oito para espiga por planta, seis para acamamento, seis para altura de planta, nove para altura de espiga e dois para número de folhas. Os efeitos genéticos dos QTL mapeados apresentaram variação em sinal e magnitude, demonstrando que cada QTL contribui de forma particular para a expressão dos caracteres. A maioria destes QTL apresentou ação gênica sobredominante, e muitos deles também apresentaram significativa interação QTL X E. Esses resultados forneceram dados para uma melhor compreensão da arquitetura genética do genoma do milho tropical. Estas informações podem ser utilizadas em programas de seleção assistida dessa espécie, utilizando marcadores moleculares, gerando mais eficiência nos programas brasileiros de melhoramento.

SUMMARY

Most of important agricultural and economical traits in maize are under the control of several gene loci, named quantitative trait loci (QTL). The possibility of using molecular markers and the statistic-genetic models made possible the mapping of these gene loci that affect such traits. Little focus has been given to QTL mapping study in populations derived from tropical maize germplasm, which has a broad genetic base with greater variability than temperate maize germplasm. Also, not much is known about the interaction of QTL in various environments (QTL X E). Two-hundred and fifty-six $F_{2:3}$ progenies, derived from a crossing between two tropical maize inbred lines, were evaluated in five environments. The genetic map was developed with 139 microsatellite markers, using the software MAPMAKER/EXP version 3.0b. The analyses of QTL mapping and the detection of QTL X E interaction were performed using the Windows QTL-Cartographer version 2.5, JZmapQTL procedure, which is based on multiple-environment joint analysis (mCIM). The genetic map spanned 1,858.61 cM in length with an internal average of 13.47 cM between markers. Sixteen QTL were mapped for grain yield, eight for ears per plant, six for plant lodging, six for plant height, nine for ear height and two for number of leaves. The genetic effects of the mapped QTL presented varied signal and magnitude, displaying that each QTL contributes in a particular way for trait expression. Most of these QTL displayed gene action overdominance, many of them with significant QTL X E interaction detected. These results provide data for a better comprehension of genetic architecture on tropical maize genome. This information can be used in the marker-breeding selection of this species, leading more efficiency to Brazilian breeding programs.

1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais praticadas no mundo, devido a sua utilização como fonte de alimento para o homem e para vários animais, e também por sua ampla adaptação aos mais variados ecossistemas atingindo regiões de climas tropicais, subtropicais e temperados (Paterniani e Campos, 1999; Laborda, 2003).

Os caracteres economicamente importantes na cultura de milho são controlados por um loco ou diversos locos, chamados de locos controladores de caracteres quantitativos ou QTL (*Quantitative Trait Loci*). Estes locos podem conter alelos influenciando um caráter, com sua expressão fenotípica apresentando variação contínua, que se assemelha a uma distribuição normal. A variação contínua é gerada pela segregação simultânea dos vários locos, pela influência do ambiente no caráter e pela interação do QTL com o ambiente. Devido a estas características, a avaliação da herança dos caracteres quantitativos, feitos nos programas de melhoramento genético da espécie, é uma tarefa complexa (Allard, 1960; Stuber *et al.* 1987; Falconer e Mackay, 1996).

Parâmetros estatísticos como médias, variâncias e covariâncias são utilizadas com sucesso no estudo da herança dos caracteres quantitativos. Contudo são baseadas em modelos genéticos que consideram a soma dos efeitos de todos os locos segregantes da população sob investigação. Com o uso dos marcadores moleculares, para a investigação destes caracteres, aliados a disponibilidade de novas metodologias estatísticas de mapeamento de QTL, possibilitaram o monitoramento de regiões cromossômicas específicas que afetam a expressão do caráter, fornecendo informações sobre o número, localização e magnitude dos efeitos do loco ou locos que controlam os caracteres quantitativos (Edwards *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1992; Zeng *et al.*, 1999).

A construção de um mapa genético utilizando marcadores moleculares com um bom nível de saturação é um dos primeiros passos para a identificação eficiente dos locos que participam do controle de um caráter quantitativo (Lynch e Walsh, 1998). O primeiro marcador molecular que possibilitou saturar o mapa genético de

milho foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Helentjaris *et al.*, 1986; Gardiner *et al.*, 1993). Com o desenvolvimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) uma segunda geração de marcadores moleculares substituiu gradativamente o uso do RFLP na construção de mapas genéticos. Neste grupo temos os microssatélites (Litt e Luty, 1989), também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeat*), que são os mais eficientes marcadores utilizados na construção de mapas genéticos, devido a sua ampla distribuição no genoma do milho, alto polimorfismo, facilidade na obtenção e análise dos dados (Taramino e Tingey, 1996; Sharopova *et al.*, 2002; Schlötterer, 2004).

Nos últimos anos vários métodos de mapeamento de QTL foram propostos, destacando-se: análise de marcas simples (Stuber *et al.*, 1987), mapeamento por intervalo (Lander e Botstein, 1989), mapeamento por intervalo composto (Jansen e Stam, 1994; Zeng, 1994) e o mapeamento por intervalos múltiplos (Kao *et al.*, 1999). Contudo, o único método de mapeamento de QTL que permitiu as avaliações dos dados fenotípicos em diversos ambientes possibilitando a detecção QTL X E foi o proposto por Jiang e Zeng (1995), que é uma extensão do método de mapeamento por intervalo composto, chamado de método de mapeamento de QTL em ambientes múltiplos (mCIM).

A maioria dos estudos de mapeamento de QTL foi realizada utilizando linhagens de milho desenvolvidas em regiões de clima temperado como Europa e EUA (Edwards *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1987, Edwards *et al.*, 1992; Stuber *et al.*, 1992; Veldboom e Lee, 1996a, Graham *et al.*, 1997, Berke e Rocheford, 1999; Bouchez *et al.*, 2002). Poucos estudos foram realizados utilizando linhagens desenvolvidas em clima tropical, que apresenta grande diferença nas condições ambientais (Ribaut *et al.*, 1996; Sibov *et al.*, 2003; Mangolin *et al.*, 2004). Assim, o trabalho teve por objetivo saturar o mapa genético de uma população F_2 de milho tropical, mapear QTL associados a seis caracteres de importância econômica e detectar a ocorrência da interação QTL X E em 256 progênies $F_{2:3}$ avaliadas em diversos ambientes utilizando o método de mapeamento de QTL por intervalo composto em ambientes múltiplos.

2. Revisão da Literatura

2.1. Milho

2.1.1. Origem

Originário das Américas, o milho é uma das culturas mais antigas do mundo. Segundo relatos arqueológicos dos índios das Américas “milho”, significa “o que gera vida” (Luven, 1968). Um exemplar arqueológico de milho, com cerca de 7.000 anos de idade, foi encontrado na localidade de Tehuacán, próximo ao vale Puebla no México (Mangelsdorf, 1974). Possivelmente os antigos habitantes utilizavam suas sementes na alimentação (Beaddle, 1978). A origem do milho está intimamente ligada ao teosinto, considerado o seu parente mais próximo e com o qual se cruza livremente, produzindo progênes férteis. Apesar de diferentes hipóteses conflitantes, parece mais aceitável que o milho corresponda, na verdade, ao teosinto domesticado (Laborda, 2003).

Logo após o descobrimento das Américas o milho foi levado para a Europa, onde foi cultivado em jardins até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Com o tempo o cultivo do milho se expandiu pelo mundo passando a ocupar um lugar de destaque como principal alimento dos povos, ocupando praticamente todo o continente americano, em consequência da seleção praticada pelo homem (Paterniani e Campos, 1999). Atualmente o milho é cultivado desde a amplitude latitudinal de 50⁰N (União Soviética) a 50⁰S (Argentina), compreendendo climas tropicais, subtropicais e temperados, e também, ao nível do mar e às altitudes superiores a 3.000 metros. Assim, demonstrando a alta adaptabilidade da cultura para os diversos ambientes (Fischer e Palmer, 1983).

2.1.2. Importância genética

O milho ocupa um lugar de destaque entre as espécies alógamas, devido à sua importância econômica e também pela sua importância em termos

científicos/tecnológicos, o qual gerou um grande número de conhecimentos na área de melhoramento. Esta espécie auxiliou o desenvolvimento de toda a base genética necessária ao melhoramento de plantas, cujos resultados têm contribuído tanto para o aprimoramento de diferentes métodos de melhoramento de milho, quanto para promover os conhecimentos que têm sido empregados em outras espécies vegetais cultivadas (Dowswell *et al.*, 1996).

O milho é uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L.; é uma planta diplóide ($2n=20$), identificada como *Zea mays* L. subsp. *mays*, para se distinguir do seu parente silvestre mais próximo, o teosinto ($2n=20$) *Zea mays* L. subsp. *mexicana* (Goodman e Smith, 1987). O milho é uma espécie altamente politípica, apresentando cerca de 300 raças conhecidas, dentro das quais podem ser identificadas variedades de grande diversidade genética (Paterniani, 1990; Paterniani e Campos, 1999).

Planta anual de porte alto e com um extensivo sistema radicular, o milho é uma espécie monóica de polinização cruzada, com estruturas masculinas e femininas bem distintas e de fácil manipulação. A inflorescência feminina (espiga) se desenvolve na axila de folhas localizadas na parte central da planta, a inflorescência masculina (pendão) no ápice da mesma planta. Além destas características, esta espécie produz pólen abundante, grande quantidade de ovários e a liberação de grãos de pólen do pendão, antes da emergência dos estigmas da espiga da mesma planta (protandria), facilitando tanto a fecundação cruzada natural, quanto os cruzamentos manuais dirigidos. Estes fatores foram preponderantes na escolha da espécie como organismo modelo para estudos de genética (Viana *et al.*, 1999).

Por ser uma espécie alógama, as plantas de milho não transmitem o seu genótipo integralmente para a geração seguinte, como ocorre em espécies autógamas, mas os seus alelos. Portanto, a cada geração surgirão indivíduos que apresentarão combinações alélicas diferentes das de seus pais. Isto demonstra que nas populações alógamas o que tem maior importância não é a constituição alélica do indivíduo, mas o conjunto gênico que é compartilhado pelo conjunto de indivíduos dessa população (Araújo e Paterniani, 1999). Para que os genótipos das

populações sejam fixados, as plantas são autofecundadas sucessivamente por seis a oito gerações para a obtenção de linhagens homozigóticas (Shull, 1910). Segundo Shull (1909), a essência da obtenção do milho híbrido é obter o maior número possível de híbridos através do cruzamento destas linhagens e experimentá-los para se determinar os pares de linhagens com melhor comportamento de acordo com os objetivos do programa de melhoramento.

De forma geral, os híbridos formados de linhagens das populações de diferentes origens, apresentam desempenho superior em relação àqueles obtidos em linhagens de populações da mesma origem, devido ao fenômeno da heterose. Assim, é comum classificar as diversas populações em grupos heteróticos, para que a heterose dos cruzamentos seja maximizada e, conseqüentemente, sejam selecionados os híbridos de melhor desempenho (Souza Jr., 2001). O estabelecimento, a manutenção e o melhoramento desses grupos, dentro dos programas de melhoramento, são de extrema importância para garantir o sucesso na obtenção de melhores linhagens e híbridos (Paterniani e Campos, 1999).

2.1.3. Importância econômica

Cada parte da planta tem seu valor econômico: sementes, folhas, hastes, panículas e espigas, usadas para produzir inúmeros produtos, sendo que no grão se concentra seu alto valor nutritivo (Dowswell *et al.*, 1996). Como elemento básico na alimentação, o milho apresenta um importante papel nas Américas Central e Sul, no Centro e no Sul do continente Africano, Tailândia, Indonésia e parte da China, podendo ser consumido *in natura* em grãos inteiros ou após processo de industrialização, de moagem úmida ou seca, obtendo produtos secundários, como farelos, farinhas, óleos de cozinha e adoçantes. Várias indústrias de bebidas alcoólicas e de refrigerantes utilizam os produtos obtidos da destilação e da fermentação do milho (Watson, 1988).

O alto valor nutritivo do milho é devido à presença nas sementes de grandes quantidades de carboidratos (principalmente amido que compreende 71,5% da semente), proteínas (10,3% da semente), óleo (4,5% da semente) e vitamina

(Perry, 1988). O óleo de milho possui alto teor de ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido linoléico. Esse quando metabolizado pelo organismo, reduz os níveis de colesterol no sangue, minimizando os riscos da ocorrência de doenças cardiovasculares (Weber, 1987). Além disso, o óleo de milho possui em sua composição antioxidantes naturais, os tocoferóis, que correspondem à vitamina E. Estes antioxidantes dão maior estabilidade aos produtos, aumentando o período de armazenamento e evitando a adição de estabilizantes sintéticos aos mesmos (Lambert, 1994). Entre os produtos alimentícios derivados do milho se encontram margarinas e óleos.

O principal consumo do milho ocorre na alimentação animal, por ser um elemento essencial nas rações balanceadas, absorvendo quase metade do volume total de milho produzido. Portanto, a quantidade de milho demandada está intrinsecamente ligada às cadeias pecuaristas, mais precisamente, a avicultura e a suinocultura. O emprego da ração contendo milho com alto teor de óleo resulta no ganho de peso mais acelerado em aves e suínos (Han *et al.*, 1987; Goss e Kerr, 1992), e também em maior ganho de peso no período pós-parto e na potencialização do efeito do hormônio de crescimento em bovinos (Lambert, 1994). Essas vantagens são decorrentes do fato de o óleo no grão representar uma fonte de energia prontamente aproveitável pelos animais. Em geral, com base no peso, o conteúdo calórico do óleo é aproximadamente 2,25 vezes maior que o do amido ou proteína (Alexander, 1988). Assim, rações contendo milho com alto teor de óleo possuem maior teor energético por unidade de peso, implicando na economia da quantidade de ração fornecida aos animais (Lima, 2000).

2.1.4. Dados econômicos no Brasil e no mundo

O cereal é amplamente cultivado em vários países, distribuídos em cerca de 140 milhões de hectares. Os principais produtores são os Estados Unidos que detêm quase 40% da produção mundial, seguido pela China e Brasil (Tabela 1). O país no qual mais se utiliza o cereal em termo de consumo são os Estados Unidos, ainda

assim, possui um excedente de 15% para exportação, que o torna o maior exportador mundial de milho (MA, 2005).

No Brasil o milho é cultivado em todo o território. Apenas em 2003/2004 seu cultivo foi estimado em 13.000 mil hectares, com uma produção de 42.000 mil toneladas, gerando um valor bruto aproximado de 10.000 milhões de reais (Tabela 2), o que coloca o milho na posição do segundo produto mais cultivado no Brasil. Devido ao clima tropical e subtropical, o Brasil se beneficia, por apresentar duas safras anuais, uma ocorrida no início do ano e outra no meio, esta última chamada de safrinha. O estado do Paraná foi o principal produtor em 2003/2004, perfazendo 26% do total produzido. Destacam-se, em seguida, o estado do Rio Grande do Sul com 17% e, em terceiro lugar, Minas Gerais e Santa Catarina cada qual com 11% da produção total (Conab, 2005).

Apesar da produção do milho ter aumentado no Brasil nos últimos 10 anos, devido às melhorias nas técnicas de produção, juntamente com o melhoramento genético das cultivares (Figura 1), a demanda continua alta (Conab, 2005). Caso a produção não continue crescendo no mesmo ritmo do consumo, nos próximos anos poderá ocorrer à escassez do produto no mercado mundial (Figura 2). Assim, aumenta a necessidade de investimentos no setor por parte do governo, seja com política de proteção interna da cultura, seja no crédito agrícola ou no investimento em ciência e tecnologia.

Tabela 1. Dados dos últimos cinco anos da produção de grãos de milho, em milhões de toneladas, dos cinco maiores produtores no *ranking* mundial.

Ranking de Produção	1° Estados Unidos	2° China	3° Brasil	4° México	5° França
2000	251,85	106,18	31,88	17,56	16,02
2001	241,48	114,25	41,96	20,13	16,41
2002	228,81	121,50	35,93	19,30	16,44
2003	256,90	116,00	47,99	19,65	11,99
2004	299,92	132,16	41,86	20,00	16,39

Fonte: MA, 2006 (<http://www.agricultura.gov.br/>)

Tabela 2. Estimativa dos três principais produtos cultivados no Brasil e os dados de área plantada, produção de grãos e o valor bruto de produção (2003/2004).

Produto	Área plantada (mil hectares)	Produção de grãos (mil toneladas)	Valor bruto de Produção (R\$ milhões)
Arroz	3.654	12.829	7.750,35
Milho (total)	12.783	42.129	11.595,51
Milho (1ª safra)	9.465	31.554	-
Milho (2ª safra)	3.318	10.574	-
Soja	21.376	49.793	32.627,68

Fonte: MA, 2006 (<http://www.agricultura.gov.br/>)

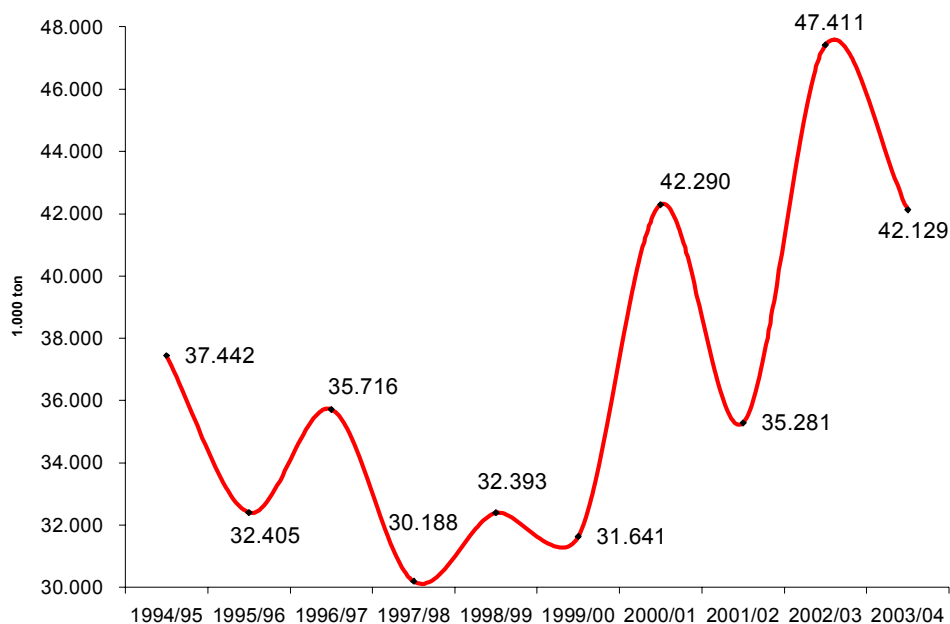


Figura 1. Produção de milho nos últimos dez anos agrícolas em milhares de toneladas.

Fonte: MA, 2006 (<http://www.agricultura.gov.br/>).

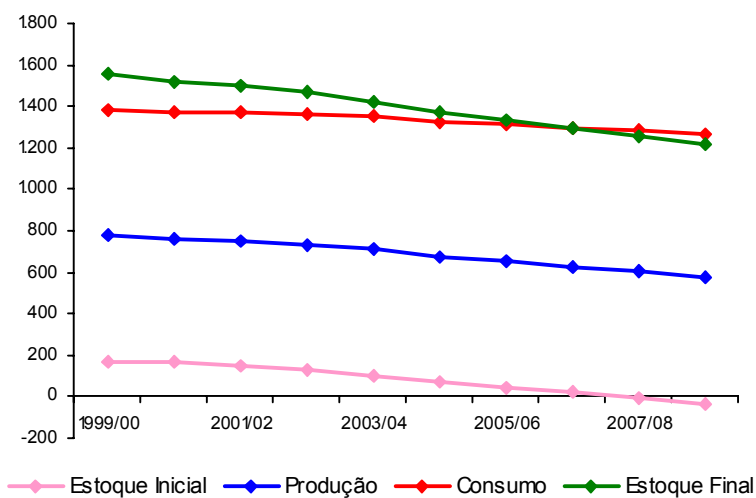


Figura 2. Suprimento mundial de milho em grãos; safra 2005/2006, estimativa; safra 2007/2008, previsão; em milhões de toneladas.

Fonte: USDA, 2006 (www.fas.usda.gov/psd).

2.2. Marcadores moleculares e microssatélites

Uma forma alélica originada de um genoma pode ser utilizada como um marcador genético, sejam os dados provenientes de características morfológicas, de proteínas ou de fragmentos de DNA. Para que isto ocorra, é necessário que haja polimorfismo genético entre os indivíduos, isto é, diferenças entre tais formas alélicas. Os marcadores morfológicos e isoenzimáticos exploram o polimorfismo dos produtos da expressão de um ou mais genes, ou seja, da fração da molécula de DNA que é transcrita e traduzida. O polimorfismo dos marcadores moleculares, por sua vez, é originado de formas alélicas de fragmentos de DNA que podem corresponder a qualquer região da molécula, de seqüência única ou repetida e que codifique ou não um gene. Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção da diversidade genética de seqüências de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares representando todo o genoma do organismo (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Souza, 2001).

O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi o primeiro marcador molecular desenvolvido e o primeiro usado na construção de mapas genéticos da espécie humana (Botstein *et al.*, 1980) e plantas (Edwards *et al.*, 1987). Outros marcadores moleculares baseados na técnica em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona, 1987), têm sido largamente empregados, devido à facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade dessa técnica. Como exemplo o marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma metodologia que utiliza *primers* curtos e de seqüências arbitrárias (Williams *et al.*, 1990). O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é outra técnica que associa a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade da amplificação por PCR, tornando-se uma poderosa ferramenta na caracterização de genomas e no mapeamento genético (Vos *et al.*, 1995).

O seqüenciamento do genoma humano evidenciou um grande número de variações de ponto, encontradas ao se comparar seqüências correspondentes no genoma. Este conhecimento gerou o mais recente tipo de marcador molecular,

conhecido como SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) identificado como pequenas e abundantes variações em todo o código genético. Sua determinação corresponde a posições onde existe uma alternância dos nucleotídeos A, C, G, e T, em uma frequência alélica mínima de 1% numa dada população (Brookes, 1999). As empresas farmacêuticas são as grandes interessadas neste tipo de marcador, pois um dos objetivos é o de conhecer o genoma humano, de modo a associar os SNPs com resposta às drogas (Brookes, 2002).

A classe mais popular de marcador genético é o microssatélite (Litt e Luty, 1989), também chamado de STR (*Short Tandem Repeat*) (Edwards *et al.*, 1991) ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Jacob *et al.*, 1991). Dado a sua aplicabilidade em diferentes áreas, foi intensamente utilizados na última década (Ellegren, 2000). Os microssatélites são definidos como regiões constituídos por 1 a 6 pares de bases nucleotídicas, repetidas em *tandem* (ex. CACACACACACA), e flanqueadas por seqüências únicas conservadas. Termos como mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos são freqüentemente utilizados para demonstrar o tipo de repetição no microssatélite. As regiões contendo estas seqüências repetidas são amplificadas individualmente através da PCR, utilizando um par de *primers* específicos complementares às seqüências únicas que flanqueiam as repetições. O resultado da amplificação revela o polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos no microssatélite. Assim, o polimorfismo é devido principalmente à variação da extensão alélica causada pela diferença no número de unidades repetidas entre alelos (Morgante e Olivieri, 1993).

A importância funcional dos microssatélites ainda é bastante controversa, contudo vários fenômenos biológicos vêm provando sua importância funcional na organização da cromatina, nos processos metabólicos de regulação do DNA (recombinação e replicação) e em atividades de regulação gênica (tradução e transcrição) (Li *et al.*, 2002). Além disso, certas variações de repetições de tri e tetranucleotídeo estão associadas aos fenótipos de câncer e a algumas doenças neurológicas em humanos (Kashi e Soller, 1999; Atkin, 2001).

A origem da hipervariabilidade dos microssatélites está associada a dois mecanismos. O primeiro mecanismo está relacionado ao deslize (*slippage*) da

enzima DNA polimerase. Durante a etapa de replicação, esta enzima pode parar sua atividade, provocando a dissociação das fitas de DNA. Por se tratar de seqüências altamente repetitivas, a homologia entre elas é grande. Assim, quando as fitas voltam a se anelar, nem sempre ocorre o alinhamento correto das repetições. A fita que não se alinhou forma uma alça, que pode levar a adições ou deleções de algumas repetições (Figura 3). O segundo mecanismo relaciona-se com a ocorrência de *crossing-over* desiguais entre fitas de DNA não alinhadas, podendo ocorrer entre cromátides irmãs ou mesmo entre cromossomos diferentes, gerando grandes adições ou deleções de seqüências repetitivas (Figura 4) (Levinson e Gutman, 1987; Jarne e Lagoda, 1996; Sia *et al.*, 1997; Hancock, 1999; Moxon e Wills, 1999).

Cada microssatélite, independente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado diferindo no tamanho representa um alelo diferente do mesmo loco. Cada loco de microssatélite é analisado ao se utilizar o par de *primers* construído especificamente para sua amplificação. Mais do que um loco pode ser analisado de cada vez quando os alelos de cada loco têm tamanhos suficientemente diferentes e migram para zonas separadas no gel. Nestes métodos de genotipagem denominados *multiplex*, mais do que um par de *primers* específicos é utilizado simultaneamente na mesma reação da PCR. (Souza, 2001).

A detecção dos fragmentos de DNA que contêm o microssatélite utiliza um gel de poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução em eletroforese, para uma adequada separação dos fragmentos, os quais diferem por poucos pares de bases, dependendo do número de nucleotídeos do elemento repetido (Senior e Heun, 1993). A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídeo, nitrato de prata ou através de autoradiografia ao se utilizar *primers* marcados por radioisótopos na reação da PCR.

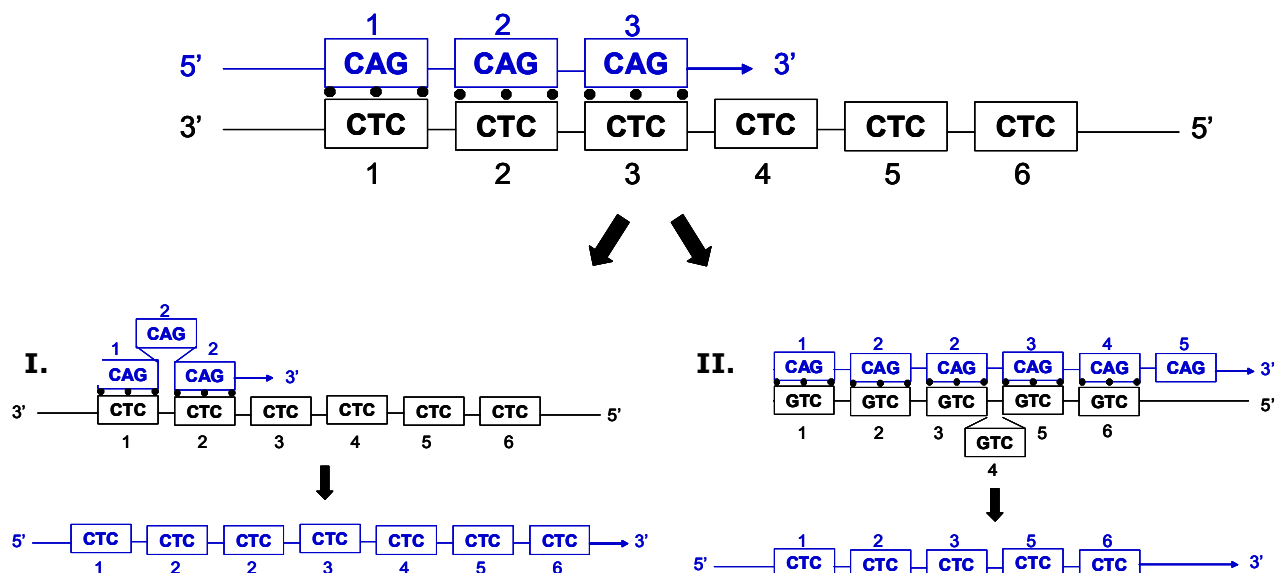


Figura 3. Formação de mudança da matriz de leitura durante a replicação das fitas de DNA. Nesta etapa pode ocorrer um deslize em uma unidade de repetição, podendo ser formada por um ou mais pares de bases nucleotídicas. Ocorre a formação de alças que são estabilizadas pelo pareamento desigual das unidades de repetição nucleotídicas, causando inserções (**I**) ou deleções (**II**) nas fitas de DNA. Os números de 1 a 6 referem-se a unidade de repetição de um trinucleotídeo. As fitas de cor preta representam o DNA molde e as de cor azul representam o DNA recém-sintetizado complementar à fita molde.

Adaptado: ([Levinson e Gutman, 1987](http://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/index.htm))

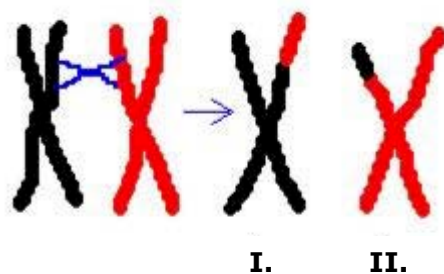


Figura 4. *Crossing-over* desigual entre diferentes cromossomos durante a meiose. Fenômeno que ocorre para explicar as mudanças mais drásticas nas unidades de repetição. A figura representa os cromossomos, após o *crossing-over*, com muitas (**I**) e poucas (**II**) unidades de repetições.

Fonte: <http://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/index.htm>.

(Acesso: Julho 2005)

Outra forma de detecção do polimorfismo em gel de poliacrilamida é a marcação dos produtos amplificados com compostos fluorescentes específicos para cada par de *primer* utilizado. Através de um seqüenciador automático são feitas as análises dos microssatélites, que detecta a fluorescência. Este sistema conduz a uma análise mais eficaz na determinação do tamanho dos fragmentos, facilitando a automação da genotipagem através da aquisição, análise e armazenamento dos dados (Souza, 2001). Contudo, a escolha deste sistema aumenta muito o custo final da pesquisa, não sendo o mais indicado para os projetos de mapeamento genético, realizados em laboratórios de médio porte que necessitam de genotipagens em larga escala de forma rápida e econômica.

Como vantagem tem-se que os microssatélites são abundantes, bem dispersos no genoma de eucariotos, altamente polimórficos, estáveis, co-dominantes e herdáveis de maneira mendeliana (Morgante e Olivieri, 1993). Assim, seu uso como marcadores torna-se ideal para identificação e caracterização de genótipos (Rongwen *et al.*, 1995, Behl *et al.*, 2002), estudos de diversidade genética (Lu e Bernardo, 2001; Ni *et al.*, 2002), de evolução (Schlötterer e Pemberton, 1998; Goldstein e Schlötterer, 1999) e mapeamento genético de genomas (Zhao e Kochert, 1993; Röder *et al.*, 1998; Ferdig e Su, 2000).

Muitas espécies de plantas já possuem um conjunto de microssatélites disponíveis para utilização em estudos genéticos, principalmente para espécies de importância agrônômica, como é o caso da soja (Akkaya *et al.*, 1992), do milho (Senior e Heun, 1993), do trigo (Röde *et al.*, 1995) e do arroz (Wu e Tanksley, 1993). Morgante e Olivieri (1993) demonstraram ampla distribuição dos microssatélites em plantas, sendo as repetições de dinucleotídios (AT)_n as mais freqüentes, seguidas pelas de trinucleotídios (AAG)_n e (AAT)_n. Segundo Condit e Hubbell (1991), as repetições mais comuns em milho são (CT)_n, (AG)_n e (GCT)_n. Sibov *et al.* (2003) relataram que em milho tropical as repetições mais abundantes e mais polimórficas são as dinucleotídicas, enquanto as menos abundantes e menos polimórficas são as tetranucleotídicas.

No caso das espécies que não possuem marcadores microssatélites disponíveis, deve-se iniciar um programa de desenvolvimento dos mesmos, fator

esse limitante em muitos laboratórios, pois além de serem de elevado custo, faz-se necessário um laboratório equipado e de pessoas qualificadas. O princípio básico no desenvolvimento dos microssatélites para uma espécie envolve o conhecimento das seqüências únicas, adjacentes à região contendo os motivos repetidos, possibilitando a designação de um loco específico (Souza, 2001).

Vários métodos podem ser utilizados para a obtenção dos marcadores microssatélites, entre eles há os que se baseiam em clonagem simples (Rassman *et al.*, 1991) e em PCR (Grist *et al.*, 1993; Cifarelli *et al.*, 1995). Contudo a metodologia que utiliza a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas de seqüências microssatélites está sendo utilizada com sucesso devido à rapidez e eficiência na obtenção dos dados (Ostrander *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1996). Esse enriquecimento é efetuado através de uma seleção prévia quanto à presença, nos fragmentos clonados, de repetições em *tandem* (motivos adjacentes). Em etapas posteriores, os clones que possuem as repetições microssatélites são identificados e seqüenciados. A região contendo a seqüência única é utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos a serem empregados para a amplificação destes locos em diferentes genótipos. Este procedimento é feito para a identificação e caracterização dos alelos microssatélites entre diferentes genótipos (Chin *et al.*, 1996; Souza, 2001).

Um grande número de marcadores microssatélites de milho está disponível para o uso pela comunidade científica, devido ao resultado do trabalho conjunto de empresas privadas e entidades públicas no desenvolvimento dos microssatélites (Sharopova *et al.*, 2002). Senior e Heun (1993) foram os pioneiros no uso dos microssatélites em estudos genéticos do milho, utilizaram 6 microssatélites em 8 linhagens de milho. Atualmente, no banco de dados público de milho (*Maize Genetics and Genomics Database* – <http://www.maizegdb.org/>) estão catalogados 2.095 microssatélites (MaizeGDB, Jan 2006), para os quais estão disponíveis as seqüências dos pares de *primes* necessários a sua amplificação, facilitando, assim, as pesquisas de diversidade genética e mapeamento em milho.

2.3. Mapeamento de QTL

2.3.1 Caracteres quantitativos e QTL

Grande parte do esforço efetuado nos programas de melhoramento genético de plantas está concentrado no conhecimento dos caracteres quantitativos. Estima-se que cerca de 98% dos caracteres fenotípicos de importância econômica em plantas cultivadas seja quantitativo (WIPO, 2001). Como exemplo de caracteres quantitativos em milho, tem-se a produção de grãos, resultado do efeito combinado de muitos genes, como os que controlam peso de grãos, número de fileiras de grãos na espiga, fotossíntese, desenvolvimento da raiz, tempo de germinação, entre outros (Hallauer e Miranda, 1988).

O caráter quantitativo em uma população é influenciado por dois principais fatores que alteram a expressão deste caráter. O primeiro é a sua herança poligênica (Mather e Jinks, 1982), isto é, a variação fenotípica é determinada por diversos genes segregando de modo Mendeliano, cada um com pequenos efeitos aproximadamente aditivos sobre um determinado caráter (Kearsey e Poni, 1996). O segundo é o seu caráter multifatorial, as respostas dos caracteres quantitativos são sensíveis aos fatores ambientais, seja devido às mudanças climáticas ou de localização. Apesar dos caracteres quantitativos possuírem particularidades, é difícil definir precisamente um caráter. O melhor que pode ser dito sobre uma característica quantitativa em uma dada população, é que o caráter apresenta uma variação contínua na população, apresentando uma distribuição mais ou menos normal.

Desta forma, não é possível separar um caráter quantitativo em classes distintas, como é feito nos caracteres qualitativos (Fisher, 1918; Faconer e Mackay, 1996). Os genes qualitativos possuem um grande efeito no fenótipo, freqüentemente possuem alelos não funcionais, dos quais resultam fenótipos bem diferentes (Kearsey, 1998). Contudo, diferenças alélicas podem ocorrer na estrutura ou na regulação dos genes, o que altera diretamente a ação dos genes produzindo

pequenos efeitos fenotípicos. Este tipo de variação alélica é a que está envolvida na variação quantitativa (Kearsey e Poni, 1996).

Inicialmente os genes que participavam de caracteres com herança poligênica eram chamados de poligenes (Mather e Jinks, 1982). No trabalho de Geldermann (1975), foi utilizado o termo “QTL” pela primeira vez, que significa locos controladores de caracteres quantitativos. Os locos seriam segmentos de DNA que afetam uma determinada característica quantitativa, podendo ser um único gene ou múltiplos genes.

2.3.2. Marcador e mapeamento genético

Técnicas estatísticas baseadas na estimativa de parâmetros, como médias, variâncias e covariâncias, são bastante utilizadas para descrever as características da distribuição fenotípica contínua, pois permitem a estimação aproximada do número de locos afetando um caráter, a ação gênica média (dominante ou recessiva), o grau de interação dos locos (entre eles e com o ambiente) na determinação do fenótipo. Contudo, utilizando-se apenas as técnicas estatísticas, não é possível conhecer a magnitude dos efeitos, herança, ação gênica de locos específicos afetando um caráter (Tanksley, 1993; Falconer e Makay, 1996).

O trabalho pioneiro de Sax (1923), que estudou o caráter tamanho da semente de feijão (caráter quantitativo) e cor da semente (caráter qualitativo), sugeriu a ligação entre esses caracteres, isto é, que a expressão de um gene simples estaria ligada à expressão de um QTL. Trabalhos seguintes também confirmaram a ligação de genes que controlavam a variação quantitativa utilizando marcadores simples (Smith, 1937; Breese e Mather, 1957; Thompson, 1975).

Após os resultados de Thoday (1961), surgiu a idéia de se utilizar marcadores de genes simples para mapear QTL. Nesta época a aplicação prática da metodologia encontrava certas limitações, pois os estudos eram feitos utilizando marcadores fenotípicos ou citológicos. Estes marcadores eram difíceis de serem obtidos e em número muito limitado, representando apenas uma fração do genoma, não sendo

possível à estimativa precisa na avaliação da variação nas populações (Tanksley, 1993).

Estas limitações foram superadas na década de oitenta devido ao surgimento dos marcadores moleculares, os quais refletem a variabilidade da molécula de DNA, podendo ser utilizados como marcadores em populações naturais. Além disso, propriedades como neutralidade fenotípica, informatividade dos locos, abundância no genoma em qualquer indivíduo, alelos codominantes e facilidade na obtenção dos dados, possibilitou sua generalização nos estudos genéticos e rápido avanço no mapeamento de QTL (Stuber *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1992).

2.3.3. Populações utilizadas no mapeamento

O princípio básico que fundamenta as análises de QTL é a existência do desequilíbrio de ligação entre os alelos do loco marcador e os alelos ligados ao QTL. O desequilíbrio de ligação pode ser definido, como uma associação dos alelos de diferentes locos, em uma população não randômica e pode ser causado por vários fatores, incluindo seleção e deriva genética. Contudo, em gerações segregantes derivadas do cruzamento controlado de linhagens (F_2 , $F_{2:3}$ ou populações de retrocruzamento) a causa do desequilíbrio de ligação é a ligação física dos locos, formando a base para o mapeamento de ligação clássico. O desequilíbrio de ligação devido à ligação física dos locos possui seu valor máximo nas populações de cruzamentos controlados e, como consequência, a obtenção do mapa e detecção de QTL é também maximizada utilizando locos marcadores. Assim, um grande número de delineamentos experimentais e metodologias estatísticas foram desenvolvidos para explorar esta informação. Os principais tipos de delineamentos empregados em mapeamento genético utilizam populações F_2 , $F_{2:3}$, populações obtidas por retrocruzamentos, linhagens puras recombinantes ou linhagens duplo-haplóides (Tanksley, 1993; Lynch e Walsh, 1998).

Populações por retrocruzamentos são obtidas através do cruzamento dos gametas produzidos pelos indivíduos da geração F_1 , com uma das linhagens parentais. Elas são facilmente produzidas a partir de linhagens de diversas espécies,

incluindo espécies alógamas como o milho e autógamas como o trigo. Apesar da obtenção rápida de indivíduos utilizados no mapeamento, este delineamento encontra limitação devido ao pequeno número de indivíduos gerados com relação aos outros delineamentos utilizados. Portanto, caso sejam necessários múltiplos testes em múltiplos locais para se realizar as avaliações de um dado caráter, este tipo de delineamento certamente não é o mais adequado (Coelho, 2000). Um exemplo de delineamento experimental com retrocruzamento é o delineamento III, que utiliza plantas F_2 originadas do cruzamento entre duas linhagens endogâmicas (Comstock e Robinson, 1952). Ao invés de usar plantas F_2 para o retrocruzamento, pode-se utilizar progênies $F_{2:3}$ obtidas pela autofecundação de cada planta F_2 , uma vez que o conjunto de gametas de cada progênie $F_{2:3}$ representa os gametas da planta F_2 correspondente. Esta estratégia aumenta o número de sementes que podem ser obtidas de cada retrocruzamento, visto que a colheita de sementes será feita em várias plantas $F_{2:3}$ ao invés de apenas uma planta F_2 , aumentando também, o número de experimentos que podem ser realizados para as avaliações fenotípicas dos caracteres quantitativos (Silva, 2002).

Linhagens puras recombinantes são produzidas pela autofecundação por cinco ou mais gerações de plantas de uma geração F_2 . Segundo Tanksley (1993) o desequilíbrio de ligação encontrado neste grupo é menor que os encontrados nos outros delineamentos, o que diminui o poder de detecção de ligação entre os locos e o caráter quantitativo. Entretanto, Burr *et al.* (1988) consideraram uma série de vantagens para a sua utilização: (I) a população pode ser considerada permanente e não havendo mais segregação pode ser utilizada indefinidamente no mapeamento; (II) a informação gerada é cumulativa, possibilita a integração de novos dados a um mapa existente; (III) o número de sementes não é mais limitante, possibilitando a obtenção de quantas sementes forem necessárias; (IV) maior possibilidade de recombinação devido às várias gerações de autofecundações a que as linhagens são submetidas, permitindo a identificação de marcadores fortemente ligados aos caracteres fenotípicos (Silva, 2002).

As plantas duplo-haplóides são obtidas pela cultura de anteras de plantas F_1 , onde a colchicina é utilizada visando à duplicação do número de cromossomos de

grãos de pólen. Linhagens duplo-haplóides são consideradas totalmente homozigotas, uma vez que seu genoma é constituído do conjunto haplóide de cromossomos duplicados. A autofecundação de plantas desse tipo dará origem às sementes com genótipos idênticos, isto é, linhagens duplo-haploídes. Nas espécies nas quais este tipo de linhagem pode ser obtido, diversos mapas genéticos tem sido construídos utilizando este delineamento, como cevada, cana-de-açúcar, brássicas, entre outras. (Coelho, 2000; Silva, 2002).

O delineamento genético utilizando indivíduos da geração F_2 , resultante do cruzamento entre duas linhagens homozigotas divergentes é o mais empregado. A principal vantagem em utilizar este delineamento é devido à obtenção de três genótipos de cada loco de marcador, o que permite a estimativa do grau médio de dominância associado ao QTL detectado. A estimativa do grau médio de dominância está diretamente associada a uma escolha eficiente nos métodos de melhoramento a serem adotados na cultura (Hallauer e Miranda, 1988). Young (1994) comentou a condição temporária deste delineamento, apesar do desequilíbrio de ligação apresentar seu ponto máximo. Nessas populações, tanto a genotipagem quanto a avaliação dos caracteres quantitativos são feitas para cada planta em separado, aumentando a variação experimental e diminuindo a precisão da detecção ou do mapeamento de QTL. Essa limitação foi superada por Finsh *et al.* (1996), utilizando-se de delineamentos $F_{2:3}$, onde as plantas F_2 são genotipadas, enquanto o caráter associado ao genótipo individual é estimado pelo valor médio das progênes $F_{2:3}$. Este delineamento ofereceu um aumento no poder de detecção dos QTL com a redução da variância de amostragem. Outro ponto a favor é a manutenção das progênes $F_{2:3}$ através das polinizações controladas entre plantas da mesma progênie, perpetuando a fonte de material vegetal para avaliações experimentais em diversos anos e locais, para coleta de DNA e para utilização dessas progênes no prosseguimento do programa de melhoramento genético daquela espécie (Lynch e Walsh, 1998).

2.3.4. Mapa genético

Mapas de ligação ou genéticos são representações gráficas dos cromossomos de uma espécie, obtidos através de análises estatísticas. Um mapa de ligação é composto por vários grupos de ligação, sendo que o número deles depende da espécie em estudo. Assim, um grupo de ligação contém locos ordenados, podendo estes ser genes (marcadores morfológicos ou isoenzimáticos) ou não (marcadores moleculares), alinhados ao longo de um mesmo cromossomo, indicando as distâncias relativas entre eles. Os mapas genéticos são essenciais para os estudos genéticos: (i) em genética quantitativa eles permitem a localização dos QTL, facilitando a seleção assistida no melhoramento genético; (ii) em biologia molecular mapas genéticos com um grande número de marcadores facilitam a clonagem posicional de genes, fornecendo o esqueleto genético para a construção do mapa físico; (iii) em estudos evolutivos permitem tanto a comparação das estruturas genômicas de diferentes espécies ou populações, quanto à homologia de genes, conservação de distância e ordem de ligação dos cromossomos (Lynch e Walsh, 1998).

Na cultura de milho, o primeiro mapa genético foi publicado por Emerson *et al.* (1935), no qual continha 62 locos baseados em caracteres morfológicos. Helentjaris *et al.* (1986) construíram o primeiro mapa genético do milho, utilizando o marcador molecular do tipo RFLP. O mapa continha 116 locos RFLP, derivados de cDNA e de clones genômicos. Burr *et al.* (1988) desenvolveram um mapa de RFLP baseados em dados de segregação de duas populações de linhagens recombinantes. Contudo, apenas na década de 90 foi possível viabilizar a integração dos mapa de ligação do genoma do milho, utilizando marcadores *core*. Gardiner *et al.* (1993) escolheram marcadores *core* RFLP com base em seu baixo número de cópias no genoma, alto polimorfismo e cobertura equidistante no genoma ($\pm 20\text{cM}$), permitindo a divisão do genoma do milho em uma série de unidades binárias chamadas de *bins*. Um par de marcadores RFLP define um *bin*, cada um é numerado de acordo com o cromossomo ao qual pertence, seguindo um ponto decimal que são as subdivisões seguintes, sendo criado um número seqüencial do marcador *core* do

braço curto mais distante para o próximo marcador *core*. Este sistema de *bin* serve como um esqueleto em um mapa de milho facilitando a compreensão das informações genéticas vinda dele. Deste então, inúmeros mapas de ligação do genoma do milho foram construídos, utilizando diferentes estratégias de mapeamento, sistemas de marcadores genéticos e processos estatísticos-computacionais (Davis *et al.*, 1999). Atualmente, o marcador molecular do tipo microssatélite é o mais utilizado em estudos de mapeamento (Senior e Heum, 1993; Senior *et al.*, 1996; Sharopova *et al.*, 2002), devido as suas inúmeras vantagens com relação aos outros marcadores.

O conceito utilizado na construção de um mapa de ligação entre os genes é o mesmo em todos os casos. As frequências de recombinações (produto da meiose) na amostra são medidas e, por esta medida determina-se o grau de ligação entre os genes em questão. A frequência de recombinação entre dois locos é função da distância entre eles. Quanto maior a distância maior a probabilidade de ocorrência de recombinação entre os locos. Assim, a frequência de recombinação pode ser utilizada como uma medida de distância entre os locos (Liu, 1998).

Nem sempre a frequência de recombinação fornece uma medida precisa da distância no mapa. As frequências de recombinação são estimativas das probabilidades de ocorrência de *crossing-overs* e como tais não possuem a propriedade de serem aditivas. Além disso, o fenômeno de interferência, isto é, a ocorrência de um *crossing-over* afeta a ocorrência de um segundo em regiões adjacentes, tornando menos precisa a utilização da frequência de recombinação para estimar a distância. Correções para os fenômenos citados são feitas utilizando diferentes funções de mapeamento. As duas funções mais utilizadas são as descritas por Haldane (1919) e por Kosambi (1944). A primeira supõe ausência de interferência e a segunda propôs uma função alternativa na qual é considerado uma interferência moderada.

As distâncias estimadas do mapa não possuem uma relação universal com a distância física entre os locos. A quantidade de DNA que corresponde a 1 cM (centimorgan) varia amplamente dependendo da espécie estudada, podendo

corresponder desde 10 até 1.000 Kilobases (Kb). Além disso, a frequência de recombinação está sob controle genético e alguns genes influenciam esta frequência ao longo de todo o genoma, enquanto outros tem ação em regiões específicas do cromossomo. Este fato pode fazer com que a quantidade de DNA para cada cM, até dentro de um mesmo cromossomo e, principalmente, próximo aos telômeros e centrômeros, sofra uma considerável variação (Brooks, 1988). Estima-se que o genoma do milho contenha 1.400 cM de extensão e que seja constituído por 3×10^9 pares de bases (pb). Desta forma, em milho 1 cM equivale a $2,143 \times 10^6$ pb, em média (Lynch e Walsh, 1998).

2.3.5. Métodos de mapeamento

Para um mapeamento eficaz faz-se necessário um método que forneça uma precisa identificação e localização dos QTL individuais no genoma, para uma estimativa dos parâmetros genéticos apropriados. Para que isto aconteça é necessário à utilização de um delineamento experimental adequado, um mapa genético saturado e um modelo ideal na análise do método de mapeamento empregado.

A detecção de QTL utilizando apenas um marcador de cada vez apresenta um princípio simples. O genótipo do loco marcador do indivíduo é determinado, assim como o fenótipo para o caráter quantitativo. Caso ocorram diferenças nas médias fenotípicas entre as classes de genótipos marcadores, faz-se à inferência da existência de QTL ligados aos marcados (Mackay, 2001). O poder estatístico que este método apresenta é baixo, pois apenas permite detectar quais as marcas que têm influência sobre o caráter e não o efeito e localização dos QTL.

Após o surgimento dessa metodologia inicial, outros métodos foram propostos e aprimorados. Contudo, o princípio de mapeamento fundamentado na probabilidade condicional de que o genótipo do QTL é Q_k , dado que o genótipo do marcador observado é M_j , é o mesmo para todas as metodologias de mapeamento que se seguiram. Pela definição de probabilidade condicional tem-se:

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

onde: $\Pr(Q_k M_j)$ é a propriedade conjunta do genótipo do QTL ser Q_k e o genótipo do marcador ser M_j [por exemplo, $\Pr(Q_k M_j) = \Pr(qq/MM)$ é a probabilidade do genótipo qq do QTL ocorrer junto ao marcador MM na população]; $\Pr(M_j)$ é a probabilidade marginal, ou seja 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]. Estas probabilidades $\Pr(Q_k M_j)$ e $\Pr(M_j)$ são funções do mapa de ligação e do delineamento experimental empregado para produzir as populações (Lynch e Walsh, 1998).

Com base nesta probabilidade condicional, o valor do caráter para os vários genótipos marcadores pode ser calculado. Supondo que existam n genótipos QTL, onde a média do Q -ésimo genótipo do QTL é μ_{Q_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 é representado por μ_{Q_k} e a posição do QTL é representada através da probabilidade condicional $\Pr(Q_k/M_j)$. Esta equação é geral e pode ser utilizada com vários genótipos marcadores e vários QTL.

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

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

onde: a hipótese alternativa (H_a) refere-se à presença de um QTL ligado ao marcador e a hipótese de nulidade (H_0) refere-se à ausência de ligação de um QTL a esse marcador, com a pressuposição de que a distribuição dos fenótipos é normal.

O teste de significância também pode ser feito através do LOD score (*likelihood of odds score*). A diferença entre o LOD score e a estatística LR é a base do logaritmo usado no teste. O teste LR utiliza logaritmos naturais e o LOD score utiliza logaritmos 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, um LOD score igual a 3 indica que a hipótese alternativa é 10^3 vezes mais provável de ocorrer do que a hipótese nula (Lynch e Walsh, 1998).

Com base nestas idéias Lander e Botstein (1989) propuseram o mapeamento por intervalo (IM), utilizando as informações de segregação de pares de marcadores adjacentes flaqueadores, sendo estimadas as frequências de recombinação e as magnitudes dos efeitos do QTL. Com a inovação deste tipo de mapeamento foi possível a separação da localização do QTL e do seu efeito, o que aumentou a precisão do mapeamento (Liu, 1998). Este método foi utilizado no desenvolvimento do programa de mapeamento MAPMAKER-QTL (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1992). No mapeamento por intervalo, as análises são realizadas em um intervalo de cada vez, isolando o efeito do QTL no intervalo, dos efeitos dos demais QTL do genoma. Este isolamento não permite determinar se os efeitos significativos dos intervalos adjacentes são devidos a um único QTL, comum a tais intervalos, ou a vários QTL ligados, um em cada intervalo. Além disso, como o isolamento não permite que sejam considerados os efeitos significativos de outros QTL, as estimativas da posição e do efeito do QTL no intervalo podem ser imprecisas, diminuindo o poder de detecção do método (Lynch e Walsh, 1998).

Zeng (1994), procurando aprimorar o método por intervalo, propôs o mapeamento por intervalo composto (CIM). Nesta metodologia, além dos pares de marcadores adjacente, são selecionadas e adicionadas ao modelo marcas como cofatores, o que permite controlar os efeitos de outros QTL sobre aquele QTL investigado no intervalo. A inclusão das marcas com efeitos significativos sobre o QTL do intervalo analisado diminui o resíduo do modelo, aumentando sensivelmente o poder de detecção do QTL, além de melhorar a precisão das estimativas do efeito e da posição do QTL. Os cofatores empregados na análise são selecionados através

de regressão múltipla, a qual permite selecionar as marcas com efeitos significativos sobre o QTL do intervalo analisado, que estejam associadas a QTL ligados ou não.

A utilização de marcas significativas como cofatores resolveu o problema da detecção de falsos QTL e isto contribuiu para o uso deste método nos estudos de QTL. Assim, diversos programas foram desenvolvidos baseado neste método. Alguns exemplos são os programas MapQTL (Van Ooijen, 1996), MQTL (Tinker e Mather, 1995), PLABQTL (Utz e Melchinger, 1996), QGENE (Nelson, 1997) e QTLCartographer (Basten *et al.*, 1999).

Jiang e Zeng (1995) estenderam a idéia do CIM para o mapeamento de QTL associados aos vários caracteres, denominado mapeamento de caracteres múltiplos (mCIM). O mesmo modelo pode ser utilizado nos caracteres correlacionados ao caráter analisado, nas correlações entre determinado caráter e também na análise de um caráter em diversos ambientes. A incorporação dos caracteres correlacionados ao modelo aumenta o poder de detecção e de precisão das estimativas dos QTL, pois considera as informações de diversos caracteres em conjunto. A escolha desta abordagem possibilita a investigação da natureza da correlação genética entre os caracteres (QTL com efeitos pleiotrópicos ou a ligação entre eles) além de permitir a análise da interação QTL x ambiente (Bearzoti, 2000). O modelo estatístico é definido como:

$$y_{jk} = b_{0k} + b_k^* x_j^* + d_k^* z_j^* + \sum_l^t (b_{lk} x_{jl} + d_{lk} z_{jl}) + e_{jk}$$

onde:

y_{jk} = valor fenotípico do caráter no ambiente k do j -ésimo indivíduo ($k=1,...,5$; $j=1,...,256$);

b_{0k} = efeito médio do modelo para k ambiente;

b_k^* = efeito aditivo do QTL no ambiente k ;

x_j^* = variável indicadora para o j -ésimo indivíduo, que assume valores em função do genótipo dos QTL, inferidos indiretamente a partir dos marcadores flanqueadores i e $i + 1$;

d_k^* = efeito dominante do QTL no ambiente k ;

z_j^* = variável indicadora de heterozigosidade do QTL com valores 1 e 0 para heterozigoto e homozigoto, com probabilidade dependente do genótipos marcadores flaqueadores i e $i + 1$.

x_{jl} e z_{jl} = variável correspondente para o marcador l , assumindo que t marcadores são selecionados utilizando a regressão *stepwise* para controlar a variação genética residual (cofatores);

b_{lk} e d_{lk} = são os coeficientes de regressão parcial de y_{jk} em x_{jl} e z_{jl} ;

e_{jk} = resíduo do modelo.

O método de mapeamento mais recente, foi o proposto por Kao *et al.* (1999), chamado de mapeamento por intervalo múltiplo (MIM). Durante as análises vários intervalos são considerados simultaneamente e não apenas um único intervalo como ocorre nos outros métodos, além disso, o parâmetro de epistasia foi incorporado ao modelo da análise, aumentando o poder de detecção dos QTL. Contudo, estudos de simulação em larga escala para avaliar a repetição e robustez do método na identificação do modelo genético utilizado ainda não estão disponíveis na literatura, dificultando assim a aplicabilidade dessa metodologia (Zeng *et al.*, 1999).

2.4. QTL em milho

2.4.1. Milho temperado

As duas últimas décadas foram promissoras para o mapeamento de QTL em milho, devido aos inúmeros trabalhos publicados, possibilitando informações detalhadas sobre o número de genes, ação gênica, heterose e interações QTL X ambiente. Os trabalhos de mapeamento de QTL em milho temperado utilizam basicamente material genético resultante de dois sintéticos desenvolvidos em programas de melhoramento de milho norte-americanos, referidos como *Iowa Stiff Stalk Synthetic* (BSSS) e *Lancaster*. A maioria dos híbridos simples plantados comercialmente foi produzida pelo cruzamento de linhagens vindas destes dois grupos. Como exemplos, no primeiro grupo temos as linhagens B73, B37 e A632, e no segundo grupo as linhagens Mo17, Oh43 e Va35 (Stuber, 1995).

O primeiro trabalho de mapeamento de QTL em milho foi realizado por Edwards *et al.* (1987), em duas populações F_2 , empregando marcadores isoenzimáticos e morfológicos com análise de mapeamento de marcas simples. Os resultados detectaram, em média, 14 marcadores significativamente associados aos QTL em 25 caracteres agronômicos (entre eles produção de grãos). A ação gênica variou para ambas as populações entre caracteres e entre locos, embora sobredominância apareça especialmente mais freqüente para os caracteres ligados à produção de grãos.

Utilizando as mesmas populações de mapeamento e os mesmos marcadores (isoenzimáticos e morfológicos), Stuber *et al.* (1987) detectaram QTL associados à produção de grãos em 24 caracteres relacionados. Os autores comentaram sobre o grande número encontrado de associações significativas de certos locos marcadores com os caracteres. Uma re-avaliação de uma das duas populações F_2 estudadas acima (Co159 X Tx303), foi realizada utilizando marcadores isoenzimáticos e RFLP. Os resultados mostraram um aumento no número de QTL detectados de 17 para 114, fornecendo uma localização mais precisa dos mesmos (Edwards *et al.*, 1992). Estes trabalhos iniciais de mapeamento de QTL mostraram a existência de

associações entre os locos dos marcadores moleculares com os locos dos caracteres ligados não apenas à produção de grãos, como também aos componentes de produção. Além disso, estes trabalhos indicaram a distribuição dos QTL ao longo do genoma.

Stubber *et al.* (1992) foram os primeiros a explorar dois fenômenos importantes na genética do milho: a heterose e a interação genótipo X ambiente. Os autores utilizaram as linhagens parentais B73 e Mo17, e dois métodos de mapeamento de QTL, por marcas simples e por intervalo, com 76 marcadores moleculares (isoenzimáticos e RFLP). Os resultados mostraram-se semelhantes, na utilização dos dois métodos e sugerem que a maioria dos QTL estava associada a sobredominância, podendo estar atuando de forma significativa no fenômeno de heterose. Contudo, os autores comentam que a ação gênica poderia ser na verdade uma pseudo-dominância, isto é, locos próximos aos alelos dominantes ou parcialmente dominantes, que apresentam vantagens nos efeitos quando os locos ligados estão em fase de repulsão. Apesar do estudo ter sido realizado em cinco ambientes diferentes, ocorreu uma pequena evidência da interação QTL X ambiente.

Estudos posteriores empregaram mapas genéticos saturados, utilizando apenas marcadores moleculares (RFLP e microssatélites), populações derivadas de outras linhagens parentais, e análises de mapeamento mais precisas, como o mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1994). Muitas das populações estudadas no mapeamento de QTL associados ao caráter produção de grãos e seus componentes, em milho temperado, foram geradas a partir das mesmas linhagens parentais: Mo17 e H99. Os estudos posteriores, obtidos destas populações, confirmaram de certa forma os resultados dos trabalhos citados acima, seja utilizando populações F_2 (Ajmone-Marsan *et al.*, 1995), progênies $F_{2:3}$ (Veldboom e Lee, 1994; Ajmone-Marsan *et al.*, 1996), estudos em ambientes diversos (Veldboom e Lee, 1996a,b), linhagens recombinantes (Austin e Lee, 1996), progênies $F_{6:7}$ (Austin e Lee, 1998) ou estudos envolvendo populações geradas a partir de outras linhagens parentais (Ajmone-Marsan *et al.*, 1995; Frova *et al.*, 1999).

Vários estudos foram realizados no intuito de explicar os fenômenos como a interação QTL X ambiente, consistências dos QTL através de vários ambientes, QTL

associados aos caracteres múltiplos, entre outros. Veldboom e Lee (1996a,b) não observaram interação QTL X ambiente em seus estudos. Eles formularam várias hipóteses para explicar esta ausência de interação, tais como: o tipo de teste utilizado para detectar a interação, a amostragem da população mapeada e também a biologia do caráter em estudo.

Austin e Lee (1996) discutiram QTL associados aos caracteres múltiplos. Os autores detectaram um QTL que influencia os caracteres altura de planta, altura de espiga e tamanho do pendão, confirmando a alta relação existente entre eles. Uma explicação genética seria devida, ou a QTL com efeitos pleiotrópicos, ou a presença de QTL ligados controlando os diferentes caracteres. Quanto à estabilidade dos QTL mapeados em mais de um ambiente Ajmone-Marsan *et al.* (1995) relataram que o mapeamento foi realizado com as médias das progênies, assim detectando apenas locos com grandes efeitos (Frova *et al.*, 1999).

Outros trabalhos foram realizados com o intuito de investigar QTL associados à morfologia, como altura de plantas, altura de espigas (Berke e Rocheford, 1995; Veldboom e Lee, 1996b; Barrière *et al.*, 2001; Cardinal *et al.*, 2001; Flint-Garcia *et al.*, 2003), resistência às doenças (Pè *et al.*, 1993; Landi *et al.*, 2002), resistência aos insetos (Grohn *et al.*, 1998), tolerância à seca (Frova *et al.*, 1999), comprimento do colmo com consequência no acamamento de plantas (Flint-Garcia *et al.*, 2003), entre outros.

2.4.2. Milho tropical

Os trabalhos que exploram o germoplasma de linhagens de clima temperado são oriundos de grupos heteróticos bem definidos, como mencionados anteriormente, assim apresentam base genética estreita em contraste com o germoplasma de linhagens de clima tropical. Populações utilizadas nos programas de melhoramento de milho tropical são derivadas de diferentes populações, apresentando uma ampla base genética e maior variabilidade do que o material de clima temperado (Lanza *et al.*, 1997; Laborda, 2003). Desta forma, poucos trabalhos foram realizados, no estudo de mapeamento de QTL em milho de clima

tropical, quando comparados ao número encontrado para os de milho de clima temperado.

Um dos primeiros estudos de mapeamento de QTL, utilizando linhagens adaptadas ao clima tropical, foi realizado por Ribault *et al.* (1997). Os autores avaliaram as famílias $F_{2:3}$ geradas a partir do cruzamento de duas linhagens S_5 (Ac7643 e Ac77729/TZSRW) do germoplasma Tuxpeño. A população de mapeamento foi cultivada em ambientes submetidos aos diversos regimes hídricos para os caracteres de florescimento, esterilidade masculina, florescimento feminino e intervalo entre os florescimentos masculino e feminino. O mapa foi construído utilizando-se 142 marcadores moleculares do tipo RFLP e os QTL foram detectados empregando o método de mapeamento por intervalo. Neste estudo foram observados vários QTL com localizações comuns para diversos caracteres, como havia sido sugerido por outros autores, os quais observaram que poucos QTL apresentaram consistência nos diversos regimes hídricos (Abler *et al.*, 1991; Paterson *et al.*, 1991).

O trabalho posterior do mesmo grupo, utilizando a mesma população, avaliou outros caracteres: produção de grãos, número de sementes, número de espigas e número de grãos por fileira. Para a avaliar a interação QTL x ambiente foi utilizado o método de mapeamento por intervalo composto para caracteres múltiplos. O número de QTL mapeados variou de um a sete, nos três regimes hídricos, para cada caráter, com menor número de QTL no ambiente sob estresse severo. Além disso, não ocorreu consistência dos QTL nos ambientes sob os três regimes hídricos.

Mangolin *et al.* (2004) mapearam QTL associados ao teor de óleo em sementes $F_{2:3}$ utilizando o método de mapeamento por intervalo composto (Zeng *et al.*, 1994). Foram mapeados 13 QTL, distribuídos em oito cromossomos, responsáveis por 51,16% da variância fenotípica. A principal contribuição para o caráter foi proveniente dos QTL mapeados nos cromossomos 1 e 5. Predominaram QTL cujas ações gênicas foram aditivas e de dominância parcial. Seis QTL mapeados foram coincidentes com QTL citados na literatura, sugerindo QTL comuns com os mapeados para material de clima temperado.

Sibov *et al.* (2003) mapearam QTL associados à produção de grãos, altura de plantas, altura de espigas e teor de umidade nas progênies $F_{2:3}$, utilizando o mesmo método de mapeamento do trabalho citado anteriormente. Os autores mapearam quatro QTL para produção de grãos, quatro para altura de plantas e cinco para altura de espiga. Os QTL mapeados encontram-se distribuídos pelos cromossomos 1, 2, 7, 8 e 9. A porcentagem de variação fenotípica variou de 3% a 11%. Considerando os QTL em conjunto, eles foram responsáveis por aproximadamente 33%, 25% e 21% da variação fenotípica para os caracteres produção de grãos, altura de planta e altura de espiga, respectivamente. Os tipos de ações gênicas mais freqüentes encontradas foram dominância parcial e sobredominância. Alguns QTL para altura da planta e de espiga foram mapeados próximos aos QTL para produção de grãos, sugerindo ligação ou efeitos pleiotrópicos nessas regiões.

2.4.3. QTL x ambiente

Os caracteres quantitativos comentados anteriormente, são bastantes influenciados pelo ambiente e tendem a mostrar uma grande variação na interação genótipo x ambiente (G X E). A interação G X E ocorre quando dois genótipos da mesma progênie apresentam comportamento diferencial em ambientes distintos (Falconer e Mackay, 1996). Em ambientes tropicais e subtropicais a interação QTL X E é mais intensa, pois as culturas são afetadas por fortes variações climáticas como fotoperíodo, temperatura e pluviométrico (Muchow *et al.*, 1990).

O estudo inicial que analisou a interação QTL X E foi realizado por Paterson *et al.* (1991), em um cruzamento interespecífico de tomate (*Lycopersicon* spp.), sendo detectados QTL em um dos dois ambientes estudados, sugerindo que análises em ambientes únicos poderiam subestimar o número de QTL detectados. O trabalho de Veldboom e Lee (1996 a,b) mostrou que 50% dos QTL para caracteres morfológicos e de produção de grãos foram estáveis nos ambientes de estresse e não estresse. Ribaut *et al.* (1997) confirmaram esta estabilidade no

número e localização dos QTL para os caracteres associados à produção do milho tropical, detectados em três ambientes com diferentes regimes de água. Li *et al.* (2003) atribuem a pouca estabilidade dos QTL a significativa interação QTL X E, além de QTL principais com efeitos opostos e a pronunciada epistasia encontrada.

O que se observa é que os resultados sobre a estabilidade dos QTL mapeados são contraditórios entre material tropical e material temperado, uma vez que vários trabalhos realizados em regiões temperadas encontraram QTL relativamente estáveis em diversos ambientes, tanto para os caracteres morfológicos, quanto para os de produção em milho (Beavis *et al.* 1991; Stuber *et al.* 1992; Schön *et al.*, 1994; Ajmone-Marsan *et al.*, 1995, 1996; Lübberstedt *et al.*, 1997a,b). Stuber *et al.*, (1992) mapearam seis e oito QTL associados à produção de grãos, em duas famílias de milho utilizando setenta e seis marcadores moleculares, sendo de forma geral os QTL estáveis nos seis ambientes. Ajmone-Marsan *et al.* (1995) mapearam QTL associados à produção de grãos utilizando um mapa genético com oitenta e sete marcadores moleculares, em famílias $F_{2:3}$ cruzadas com duas linhagens testadoras e avaliados em dois locais, encontrando dois e três QTL respectivamente. Nos trabalhos acima citados, a estimativa da interação QTL X E foi feita comparando-se QTL mapeados nos diversos ambientes de forma independente.

Jiang e Zeng (1995) desenvolveram uma metodologia de mapeamento para diversos ambientes, chamada método de mapeamento por intervalo composto para ambientes múltiplos (mCIM), no qual incorpora informações de diversos ambientes separadamente. A vantagem deste método é o aumento do poder de mapeamento e de precisão das estimativas dos QTL permitindo a análise da interação QTL x E. Desta forma, é possível efetuar uma avaliação mais precisa da interação QTL x E. Alguns trabalhos foram realizados utilizando esta metodologia em germoplasma de milho adaptado ao clima tropical, como o desenvolvido por Jiang *et al.* (1997) e Bohn *et al.* (1997). No primeiro trabalho os autores mapearam de cinco a oito QTL, referentes a treze caracteres relacionados à adaptação em alta e baixa altitude, utilizando oitenta e seis marcadores

moleculares. Observa-se interação QTL x E para todos os caracteres. No segundo trabalho os autores utilizaram noventa e três marcadores moleculares do tipo RFLP no mapeamento de dez QTL associados ao caráter resistência, da lagarta (*Diatraea saccharalis*) da folha em milho. Destes QTL mapeados um apresentou interação QTL x E. Os autores comentam sobre uma aplicação promissora deste resultado em seleção assistida para o aumento da resistência à doença.

3. Referências Bibliográficas

- ABLER, B.S.B.; EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W. Isoenzymatic identification of quantitative trait loci in crosses of elite maize inbreds. **Crop Science**, v.31, p.267-274, 1991.
- AJMONE-MARSAN, P.; MONFREDINI, G.; BRANDOLINI, A.; MELCHINGER, A.E.; GARAY, G.; MOTTO, M. Identification of QTL for grain yield in an elite hybrid of maize: repeatability of map position and effects in independent samples derived from the same population. **Maydica**, v.41, p.49-57, 1996.
- AJMONE-MARSAN, P.; MONFREDINI, G.; LUDWING, W.F.; MELCHINGER, A.E.; FRANCESCHINI, P.; PAGNOTTO, G.; MOTTO, M. In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation of grain yield. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.415-424, 1995.
- AKKAYA, M.S.; BRAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139, 1992.
- ALEXANDER, D.E. Breeding special nutritional and industrial types. In: SPRAGUE, G.F. e DUDLEY, J.W. (eds.). **Corn and corn improvement**. 3rd ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1988, p.869-880.
- ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. John Wiley, New York, 1960. 485p.
- ARAÚJO, P.M.; PATERNIANI, E. Aspectos Gerais de Plantas Alógamas. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (ed.) **Melhoramento Genético de Plantas**. UEL, Londrina, 1999, p.299-310.
- ATKIN, N.B. Microsatellite instability. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.92, p.177-181, 2001.
- AUSTIN, D.F.; LEE, M. Comparative mapping in F_{2:3} and F_{6:7} generation of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.817-826, 1996.
- AUSTIN, D.F.; LEE, M. Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. **Crop Science**, v.38, p.1296-1308, 1998.
- BARRIÈRE, Y.; GIBELIN, C.; ARGILLIER, O.; MÉCHIN, V. Genetic analysis in recombinant inbred lines of early dent forage maize. I – QTL mapping for yield, earliness, starch and

crude protein contents form per se value and top cross experiments. *Maydica*, v. 46, p.253-266, 2001.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z.B. **QTL Cartographer, version 1.13**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, 1999, 176p.

BEADDLE, G.W. Teosinte and the origin of maize. In: WALDEN, D. B. (ed.). **Maize Breeding and Genetics**. John Wiley and Sons, New York, 1978, p.113-141.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B. (ed.) **Análise de QTL no melhoramento de plantas: segunda jornada em Genética e melhoramento de plantas**. FUNAPE, Goiânia, 2000, p.63-209.

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.A. Linkage map based on information from four F₂ populations of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.636-644, 1991.

BEHL, R.; KAUL, R.; SHEORAN, N.; BEHL, J.; TANTIA, M.S.; VIJH, R.K. Genetic identity of two Indian pig types using microsatellite markers. **Animal Genetics**, v.33, p.158-159, 2002.

BERKE, T.G.; ROCHEFORD, T.R. Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height, and kernel traits in maize. **Crop Science**, v.35, p.1542, 1995.

BERKE, T.G.; ROCHEFORD, T.R. Quantitative trait loci for tassel traits in maize. **Crop Science**, v.39, p.1439-1443, 1999.

BOHN, M., KHAIRALLAH, M.M., JIANG, C., GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D., HOISINGTON, D.A., UTZ, H.F., DEUTSH, J.A., JEWELL, D.C., MIHM, J.A. e MELCHINGER, A. E. QTL mapping in tropical Maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. **Crop Science**, v.37, p.1892-1902, 1997.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BOUCHEZ, A.; HOSPITAL, F.; CAUSSE, M.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Marker-Assisted Introgression of Favorable Alleles at Quantitative Trait Loci Between Maize Elite Lines. **Genetics**, v.162, p.1945-1959, 2002.

BREESE, E.L.; MATHER, K. The organization of polygenic activity within a chromosome in *Drosophila*. I. Hair characters. **Heredity**, v.11, p.373-95, 1957.

- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, v.234, p.177-186, 1999.
- BROOKES, A.J. 4th International meeting on Single Nucleotide Polymorphism and complex genome analysis various uses for DNA variations. **European Journal of Human Genetics**, v.10, p.153-155, 2002.
- BROOKS, L.D. The evolution of recombination rates. In: Michod, R.E.; Levin, B.R. (eds.) **The evolution of sex**. Sinauer Association, Sunderland, 1988, p.87-105.
- BURR, B.; BURR, F.A.; THOMPSON, K.H.; ALBERTSEN, M.C.; STUBER, C.W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, v.118, p.519-526, 1988.
- CARDINAL, A.J.; LEE, M.; SHAROPOVA, N.; WOODMAN-CLIKMAN, W.L.; LONG, M.J. Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci for resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. **Crop Science**, v.41, p.835-845, 2001.
- CHIN, E.C.L., SENIOR, M.L., SHU, H.; SMITH, J.S.C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allelic variation. **Genome**, v.39, p.866-873, 1996.
- CIFARELLI, R.A.; GALLITELLI, M.; CELLINI, F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.3802 – 1803, 1995.
- COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre análise de QTL. In: PINHEIRO, J.B. (ed.) **Análise de QTL no melhoramento de plantas: segunda jornada em Genética e melhoramento de plantas**. FUNAPE, Goiânia, 2000, p.1-20.
- COMSTOCK, R.E.; ROBINSON, H.F. Estimation of average dominance genes. In: Gowen, J.W. (ed.) **Heterosis**. Iowa State College Press, Inc., Ames, 1952, p.494-516.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br>>. Acesso: maio 2005.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two-base repeats in plant genomes. **Genome**, v.34, p.66-71, 1991.

- 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.; 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.
- DOWSWELL, C.R.; PALIWAL, R.L.; CANTRELL, R.P. **Maize in the third world**. Westview Press, Boulder, 1996, 247p.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetics mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v.49, p.746-756, 1991.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.
- EDWARDS, M.D.; HELENTJARIS, T.; WRIGHT, S.; STUBER, C.W. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isoenzymes and restriction fragment length polymorphism markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.765-774, 1992.
- ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline. **Trends in Genetics**, v.16, p.551-558, 2000.
- EMERSON, R.A.; BEADLE, G.W.; FRASER, A.C. **A summary of linkage studies in maize**. Cornell University Agricultural Experimental Station Memoir, Cornell, 1935. p.1-83.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Addison Wesley Longman, New York, 1996, 464p.
- FERDIG, M.T.; SU, X-Z. Microsatellite markers and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**, v.16, p.307-312, 2000.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. EMBRAPA-GENARGEM, Brasília, 1996, 220p.
- FINSH, R.D.; RAGOT, M.; GAY, G. A generalization of the mixture model in the mapping of quantitative trait loci for progeny from a biparental cross of inbred lines. **Genetics**, v.143, p.571-577, 1996.

- FISCHER, K.S.; PALMER, A.F.E. Potential productivity of field crops under different environments. In: SMITH, W.H.; BANTA, S.J. (eds.) **Maize**. IRRI, Los Baños, Philippines, 1983, p.155-1180.
- FISHER, R.A. The correlations between relatives on the supposition of mendelian inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v.2, p.399-433, 1918.
- FLINT-GARCIA, S.A.; JAMPATONG, C.; DARRAH, L.L.; McMULLEN, M.D. Quantitative trait locus analysis of stalk strength in four maize populations. **Crop Science**, v.43, p.13-22, 2003.
- FROVA, C.; KRAJEWSKI, P.; di FONZO, N.; VILLA, M.; SARI-GORLA, M. Genetics analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.280-288, 1999.
- GARDINER, J.; COE, E.H.; MELIA-HANCOCK, S.; HOISINGTON, D.A.; CHAO, S. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F₂ population. **Genetics**, v.134, p.917-930, 1993.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v.46, p.319-330, 1975.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellite: evolution and applications**. (eds). Oxford University Press, Oxford, 1999, 352p.
- GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. História e origem do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. (ed.) **Melhoramento e produção do milho**. Fundação Cargill, Campinas, 1987, p.41-78.
- GOSS, J.; KERR, P.S. Challenges e opportunities for identity preserved varieties. In: **Proc 47th Annual Corn e Sorghum Research Conference American Seed Trade Association**. American Seed Trade Association, Washington, 1992, p.1-31.
- GRAHAM, G.I.; WOLFF, D.W.; STUBER, C.W. Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five of maize by fine mapping. **Crop Science**. V.37, p.1601-610, 1997.
- GRIST, S.A.; FIRGAIRA, F.A.; MORLEY, A.A. Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, v.15, p.304-309, 1993.

- GROHN, S.; GONZÁLEZ-DE-LÉON, D.; KHAIRALLAH, M.M.; JIANG, C.; BERGVINSON, M.; BOHN, M.; HOISINGTON, D.; MELCHINGER, A.E. QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two RIL populations. **Crop Science**, v.38, p.1062-1072, 1998.
- HALDANE, J.B.S. The recombination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linkage factors. **Journal of Genetics**, v.8, p.299-309, 1919.
- HALLAUER, A. R.; MIRANDA, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. (2nd ed.) Iowa State University Press, Ames, 1988, 468p.
- HAN, Y.; PARSONS, C.M.; ALEXANDER, D.E. The nutritive value of high-oil corn for poultry. **Journal Poultry Science**, v.66, p. 103-111, 1987.
- HANCOCK, J.M. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHÖTTERER, C. (eds.) **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, Inc., New York, 1999, p.1-9.
- HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v.72, p.761-769, 1986.
- [HTTP://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/index.htm](http://www.woodrow.org/teachers/esi/2002/Biology/Projects/p3/index.htm). Acesso: julho 2005.
- JACOB, H. J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S. E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R. K.; MAO, YI-PEI; GANTEN, D.; DZAU, V. J.; LANDER, E. S. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. **Cell**, v.67, p.213-224, 1991.
- JANSEN, R.C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v.136, p.1447-1455, 1994.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Evolution and Ecology**, v. 11, p. 424-429, 1996.
- JIANG, C.; EDMANDES, G.O.; ARMSTEAD, I.; LAFITTE, H.R.; HAYWARD, M.D.; HOISINGTON, D. Genetic analysis of adaptation differences between highland and lowland tropical maize using molecular markers. **Theoretical and applied genetics**, v.99, p.1106-1119, 1997.

- JIANG, C.J.; ZENG, Z.-B. Multiple-trait analysis of genetic-mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.140, p.1111-1127, 1995.
- KAO, C.-H.; ZENG, Z.-B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.152, p.1203- 1216, 1999.
- KASHI, Y.; SOLLER, M. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHÖLLÖTTERER, C. (eds.). **Microsatellite: evolution and applications**. Oxford University Press, Inc., New York, 1999, p.10-23.
- KEARSEY, M.J. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). **Journal of Experimental Botany**, v.327, p.1619-1623, 1998.
- KEARSEY, M.J.; PONI, H.S. **The genetical analysis of quantitative traits**. Chapman and Hall, London, 1996, 140p.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenics**, v.12, p.172-175, 1944.
- LABORDA, P.R. **Diversidade genética de milho tropical: Estudo com base em marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). UNICAMP, Campinas. 2003, 103p.
- LAMBERT, R.J. High-oil corn hybrids. In: HALLAUER, A.R. (ed.). **Specialty corns**. CRC Press, Boca Raton, 1994, p.123-145.
- LANDER, E.S.; 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.; 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.
- LANDI, P.; SANGUINETI, M.C.; DARRAH, L.L.; GIULIANI, M.M.; SALVI, S.; CONTI, S.; TUBEROSA, R. Detection of QTL for vertical root pulling resistance in maize and overlaps with QTL for root traits in hydroponics and for grain yield at different water regimes. **Maydica**, v.47, p.233-243, 2002.

- LANZA, L.L.B.; SOUZA JR., C.L.; OTTOBONI, L.M.M.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.1023-1030, 1997.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology Evolution**, v.4, p.203-221, 1987.
- LI, Y.C.; KORAL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.
- LI, Z.K.; YU, S.B.; LAFITTE, H.R.; HUANG, N.; COURTOIS, B.; HITTALMANI, S.; VIJAYAKUMAR, C.H.M.; LIU, G.F.; WANG, G.C.; SHASHIDHAR, H.E.; ZHUANG, J.Y.; ZHENG, K.L.; SINGH, V.P.; SIDHU, J.S.; SRIVANTANEYAKUL, S.; KHUSH, G.S. QTL x environment interactions in rice. I. Heading date and plant height. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.141-153, 2003.
- LIMA, G.J.M.M. Competitividade da avicultura e suinocultura depende da qualidade nutricional do milho. 2000.<<http://www.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/0/bd92a6dca860eec28325690400471c25?>>. Acesso: novembro 2003.
- LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. **Constructing genetics maps with MAPMAKER/Exp 3.0**. 3rd ed. Whitehead Institute for Biometrical Research, Cambridge, 1992, 230p.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- LIU, B.H. **Statistical Genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. CRC Press, New York, 1998, 611p.
- LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.613-617, 2001.
- LÜBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E.; SCHÖN, H.F.; UTZ, H.F.; KLEIN, D. QTL mapping in testcrosses of European flint lines of maize: I. Comparison of different testers for forage yield traits. **Crop Science**, v.37, p.921-931, 1997a.

- LÜBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E.; KLEIN, D.; ZEGENHARDT, H.; PAUL, C. QTL mapping in testcrosses of European flint lines of maize. II. Comparison of different testers for forage quality traits. **Crop Science**, v.37, p.1913-1922, 1997b.
- LUNVEN, P. **Le tryptophane dans l'alimentation intertropicale**. Ph.D. Thesis. University of Paris, Paris, 1968, 102p.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer Associates, Sunderland, 1998, 980p.
- MA. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_MUNDIAL/10%5B1%5D.8.C.XLS>. Acesso: Janeiro 2006.
- MACKAY, T.F.C. Quantitative trait loci in *Drosophila*. **Nature Review Genetics**, v.2, p.11-20, 2001.
- MAIZEGDB. **Maize genetics and genomics database**. <<http://www.maizegdb.org/>>. Acesso: janeiro 2006.
- MANGELSDORF, P.C. **Corn. Its origin, evolution and improvement**. Harvard University Press, Cambridge, 1974.
- MANGOLIN, C.A.; SOUZA JR., C.L.; GARCIA, A.A.F.; GARCIA, A.F.; SIBOV, S.T.; SOUZA, A.P. Mapping QTL for kernel oil content in a tropical maize population. **Euphytica**, v.137, p.251-259, 2004.
- MATHER, K.; JINKS, J.L. **Biometrical Genetics**. 3rd ed. Chapman and Hall, New York, 1982, 382p.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.
- MOXON, R.E.; WILLS, C. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? **Scientific American**, p. 72-77, 1999.
- MUCHOW, R.C.; SINCLAIR, T.R.; BENNETT, J.M. Temperature and solar effect of high on grain-growth in field-grown maize. **Field Crops Research**, v.23, p.145-158, 1990.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.56, p.335-350, 1987.

- NELSON, J.C. QGene: software for marker-based genomic analysis and breeding. **Molecular Breeding**, v.3, p.239-245, 1997.
- NI, J.; COLOWIT, P.M.; MACKILL, D.J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. **Crop Science**, v.42, p.601-607, 2002.
- OSTRANDER, E.A.; JONG, P.M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.89, p.3419-3423, 1992.
- PATERNIANI, E. Maize breeding in the tropics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.9, p.125-154, 1990.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do Milho. In: BORÉN, A. (ed.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. UFV, Viçosa, 1999, p.429-485.
- PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELS, M. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v.46, p.39-90, 1991.
- PÈ, M.E.; GIANFRANCESCHI, L.; TARAMINO, G.; TARCHINI, R.; ANGELINI, P.; DANI, M.; BINILLI, G. Mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize. **Molecular Gene Genetics**, v.241, p.11-16, 1993.
- PERRY, T.W. Corn as a livestock feed. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (eds.) **Corn and corn improvement**. 3rd ed., American Society of Agronomy, Madison, 1988, p.941-963.
- RASSMAN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Electrophoresis**, v.12, p.113-118, 1991.
- RIBAUT, J-M.; HOISINGTON, D.A.; DEUTSCH, J.A.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE-LÉON, D. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize. 1. flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.905-914, 1996.
- RIBAUT, J-M.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE-LÉON, D. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.887-896, 1997.

- RÖDE, M.S.; PLASKE, J.; KÖNING, S.U.; BÖLNER, A.; SORRELS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.K. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellite in wheat. **Molecular and General Genetics**, v.246, p.327-333, 1995.
- RÖDER, M.S.; KORZUM, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M.; LEROY, P.; GANAL, M.W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, v.149, p.2007-2023, 1998.
- RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical Applied Genetics**, v.90, p.43-48, 1995.
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v.8, p.552-556, 1923.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Genetics Reviews**, v. 5, p.63-69, 2004.
- SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellite for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DeSALLE, R.; SCHIERWATER, B. (eds.) **Molecular approaches to ecology and evolution**. Birkhäuser Verlag, Basel, 1998, p.71-86.
- SCHÖN, C.C.; MELCHINGER, A.E.; BOPPENMAIER, J.; BRUNKLAUS-JUNG, E.; HERRMAN, R.G.; SEITZER, J.F. RFLP mapping in maize: quantitative trait loci affecting performance of elite European flint lines. **Crop Science**, v.34, p.378-389, 1994.
- SENIOR, M.L.; HEUN, M. Mapping maize microsatellite and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeat using a CT primer. **Genome**, v.36, p.884-889, 1993.
- SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the Genbank database: Map construction. **Crop Science**, v.36, p.1676-1683, 1996.
- SHAROPOVA, N.; McMULLEN, M.D.; SCHULTZ, L.; SCHROEDER, S.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; GARDINER, J.; BERGSTROM, D.; HOUCHINS, K.; MELIA-HANCOCK, S.; MUSKET, T.; DURU, N.; POLACCO, M.; EDWARDS, K.; RUFF, T.; REGISTER, J.C.; BROUWER, C.; THOMPSON, R.; VELASCO, R.; CHIN, E.; LEE, M.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; LONG, M.J.; LISCUM, E.; Cone, K.; DAVIS, G.; COE, E.H. Development and mapping of SSR markers for maize. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.463-481, 2002.
- SHULL, G. H. A pure-line method in corn breeding. **American Breeders Association**, v.5, p.51-59, 1909.

- SHULL, G.H. Hybridization methods in corn breeding. **American Breeders Magazine**, v.1, p.98-107, 1910.
- SIA, E.A.; JINKS-ROBERTSON, S.; PETES, T.D. Genetic control of microsatellite instability. **Mutation Research**, v.383, p.61-70, 1997.
- SIBOV, T.S.; SOUZA JR., C.L.; GARCIA, A.A.F.; GARCIA, A.F.; SILVA, A.R.; MANGOLIN, C.A.; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. **Hereditas**, v.139, p.96-106, 2003.
- SILVA, A.R. **Análise genética de caracteres quantitativos em milho com o delineamento III e marcadores moleculares**. Tese (Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002, 143p.
- SMITH, H.H. The relation between genes affecting size and color in certain species of *Nicotiana*. **Genetics**, v.22, p.361-1937, 1937.
- SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (ed.) **Recursos Genéticos & Melhoramento**. Fundação MT, Rondonópolis, 2001, p.939-966.
- SOUZA JR., C.L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (ed.) **Recursos Genéticos & Melhoramento**. Fundação MT, Rondonópolis, 2001, p.11-42.
- STUBER, C.W. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. **Trends in Genetics**, v.11, p.477-481, 1995.
- STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. **Crop Science**, v.27, p.639-648, 1987.
- STUBER, C.W.; LINCOLN, S.E.; WOLFF, D.W.; HELENTJARIS, T.; LANDER, E.S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid form two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, v.132, p.823-839, 1992.
- TAKAHASHI, H.; NIRASAWA, K.; FURUKAWA, T. An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequences. **Japanese Poultry Science**, v. 33, p.292-299, 1996.

- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.
- TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, v.39, p.277-287, 1996.
- THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature**, v.191, p.368-370, 1961.
- THOMPSON, J.N.Jr. Quantitative variation and gene number. **Nature**, v.258, p.665—68, 1975.
- TINKER, N.A., MATHER, D.E. Methods for QTL analysis with progeny replicated in multiple environments. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v.2, 1995.
- USDA, United States Department of Agriculture. <<http://www.fas.usda.gov/psd>>. Acesso: Janeiro 2006.
- UTZ, H.F.; MELCHINGER, A.E. PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v.1, 1996.
- VAN OOIJEN, J.W.; MALIEPAARD, C. **MapQTL™, version 3.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps**. Centre for Plant Breeding and Reproduction Research-DLO, Wageningen, 1996.
- VELDBOOM, L.R.; LEE, M. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. II. Determination of QTL for grain yield and yield components. **Theoretical and Applied of Genetics**, v.89, p.415-458, 1994.
- VELDBOOM, L.R.; LEE, M. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: I. Grain yield and yield components. **Crop Science**, v.36, p.1310-1319, 1996a.
- VELDBOOM, L.R.; LEE M. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: II. Plant height and flowering. **Crop Science**, v.36, p.1320-1327, 1996b.
- VIANA, J.M.S.; SILVEIRA, M.G.; PACHECO, C.A.P.; CRUZ, C.D.; CARVALHO, C.R. Hibridação em milho. In: BORÉM, A. (ed.) **Hibridação artificial de plantas**. UFV, Viçosa, 1999, p.401-426.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; Lee, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

- WATSON, S. Corn marketing, processing, and utilization. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (eds.) **Corn and corn improvement**. 3rd ed., American Society of Agronomy, Madison, 1988, p.885-940.
- WEBER, E.J. Lipids of the kernel. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (eds.). **Corn: Chemistry and technology**. American Association of Cereal Chemists, Saint Paul, 1987, p.311-350.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WIPO. World Intellectual Property Organization International Bureau. In: KOROL, A.B.; RONIN, I.; EBRITVIN, E.; MINKOV, D. (eds.) **System and method for mapping of multiple trait complexes in multiple environments**. Annual Reports, New York, 2001, 50p.
- WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular & General Genetics**, v.241, p.225-235, 1993.
- YOUNG, N.D. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. (eds.) **DNA: based markers in plants**. Kluwer Academic, Dordrecht, 1994, p.39-57.
- ZENG, Z.-B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1466, 1994.
- ZENG, Z.-B.; KAO, C.-H.; BASTEN, C. J. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **Genetical Research**, v.74, p.279-289, 1999.
- ZHAO, X.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, v.21, p.607-614, 1993.

4. Capítulos

Capítulo 1.**MAPA GENÉTICO SATURADO EM UMA POPULAÇÃO F_2 DE MILHO TROPICAL
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Manuscrito a ser enviado para publicação na revista: *Genetics and Molecular Biology*

TÍTULO: MAPA GENÉTICO SATURADO EM UMA POPULAÇÃO F₂ DE MILHO TROPICAL UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

AUTORES: Milena de Luna Alves Lima¹, Cláudio Lopes de Souza Jr.², Anete Pereira de Souza^{1*}.

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6010, 13.083-970, Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 83, 13.400-970-Piracicaba, SP, Brasil.

* Autor para correspondência (e-mail: anete@unicamp.br; fax:+55 19 3788-1132).

MAPA GENÉTICO SATURADO EM UMA POPULAÇÃO F₂ DE MILHO TROPICAL UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Milena de Luna Alves Lima¹, Cláudio Lopes de Souza Jr.², Anete Pereira de Souza^{1*}.

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6010, 13.083-970, Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 83, 13.400-970-Piracicaba, SP, Brasil.

* Autor para correspondência (e-mail: anete@unicamp.br; fax: +55 19 3788-1132).

Palavras-chave: milho tropical, mapa genético, *Zea mays* L., microssatélites.

Abstract

Mapas genéticos saturados são utilizados para um eficiente mapeamento de caracteres de interesse agrônômico (QTL) e nos programas de seleção assistida. Este trabalho gerou um mapa genético saturado utilizando 139 marcadores moleculares do tipo microssatélites em uma população F₂ gerada de duas linhagens de milho tropical (L-02-03D e L-20-01F) contrastantes para diversos caracteres de importância econômica/agrônômica. O mapa obtido teve uma extensão total de 1.858,61 cM com intervalo médio entre os marcadores de 13,47 cM. Setenta e sete por cento dos bins do mapa genético de milho foram cobertos, com um acréscimo de 14% de cobertura em relação aos mapas de milho publicados. Os resultados deste trabalho mostram uma primeira etapa que possibilitará desenvolver estudos da arquitetura genética em milho tropical para a identificação e mapeamento de QTL e a estimativa de seus efeitos sobre a variação de um caráter quantitativo, permitindo assim a sua manipulação e utilização em programas de melhoramento do milho.

Introdução

Um mapa genético saturado utilizando marcadores informativos é uma importante etapa para um eficiente mapeamento de QTL, o qual tem como objetivo mapear genes associados a algum caráter em estudo. Assim, a precisão no mapeamento de QTL está relacionada à ocorrência de uma forte ligação entre o marcador e o caráter, para um potencial uso em programas de seleção assistida utilizando marcadores moleculares e programas de introgressão de QTL (Dekkers e Hospital 2002). Estudos de simulação mostram que para isso acontecer deve-se utilizar populações em desequilíbrio de ligação, com um grande número de indivíduos e marcadores informativos que apresentem uma extensão de no máximo 5 cM entre um marcador e o QTL (Moreau *et al.* 1998).

Vários mapas genéticos saturados utilizando marcadores moleculares foram construídos nos últimos anos para espécies de plantas de interesse econômico (Cai *et al.* 1994, Davis *et al.* 1999, Röder *et al.* 1998, Paterson *et al.* 2000, Roose *et al.* 2000, Sharopova *et al.* 2002, Scalfi *et al.* 2004). Estes mapas auxiliam na compreensão da base genética da espécie em estudo, facilitando a manipulação de genes alvos, estudos de evolução e de mapeamento de locos associados aos caracteres quantitativos (QTL) (Marksem *et al.* 2001, Servin e Hospital 2002).

O marcador molecular RFLP (Botstein *et al.* 1980) foi bastante utilizado na construção de mapas genéticos em milho temperado para fins de mapeamento de QTL utilizando populações F₂, BC₁, duplo haplóides (DH) e linhagens recombinantes (RIL) (Edwards *et al.* 1992, Ajmone-Marsan *et al.* 1995, Austin e Lee 1996a,b, Veldboom e Lee, 1996a,b). Apesar da comprovada eficiência no seu uso, a metodologia RFLP é dispendiosa em tempo e dinheiro, além de muitas

vezes não fornecer uma equilibrada cobertura do genoma, o que é um importante pré-requisito para um eficiente mapeamento de QTL.

O desenvolvimento de marcadores moleculares baseados na PCR (Mullis e Fallona 1987) facilitou os estudos de mapeamento devido à rápida e fácil obtenção dos dados, o que permitiu a automação da metodologia em laboratório. Nesta classe de marcadores destacam-se os microssatélites (Litti e Luty 1989) ou SSRs (Simple Sequence Repeats) (Tautz *et al.* 1986), definidos como regiões curtas repetidas em *tandem*, com 1 a 6 nucleotídios de comprimento. Como vantagens no uso deste marcador tem-se que são locos específicos, multialélicos e altamente polimórficos. Além disso, os microssatélites apresentam herança codominante, como os RFLPs, e são bem distribuídos no genoma de eucariotos (Morgante e Olivieri 1993, Ellegren 2000, Schlötterer 2004).

Poucos mapas genéticos foram construídos em populações de milho tropical utilizando microssatélites. Recentemente, Sibov *et al.* (2003) construíram um mapa genético utilizando uma população F₂ obtida do cruzamento das linhagens parentais L-08-05F e L-14-4B, usando 117 microssatélites na obtenção de um mapa com extensão de 1.634,00cM e intervalo médio 14,00cM entre os marcadores adjacentes. Mangolin *et al.* (2004) em estudo de mapeamento de QTL para conteúdo de óleo, analisado em uma população F₂ de milho tropical obtida do cruzamento das linhagens parentais L-02-03D e L-20-01F, construíram um mapa genético com 75 microssatélites, obtendo um mapa com extensão de 1.438,60cM e intervalo médio entre os marcadores microssatélites de 19,18cM.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi saturar o mapa genético e determinar o nível de polimorfismo dos marcadores microssatélites em uma população F₂ proveniente de duas linhagens de milho tropical contrastantes para diversos caracteres de importância econômica.

Este mapa genético saturado fornecerá melhor compreensão da base genética do material, para futuros estudos de mapeamento de QTL que poderão ser empregados nos programas de melhoramento do milho tropical.

Material e Métodos

Material Vegetal

As linhagens parentais (L-20-01F e L-02-03D) foram geradas de populações pertencentes ao germoplasma de milho tropical, IG-1 (sementes alaranjadas lisas) e IG-2 (sementes amarelas denteadas), respectivamente. Tanto as populações, quanto às linhagens pertencem a grupos heteróticos distintos, contrastantes para vários caracteres de interesse econômico. Ambas foram produzidas pelo Programa de Melhoramento de Milho do Departamento de Genética/ESALQ – Universidade de São Paulo. As linhagens parentais foram cruzadas e a identidade genética de três plantas F_1 em contraste com os parentais foi acessada utilizando os marcadores microssatélites. As plantas F_1 foram autofecundadas para produzir as 256 plantas da população F_2 utilizada no mapeamento.

Análise dos microssatélites

Folhas jovens das linhagens parentais, das plantas F_1 e F_2 , foram coletadas, liofilizadas e moídas. O material foi armazenado individualmente a -20°C e devidamente etiquetado. O DNA foi extraído segundo o protocolo utilizando CTAB descrito por Hoisington *et al.* (1994). As condições de amplificação dos marcadores microssatélites seguiram o processo descrito por Sibov *et al.* (2003), adotando dois programas de amplificação o *Touchdown PCR* (Don *et al.*, 1991) e o que utiliza uma temperatura de anelamento (TA) específica, calculado pela fórmula de Marmur e Doty (1962). Para visualização dos microssatélites, as amostras foram submetidas à

eletroforese em gel de agarose de alta resolução (agarose/MetaPhor 1:1 a 4%), a 170V por 1:30h utilizando tampão TBE 1X, coradas em brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 20 min. Para documentação e análise do gel utilizou-se o equipamento GeneGenius (Syngene Ltda.). Para uma melhor distinção dos alelos na população segregante, dez microssatélites, que apresentavam alelos de tamanhos semelhantes, foram submetidos à eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% e corados em solução de prata segundo Creste *et al.* (2001).

Mapa genético

Duzentos e cinquenta e seis plantas F₂ foram genotipadas utilizando 139 microssatélites e cada loco microssatélite foi verificado quanto a ocorrência de desvios dos alelos das proporções mendelianas esperadas (1:2:1) pelo teste do χ^2 (P<0,05 e P<0,01). Devido à análise de múltiplos testes uma apropriada taxa do erro do tipo I foi determinada pela correção de Bonferroni (Rince 1989). O mapa genético saturado foi construído com base na análise de ligação utilizando o programa MAPMAKER/EXP versão 3.0b (Lincoln *et al.* 1993). Durante a formação dos grupos de ligação, também foram consideradas as informações prévias das localizações dos microssatélites nos cromossomos de milho, as quais estão disponíveis no banco de dados *MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>). Os grupos de ligação foram obtidos através do comando *group*, que se baseia na análise de dois pontos. Nesse procedimento, foram utilizados os seguintes critérios: a distância máxima entre os marcadores adjacentes de 50 cM, isto é, frequência máxima de recombinação de 0.38; e valor mínimo do LOD igual a 3.0. A função de mapeamento de Kosambi (1944) foi utilizada para converter as frequências de recombinação em mapa genético. Na ordenação das marcas de cada grupo de ligação foram selecionados subconjuntos de 10 marcas mais distantes entre si, utilizado o comando *compare*, que compara as

verossimilhanças de todas as ordens possíveis. Uma vez escolhida a ordem mais provável deste subconjunto, foram inseridas as marcas restantes através do comando *try*. A consistência das ordens foi verificada através do comando *ripple* determinada pela análise de multiponto. Durante a formação dos grupos de ligação, microssatélites com distâncias maiores do que 50cM ($r=0,38$) foram agrupados utilizando informações prévias de sua localização nos cromossomos de milho, no qual estão disponíveis no banco de dados *MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

Seleção dos *primers* microssatélites

Foram escolhidos 392 microssatélites para a construção do mapa genético que teve como base a sua disponibilidade para o preenchimento dos locos que não foram cobertos pelo mapa de Mangolin *et al.* (2004). Destes, 72 foram selecionados, sendo que oito foram posteriormente descartados devido aos problemas ocorridos durante a genotipagem da população de mapeamento, ou durante a saturação do mapa genético. Assim, 64 microssatélites foram utilizados com base no polimorfismo alélico existente entre os parentais e o F_1 para a saturação do mapa genético. A designação dos locos utilizados está indicada na Figura 1. Outras informações, como a localização cromossômica, as seqüências dos *primers*, a descrição do motivo microssatélite, o tamanho do produto de PCR amplificado podem ser encontrados no *MaizeGDB*.

Resultados e Discussão

Polimorfismo da população de milho tropical

Dos 392 microssatélites testados com relação ao polimorfismo alélico existente entre as linhagens parentais e a população segregante, 72 (18%) foram polimórficos, 255 (65%) não foram

polimórficos e 65 (17%) restantes não foi obtido amplificação, mesmo com a otimização da temperatura de anelamento (TA) (Figura 2). O grau de polimorfismo é variável, dependendo da espécie da planta estudada (Wu e Tanksley 1993). Contudo, Sibov *et al.* (2003) em estudos com milho tropical e Chin *et al.* (1996) com milho temperado obtiveram um nível de polimorfismo similar ao encontrado neste trabalho. Os microssatélites que não amplificaram (17%) sugerem que deva ter ocorrido problemas de amplificação no anelamento dos *primers* com as seqüências flanqueadoras do genoma das linhagens utilizadas. Esta falha no anelamento pode ser devido às diferenças na seqüência de bases nos locos avaliados, entre o germoplasma do milho temperado, a partir do qual os *primers* foram desenhados, e o germoplasma tropical em estudo.

Dos 72 microssatélites polimórficos que apresentaram produto de amplificação, 62 % (44) deles geraram ótimos resultados na amplificação utilizando o programa de amplificação com TA específica. Para obtenção de resultados de amplificação similares nos microssatélites restantes, foi utilizado o programa *Touchdown PCR*. Os resultados obtidos corroboram os de Sibov *et al.* (2003), os quais mostraram a eficiência no uso dos dois programas na amplificação das seqüências microssatélites, a serem utilizadas em estudos de mapeamento em milho tropical.

Quarenta e quatro (62%) dos 72 microssatélites polimórficos avaliados apresentaram repetições do tipo dinucleotídeo, 12 (16%) microssatélites por tri e 6 (8%) por tetranucleotídeo (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Sibov *et al.* (2003) em milho tropical e Wang *et al.* (1994) em milho temperado. Chin *et al.* (1996) analisando microssatélites derivados de genes conhecidos, cDNAs e ESTs de milho temperado, mostraram os trinucleotídeos (44,5%) como as repetições mais freqüentes, seguidos de tetra (27%) e di (15,5%). Os mesmos autores comentam que quando microssatélites derivados de regiões não gênicas forem analisados, a ocorrência e a característica do tipo de motivo pode diferir.

O tipo de motivo dinucleotídeo mais freqüente encontrado foi o (AG)_n, assim corroborando com os dados encontrados por Grupta *et al.* (1996) em plantas. Levinson e Gutman (1987) comentam que as diferenças entre tipos de repetições, em parte, devem-se a diferentes padrões de metilação na espécie.

Os microssatélites com motivos dinucleotídeos apresentaram a melhor resolução quanto à separação dos alelos, contudo a nitidez foi menor na visualização dos alelos em gel de agarose de alta resolução. Taramino e Tingey (1996) observaram que em milho, a melhor resolução e facilidade de separação, utilizando gel de agarose, seria nos microssatélites do tipo tri e tetranucleotídeos, mesmo com uma única unidade de repetição de diferença entre os alelos. Neste trabalho dez microssatélites tiveram que ser analisados em gel de poliacrilamida a 6% devido à impossibilidade de separar os alelos em géis de agarose de alta resolução.

Alelos nulos, caracterizados pela não observação do alelo de uma das linhagens parentais na geração F₁, foram observados em 4% das plantas F₂. Estes locos não foram utilizados para a saturação do mapa genético. Taramino e Tingey (1996) comentam que alelos nulos podem ser o resultados do polimorfismo ocorrendo em um dos sítios do *primer* da seqüência nucleotídea.

Mapa genético

O mapa genético saturado foi construído com 139 marcadores microssatélites, 64 marcadores selecionados durante este trabalho e 75 obtidos do mapa construído por Mangolin *et al.* (2004) (Figura 1). Com o objetivo de permitir o mapeamento integrado, o genoma do milho foi dividido em 100 partes ou *bins*. Cada *bin* é definido por um par de marcadores RFLP, com aproximadamente 20cM cada (Gardiner *et al.* 1993). Assim, podemos dizer que 79% dos *bins*

foram cobertos, tendo um acréscimo de 14% de cobertura em relação ao mapa genético do milho publicado utilizando a mesma população sob mapeamento.

Desvio de segregação não foi observado neste trabalho. Uma exceção ocorreu com o microssatélite umc1516 (2.08) que foi rejeitada ao nível de significância a 5%, mas não a 1% e assim utilizada no mapa genético. Coe *et al.* (1995) relataram que não é raro encontrar locos com desvios da segregação esperada, quando vários marcadores estão sendo analisados, podendo ser esse resultado devido a artefato de amostragem. Muitos trabalhos de mapeamento de milho tem mostrado desvios significativos de segregação genotípica (Senior *et al.* 1996, Mano *et al.* 2005). Gardiner *et al.* (1993) mostraram que, em estudos de mapeamento com duas populações derivadas de um mesmo cruzamento parental do milho, algumas regiões apresentaram distorção de segregação em uma população, mas não na outra.

O mapa genético apresentou uma extensão total de 1.858,61 cM com intervalo médio de 13,47 cM entre marcadores. Dez grupos de ligação foram gerados, sendo equivalentes aos 10 cromossomos do milho. O grupo de ligação que apresentou a menor extensão foi o cromossomo 10 com 103,6 cM o de maior extensão foi o do cromossomo 1 com 303,4 cM. A distância entre marcadores mapeados variou de 0,59 cM (cromossomo 1) a 103,78 cM (cromossomo 4). O número de marcadores para cada grupo de ligação variou de 7 no cromossomo 7 a 22 no cromossomo 1. O número médio de marcadores por cromossomo foi de 13,90 com distância média de 13,47 cM entre marcadores. Três microssatélites não se ligaram (umc1177, bnlg1370 e phi116), sendo incorporados utilizando informações prévias sobre sua localização no genoma do milho (Tabela 1).

A extensão do mapa genético do milho tropical obtido neste trabalho foi maior quando comparada com mapas publicados. Analisando cada cromossomo individualmente as extensões

também foram maiores. Contudo o mapa apresentado é o de menor intervalo médio entre os marcadores (13,47 cM), comparando com os valores 19,18 cM e 14,00 cM encontrados por Mangolin *et al.* (2004) e Sibov *et al.* (2003), respectivamente. O mais importante parâmetro em um mapa genético é o intervalo médio entre os marcadores, pois fornece o grau de saturação do mapa, o que é importante em programas de seleção assistida e no mapeamento de QTL. Assim, foi possível a saturação do mapa genético na população F₂ de milho tropical utilizada neste trabalho.

A posição dos marcadores microssatélites observada no mapa genético concordou com o apresentado nos mapas publicados para germoplasma tropical (Mangolin *et al.* 2004 e Sibov *et al.* 2003). Algumas alterações nas posições das marcas foram observadas para os cromossomos 2, 3, 4, 5 e 9, quando comparadas com suas localizações por *bins* nos respectivos trabalhos. No cromossomo 2 ocorreram pequenas inversões: (i) o marcador bnlgl1017 (2.02) se posicionou antes dos marcadores umc1165 e umc1227 (ambos na posição 2.01) e (ii) entre os marcadores umc1946 e bnlgl1045 (ambos na posição 2.07) houve o posicionamento de um bloco de marcadores do *bin* 2.08 (bnlg1329, phi127, bnlgl1662 e bnlgl1721). No cromossomo 3 ocorreu uma inversão entre os marcadores bnlgl1523 (3.03) e bnlgl1647 (3.02). No cromossomo 4 ocorreu uma inversão na posição dos marcadores bnlgl252 (4.06), nc005 (4.05), umc1088 (4.05) e o marcador umc1550 (4.03). No cromossomo 5 ocorreu uma inversão entre os marcadores bnlgl105 e bnlgl1879 (ambos na posição 5.02) e o marcador bnlgl1660 (5.03). No cromossomo 9 houve inversão entre os marcadores do *bin* 9.01 (phi068 e umc1040) com os do *bin* 9.00 (bnlg1272). Todas as inversões no mapa genético podem ser consideradas pequenas e dentro do esperado, pois variaram em relação a apenas um ou dois *bins*. Gardiner *et al.* (1993) comentam a ocorrência

comum de pequenas inversões quando os marcadores estão muito próximos, sendo separados por poucos centimorgans.

Algumas regiões apresentaram valores de distância genética acima de 50cM entre os marcadores, como é o caso das regiões teloméricas dos cromossomos 1, 4 e 7. No mapa genético de Mangolin *et al.* (2004) essas grandes distâncias foram encontradas nas regiões teloméricas dos cromossomos 2, 4 e 10. No mapa as regiões dos cromossomos 2 e 10, foram saturadas, diminuindo a distância entre as marcas, contudo não foi possível saturar a região telomérica do cromossomo 4. Uma explicação seria o aumento da taxa de recombinação observada em regiões telomérica, o que gera grandes distâncias genéticas, apesar de muitas vezes a região física considerada ser pequena (Davis *et al.* 1999).

Mapas genéticos saturados são facilitadores no mapeamento de caracteres de interesse agrônomo (QTL) e nos programas de seleção assistida, contribuindo para a compreensão dos processos evolucionários e para os programas de melhoramento, sendo essenciais na clonagem posicional dos genes e na construção de mapas físicos.

Este trabalho gerou um mapa genético saturado de milho tropical, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélite, fornecendo assim mais informações sobre o genoma desta espécie. Um mapa genético completo, com todos os *bins* cobertos, ainda precisa ser construído. Para atingir este objetivo uma estratégia seria o desenvolvimento e utilização de microssatélites específicos ao genoma de milho do germoplasma tropical. Esta alternativa, contudo, apresenta elevado custo.

Apesar do fato de que as seqüências atualmente disponíveis no MaizeGDB serem desenvolvidas originalmente do germoplasma de milho temperado, elas são eficientes na construção do mapa genético utilizando populações de milho tropical. Isto gera a expectativa de

que o mapa completo seja finalizado com o uso dos microssatélites disponíveis no banco de dados, com enfoque mais específico nas regiões ainda não saturadas. Além disso, a cada ano é depositada uma grande quantidade de novas seqüências. Aliado a isso, diferentes marcadores moleculares também podem ser utilizados na saturação dos mapas genéticos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma primeira etapa que possibilitará desenvolver estudos da arquitetura genética em milho tropical para a identificação e mapeamento de QTL e a estimativa de seus efeitos sobre a variação de um caráter quantitativo, permitindo assim a sua manipulação e utilização em programas de melhoramento do milho.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 99/12143-1 e 01/05702-6) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-2003/302653). A.P. Souza e C.L.Souza Jr. recebem auxílio à pesquisa do CNPq.

Referências

- Ajmone-Marsan P, Monfredini G, Ludwing WF, Melchinger AE, Franceschini P, Pagnotto G and Motto M (1995) In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation of grain yield. *Theor Appl Genet* 90: 415-424.
- Austin DF and Lee M (1996a) Genetic resolution and verification of quantitative trait loci for flowering and plant height with recombinant inbred lines of maize. *Genome* 39:957-968.
- Austin DF and Lee M (1996b) Comparative mapping in F_{2:3} and F_{6:7} generation of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. *Theor Appl Genet* 92:817-826.

- Botstein D, White RL, Skolnick ME and Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J of Hum Genet* 32:314-331.
- Cai Q, Guy CL and Moore GA (1994) Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive loci. *Theor Appl Genet* 89:606-614.
- Chin ECL, Sênior ML, Shu H and Smith JSC (1996) Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39:866-873.
- Coe EH, Davis GL, McMullen MD, Musket T and Polacco M (1995) Gene list and working maps. *Maize Genet Coop Newslett* 69:191-192.
- Creste S, Tulman-Neto A and Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Biol Rep* 19:299-306.
- Davis GL, McMullen MD, Baysdorfer C, Musket T, Grant D, Staebell M, Xu G, Polacco M, Koster L, Houchins K, Chao S and Coe EHJr (1999) A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points, and 932ESTs in a 1736-locus map. *Genetics* 152:1137–1172.
- Dekkers JCM and Hospital F (2002) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Genet* 3:22-32.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K and Mattick JS (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res* 19:4008-4008.
- Edwards MD, Helentjaris T and Wright S (1992) Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. *Theor Appl Genet* 83: 765–774.

- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline. *Trends Genet* 16:551-558.
- Gardiner J, Coe, EH, Melia-Hancock S, Hoisington DA and Chao S (1993) Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F₂ population. *Genetics* 134:917-930.
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC and Ramesh B (1996) Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Sc* 70:45-54.
- Hoisington D, Khairallah MM and González-De-Léon D (1994) *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. 2nd ed., Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eug* 12:172-175.
- Levinson G and Gutman G, (1987) A slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4:203-221.
- Lincoln SE, Daly MJ and Lander ES (1993) *Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0b*. Whitehead Institute for Biomedical. Research Technical Report, 3th edition, Cambridge, MA, USA.
- Litti M and 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.
- Maksem K, Ruben E. Hyten DL, Schmidt ME and Lightfoot DA (2001) High-throughput genotyping for a polymorphism linked to soybean cyst nematode resistance gene Rhg4 by using TaqmanTM probes. *Mol Breed* 7:63–71.
- Mangolin CA, Souza JR, CL, Garcia AAF, Garcia AF, Sobov ST and Souza AP (2004) Mapping QTL for kernel oil content in a tropical maize population. *Euphytica* 137:251-259.

- Mano Y, Muraki M, Fujimori M, Takamizo T and Kindiger B (2005) AFLP–SSR maps of maize x teosinte and maize x maize: comparison of map length and segregation distortion. *Plant Breed.* 124:432-439.
- Marmur J and Doty P (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 5:109-118.
- Moreau L, Charcosset A, Hospital F and Gallais A. (1998) Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. *Genetics* 148:1353-1365.
- Morgante M and Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. *The Plant J* 3:175-182.
- Mullis K and Fallona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 55:335–350.
- Paterson AH, Bowers JE, Burow MD, Draye X, Elsik CG, Jiang C-X, Katsar CS, Lan T-H, Lin Y-R, Ming R and Wright RJ (2000) Comparative Genomics of Plant Chromosomes. *Plant Cell* 12:1523-1540.
- Rice WR (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Röder MS, Korzum V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M, Leroy P and Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Roose ML, Fang D, Cheng FS, Tayyar RI, Federici CT and Kupper RS (2000) Mapping the Citrus genome. *Acta Hort* 535:25-32.
- Scalfi M, Troggio M, Piovani P, Leonardi S, Magnaschi G, Vendramin GG and Menozzi P (2004) A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theor Appl Genet* 108:433–441

- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5:63-69.
- Senior ML, Chin ECL, Lee M, Smith JSC and Stuber CW (1996) Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the Genbank database: Map construction. *Crop Sc* 36:1676–1683.
- Servin B and Hospital F (2002) Optimal positioning of markers to control genetic background in marker assisted backcrossing *J Hered* 93:214-217.
- Sharopova N, McMullen MD, Schultz L, Schroeder S, Sanchez-Villeda H, Gardiner J, Bergstrom D, Houchins K, Melia-Hancock S, Musket T, Duru N, Polacco M, Edwards K, Ruff T, Register JC, Brouwer C, Thompson R, Velasco R, Chin E, Lee M, Woodman-Clikeman W, Long MJ, Liscum E, Cone K, Davis G and Coe EH (2002) Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Mol Biol* 48:463-481.
- Sibov TS, Souza JR CL, Garcia AAF, Garcia AF, Silva AR, Mangolin CA, Benchimol LL and Souza AP (2003) Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. *Hereditas* 139:96-106.
- Taramino G and Tingey S (1996) Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39:277–287.
- Tautz D, Trick M and Dover GA (1986) Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322:652–656.
- Veldboom LR and Lee M (1996a) Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: I. Grain yield and yield components. *Crop Sci* 36:1310-1319.

- Veldboom LR and Lee M (1996b) Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: II. Plant height and flowering. *Crop Sci* 36:1320-1327.
- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem repeats. *Theor Appl Genet* 88:1-6.
- Wu K, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Genet Gen* 241:225-235.

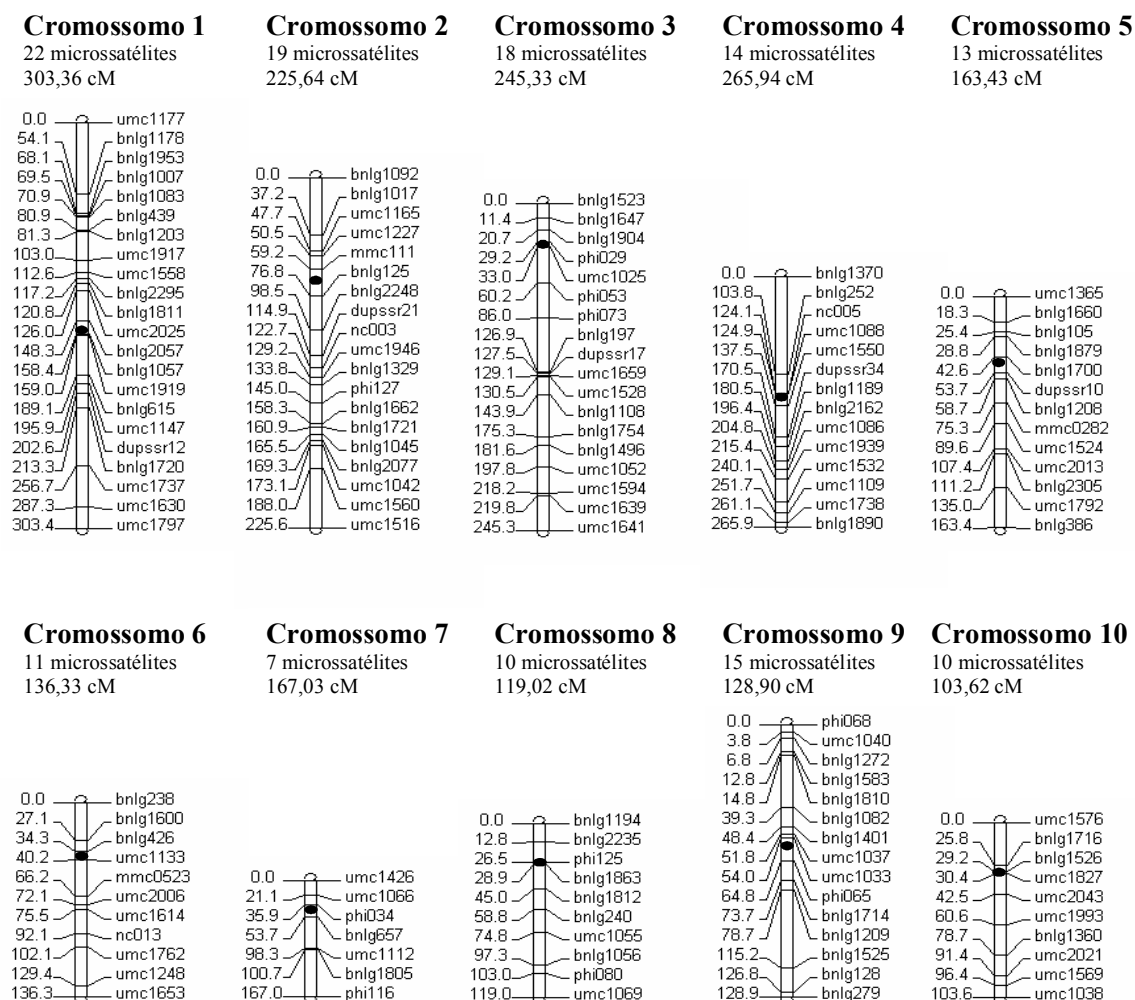


Figura 1. Mapa genético com 139 marcadores microssatélites da população F₂ de milho tropical obtida pelo cruzamento das linhagens parentais L-02-03D e L-20-01F. O nome de cada marcador está identificado do lado direito de cada cromossomo, do lado esquerdo estão suas distâncias em centimorgans (cM). Os círculos pretos nos cromossomos indicam as posições estimadas dos centrômeros, obtidas por Gardiner *et al.* (1993). A extensão total do mapa foi de 1.858,61 cM com intervalo médio de 13,47 cM entre microssatélites.

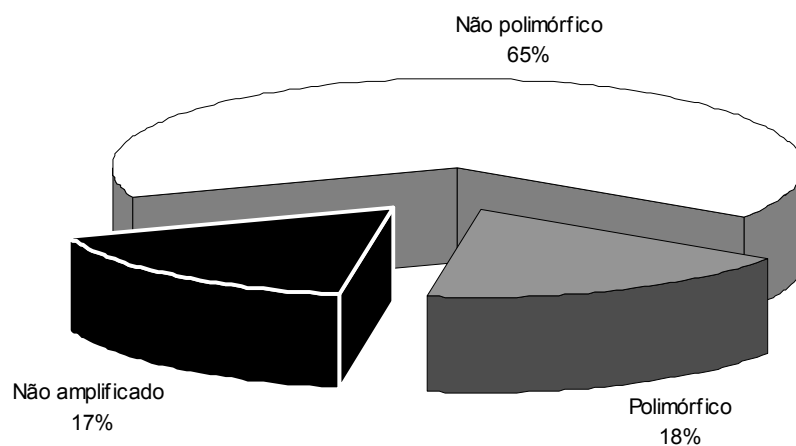


Figura 2. Distribuição do polimorfismo alélico entre as linhagens parentais e a população F_2 de milho tropical com os 392 microssatélites testados.

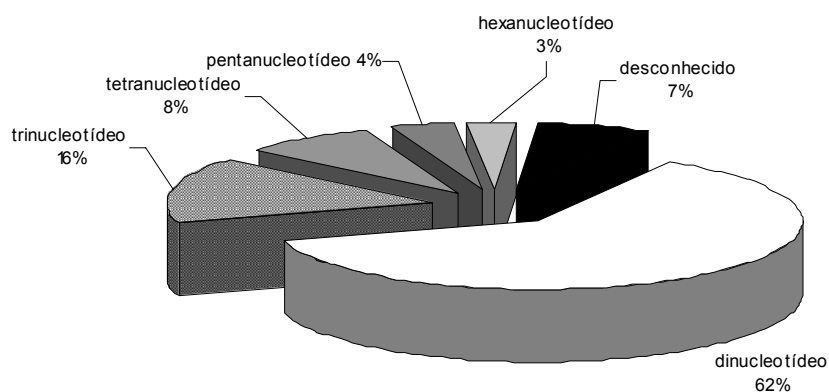


Figura 3. Distribuição da frequência por tipo de repetição em *tandem* dos 72 microssatélites polimórficos selecionados.

Tabela 1. Comportamento dos 10 grupos de ligação do mapa genético da população F₂ de milho tropical e suas distâncias em centimorgans (cM).

Grupos de Ligação	Nº de marcadores microssatélites	Comprimento do grupo de ligação	Média entre microssatélites			Microssatélites não ligados ⁽¹⁾
			Distância média	Distância máxima	Distância mínima	
1	22	303,36	14,45	54,08	0,59	umc1177 (1.01)
2	19	225,64	12,54	37,66	2,57	
3	18	245,33	14,43	40,88	0,59	
4	14	265,94	20,46	103,78	0,78	bnlg1370 (4.00)
5	13	163,43	13,62	28,46	3,38	
6	11	136,33	13,63	27,31	3,39	
7	7	167,03	27,84	66,33	2,37	phi116 (7.06)
8	10	119,02	13,22	22,52	2,38	
9	15	128,90	9,21	36,41	1,97	
10	10	103,62	11,51	25,83	1,18	
Total	139	1.858,61	13,47			

⁽¹⁾ Denominação dos locos microssatélites com a sua localização cromossômica (bin) entre parêntese.

Capítulo 2

MAPPING QTL FOR GRAIN YIELD AND PLANT TRAITS IN A TROPICAL MAIZE POPULATION

Manuscrito aceito para publicação na revista *Molecular Breeding*.

MAPPING QTL FOR GRAIN YIELD AND PLANT TRAITS IN A TROPICAL MAIZE POPULATION

Milena de Luna Alves Lima², Cláudio Lopes de Souza Jr.^{1*}, Anete Pereira de Souza², Luciana Aparecida Carlini-Garcia¹.

¹ Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 83, 13.400-970-Piracicaba, SP, Brazil.

² Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6010, 13.083-970, Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author (e-mail: clsouza@esalq.usp.br; fax: +55 19 3433-6706).

Key words: tropical maize, QTL mapping, QTL x environment, *Zea mays* L., microsatellites.

Abstract

The vast majority of reported QTL mapping for maize (*Zea mays* L.) traits are from temperate germplasm and, also, QTL by environment interaction (QTL x E) has not been thoroughly evaluated and analyzed in most of these papers. The maize growing areas in tropical regions are more prone to environmental variability than in temperate areas, and, therefore, genotype by environment interaction is of great concern for maize breeders. The objectives of this study were to map QTL and to test their interaction with environments for several traits in a tropical maize population. Two-hundred and fifty-six F_{2:3} families evaluated in five environments, a genetic map

with 139 microsatellites markers, and the multiple-environment joint analysis (mCIM) were used to map QTL; and to test QTL x E interaction. Sixteen, eight, six, six, nine, and two QTL were mapped for grain yield, ears per plant, plant lodging, plant height, ear height, and number of leaves, respectively. Most of these QTL interacted significantly with environments, most of them displayed overdominance for all traits, and genetic correlated traits had a low number of QTL mapped in the same genomic regions. Few of the QTL mapped had already been reported in both temperate and tropical germplasm. The low number of stable QTL across environments imposes additional challenges to design marker-assisted selection in tropical areas, unless the breeding programs could be directed towards specific target areas.

Introduction

With the availability of molecular markers to develop well-saturated genetic maps, mapping quantitative trait loci (QTL) has become a standard procedure to study the genetic architecture of quantitative traits, because it allows the estimation of the QTL number, their genomic position, and the genetic effects of the QTL that control them (Zeng et al. 1999; Doerge 2002). Furthermore, the power of QTL mapping has increased with the novel statistical-genetic models reported which includes multiple interval analysis, and multi-trait and/or multi-environment analysis. Then, besides QTL mapping, genetic parameters such as QTL x QTL epistatic interactions, QTL by environment interaction, and distinguishing between pleiotropy from the effects of close linked QTL in genomic regions where QTL were mapped for more than one trait can now be investigated (Jiang and Zeng 1995; Kao et al. 1999; Zeng et al. 1999).

For temperate maize (*Zea mays* L.) germplasm there have been many reports on QTL mapping for several traits such as grain yield and plant traits, and on reaction to biotic and abiotic stresses (Stuber et al. 1992; Edwards et al. 1992; Beavis et al. 1994; Schön et al. 1994; Veldboom and Lee 1994; Ajmone-Marsan et al. 1995; Austin and Lee 1996ab; Veldboom and Lee, 1996ab; Agrama et al. 1999; Schön et al. 2004; and others). However, for tropical germplasm the reports on QTL mapping are quite limited (Bohn et al. 1996,1997; Ribaut et al. 1997; Grohn et al. 1998; Khairallah et al. 1998; Mangolin et al. 2004; Sibov et al. 2003). Tropical maize populations have a broad genetic base with greater variability than temperate germplasm (Lanza et al. 1997). Also, tropical growing areas are more prone to environmental stresses, caused by precipitation and temperature variability and by different types of soils than temperate areas (Ribaut et al. 1997). Thus, QTL mapping in tropical maize germplasm could identify QTL not present in temperate germplasm, and because of the high genotype by environment interaction in tropical areas, this type of research should focus not only on mapping QTL but, also, on QTL by environment (QTL x E) interaction.

The vast majority of the reports on QTL mapping have identified only few QTL controlling quantitative traits in both temperate and tropical germplasm, with few exceptions (Lu et al. 2003; Melchinger et al. 2004). This could be due to the models employed to map QTL which use only the means across environments, excluding the QTL x E interaction, and, consequently, the power of QTL mapping is greatly reduced. QTL x E interaction has been inferred indirectly by comparing whether the same QTL was mapped in all environments simultaneously, by analyses of variance or by LOD score analysis testing whether the effects of a QTL differed significantly or not between two environments (Stuber et al. 1992). Jiang and Zeng (1995) presented a model that uses information from all testing environments allowing QTL

mapping as well as testing for QTL x E interaction, which greatly enhanced the power of QTL mapping, and thus one could expect to map more QTL than the models that use only information from the means across environments. Thus, the objectives of this research were to map QTL and to test whether they interact with environments in order to study the genetic architecture of traits which are important to maize breeding programs, such as grain yield and plant lodging, in a tropical maize population.

Material and Methods

Genetic materials

Parental inbred lines L-20-01F and L-02-03D were derived from the Brazilian early-flowering maize populations IG-1 (orange flint kernels) and IG-2 (yellow dent kernels), respectively. These populations and their derived inbreds are from different heterotic groups, and they were released by the Maize Breeding Program of the Department of Genetics/ESALQ- the University of São Paulo (Mangolim et al. 2004). Both populations were derived only from tropical germplasm. The parental inbreds were crossed, and three F_1 plants, previously screened against the inbred parents with microsatellite markers to assess their genetic identity, were selfed to develop the F_2 reference population. In the 2000/2001 agricultural season, the F_2 plants were selfed to develop the 256 $F_{2:3}$ families used for evaluation. The genetic design used; i.e., the evaluation of $F_{2:3}$ families per se were used rather than their testcrosses because our study was aimed to map QTL, estimate their additive and dominance effects, and their levels of dominance for the F_2 reference population. Testcrosses of these families would not allow these QTL effects to be estimated and, furthermore, the results from testcrosses are tester-specific. Because of its features, the evaluation

of $F_{2:3}$ families to map QTL has been extensively used (Austin and Lee 1996b; Bohn et al 1997; Agrama et al. 1999; Sibov et al. 2003; and others).

Experimental evaluation

The 256 families were evaluated at three locations near the city of Piracicaba, the state of São Paulo, Brazil, in two different cropping seasons: in 2002/2003 at the Department of Genetics Experimental Station; in 2001/2002 and in 2002/2003 at the Caterpillar and Areão Experimental Stations. The experimental design was a 16 x 16 lattice with two replications per environment, where environment is a combination of cropping season and location. The plots were 4.0 m long and spaced 0.8m between rows. Plots were overplanted and thinned to 20 plants per plot (62,500 plants ha^{-1}). Data for grain yield ($kg\ plot^{-1}$), grain moisture ($g\ kg^{-1}$), stand (plants $plot^{-1}$), and number of ears per plot (ears $plot^{-1}$) were recorded in five environments. Data for plant and ear height ($cm\ plant^{-1}$) and plant lodging (root lodging plus stalk lodging) (plants $plot^{-1}$) were recorded in four environments (Caterpillar Experimental Station in 2001/2002 and in 2002/2003 cropping seasons; and Areão and Department of Genetics in 2002/2003 cropping season); and data for the number of leaves above the uppermost ear (leaves $plant^{-1}$) were recorded in three experimental stations only in the 2002/2003 cropping season. Ears from each plot were hand-harvested, bagged, labeled, and transported to the maize breeding laboratory. Plots were shelled using electric shelling devices and weighed on electronic scales. The grain yield of each plot was adjusted for average stand by covariance analyses, and for grain moisture of 15.0%, and, subsequently, transformed to grams $plant^{-1}$. Plant and ear height were recorded on five competitive plants per plot, from the ground level to the collar of the flag leaf and to the

uppermost ear node, respectively; and the plot means were used for analyses. Also, the number of leaves above the uppermost ear, thereafter termed number of leaves, was recorded on five competitive plants per plot and the plot means were used for analyses. The average production of ears per plant, thereafter termed ears per plant, was computed by the ratio number of ears per plot that equally contributed to grain yield/stand. Here, the number of ears that equally contributed to grain yield refers to the number of well-developed ears plus the number of sets of two or three small ears that when conjoined had similar size to the well-developed ears of each plot; and each set was computed as a single ear.

Analyses of variance and covariance

Analyses of variance were computed for each environment following the lattice design used. The least square means of each environment and the effective error mean squares were used to compute the joint analyses of variance for each trait and covariance between traits across environments. All effects of the mathematical model, except the overall mean, were considered random, and the analyses were performed using PROC GLM from SAS software (SAS Institute, 2001). Estimates of the genetic variances (σ_G^2) and genetic by environment interaction variances (σ_{GE}^2) were estimated by equating the computed mean squares to their respective expectations, and solved as $\hat{\sigma}_G^2 = (MSG - MSGE) / RE$ and $\hat{\sigma}_{GE}^2 = (MSGE - MSE) / R$; and the phenotypic variances were estimated as $\hat{\sigma}_{Ph}^2 = (MSG / RE)$; i.e., $\hat{\sigma}_{Ph}^2 = \hat{\sigma}_G^2 + (\hat{\sigma}_{GE}^2 / E) + (\hat{\sigma}^2 / RE)$. Here, MSG , $MSGE$, and MSE are the mean squares of the $F_{2:3}$ families, of the genotype by environment interaction, and of the error; and R and E are the number of replications and environments,

respectively. Broad-sense heritability coefficients on a family mean-basis were estimated as described by Hallauer and Miranda F^o. (1988, p.90); i.e., $\hat{h}^2 = \hat{\sigma}_G^2 / \hat{\sigma}_{Ph}^2$, and 95% confidence intervals were computed following the procedures described by Burdick and Graybill (1992). The genetic ($\hat{Cov}_{G(xy)}$) and phenotypic ($\hat{Cov}_{Ph(xy)}$) covariance between traits were estimated from the joint analyses of covariance following the same procedures used to estimate the respective variances; and phenotypic and genotypic correlations between traits x and y were estimated as $\hat{r}_{Ph(xy)} = \hat{Cov}_{Ph(xy)} / \hat{\sigma}_{Phx} \hat{\sigma}_{Phy}$, and $\hat{r}_{G(xy)} = \hat{Cov}_{G(xy)} / \hat{\sigma}_{Gx} \hat{\sigma}_{Gy}$, respectively, where $\hat{\sigma}_{Ph}$ and $\hat{\sigma}_G$ are the square roots of the estimates of the phenotypic and genotypic variances, respectively (Mode and Robinson, 1959).

Genetic map

The genetic map used, as well as the procedures used to develop it, was previously described by Mangolin et al. (2004). Briefly, the F₂ plants that gave rise to the F_{2:3} families were genotyped with microsatellite markers. The genetic map was developed using the MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lincoln et al. 1992) with a LOD threshold of 3.0 and a maximum distance between adjacent markers of 50 cM; i.e., 0.38 as the maximum recombination frequency, to establish the linkage groups, and the Kosambi's (1944) mapping function was used to convert recombination frequencies into map distances. Sixty four new microsatellite markers were added to the map of Mangolin et al. (2004), which totaled 139 markers distributed along the 10 linkage groups. The genetic map spanned 1,858.61 cM in length with an average interval of 13.47 cM between adjacent markers.

QTL mapping

The composite interval mapping method (CIM) (Zeng 1994) extended to perform a joint analysis of multiple environments (mCIM) (Jiang and Zeng 1995), was used to map QTL and to test whether it accounts for a QTL by environment (QTL x E) interaction. The least square means of each trait from each environment was used for QTL mapping. The underlying mixture model for QTL mapping is: $Y_{jk} = b_{0k} + a_k^* x_j^* + d_k^* z_j^* + \sum_l (a_{lk} x_{jl} + d_{lk} z_{jl}) + e_{jk}$, where Y_{jk} is the phenotypic mean of the j th family at the k th environment ($j=1, \dots, 256$; $k=1, \dots, 5$ or $k=1, \dots, 4$ or $k=1, \dots, 3$); b_{0k} is the mean effect of the model for environment k ; a_k^* is the additive effect of the putative QTL at environment k ; x_j^* counts the number of alleles from parental inbred L-02-03D at the putative QTL taking values of 2, 1, and 0 for genotypes QQ, Qq, and qq, respectively, with probabilities depending on genotypes of the markers flanking the putative QTL and the recombination frequencies between the QTL and the markers; d_k^* is the dominance effect of the putative QTL in environment k ; z_j^* is an indicator variable taking values of 1 for genotype Qq and 0 for genotypes QQ and qq of the putative QTL, with probabilities depending on genotypes of the markers flanking the putative QTL and the recombination frequencies between the QTL and the markers; x_{jl} and z_{jl} are corresponding variables for marker l , with t markers selected as cofactors for controlling residual variation; a_{lk} and d_{lk} are the partial regression coefficients of Y_{jk} on x_{jl} and on z_{jl} , respectively; and e_{jk} is the residual of the model. The cofactors were selected using the forward/backward stepwise regression procedure ($P \leq 0.05$) for each environment, and combined for each trait in the joint QTL analyses.

The likelihood ratio test statistic (LR) for the presence of a QTL in one or more environments is $LR = -2\ln(L_0/L_1)$, where L_0 is the maximum likelihood (ML) under the null hypothesis that $a_1=a_2=\dots=a_k=0$, and/or $d_1=d_2=\dots=d_k=0$, and L_1 is the ML under the alternative hypothesis that at least one $a_k \neq 0$, and/or one $d_k \neq 0$. The LR test for QTL x environment interaction (QTL x E) evaluates the ratio of ML (L_0) under the null hypothesis that $a_1=a_2=\dots=a_k$, and/or $d_1=d_2=\dots=d_k$, and under the alternative hypothesis (L_1) of $a_1 \neq a_2 \dots \neq a_k$, and/or $d_1 \neq d_2 \dots \neq d_k$. Under the null hypothesis the LR's are asymptotically distributed as χ^2 with $k+1$ d.f. for the presence of QTL, and with $k-1$ d.f. for the QTL x E interaction if the tests were performed only in regions where the QTL were previously detected. The appropriate threshold values to declare the presence of a QTL and for a QTL x E interaction were adjusted by the number of independent tests in the genome-wide scan following the procedures described by Vieira et al. (2000). The number of independent tests for QTL mapping was estimated considering the length of the l th linkage group (T_l) and the window size used (10 cM) as $\sum_l [(T_l / 35) + 1]$, which considers that adjacent regions of 35cM were regarded as independent, and the number of independent tests was 54. The type I error rate used for a genome-wide scan was $\alpha=0.05$, and $\alpha=0.05/54=0.0009$ was used for each test. The LR thresholds values for QTL mapping were then 22.68, 20.73, and 18.68, which correspond to LOD thresholds of 4.93, 4.50, and 4.06; and for the QTL x E interaction the LR thresholds values were 18.68, 16.47, and 14.01, which correspond to LOD thresholds of 4.06, 3.58, and 3.05, for traits evaluated in five, four, and three environments, respectively. Thus, the LOD threshold values used in this study were greater than the LOD threshold values of 2, 2.5, or 3 commonly used for QTL mapping in maize (Schön et al. 1994; Bohn et al. 1996; Khairallah et al. 1998; Agrama et al. 1999; Mihaljevic et al. 2005; and others). The analyses of QTL mapping

for multiple environments and the detection of QTL x E interaction (mCIM) were performed using the Windows QTL Cartographer software, version 2.5, JZmapQTL procedure (Wang et al. 2005).

The phenotypic variances explained by each QTL and by all QTL (R^2) were also obtained from the Windows QTL Cartographer software version 2.5 (Wang et al. 2005). All QTL for each trait previously mapped using the mCIM procedure were fitted in a single model with multiple QTL and main effects; i.e., disregarding epistatic interactions. The software then uses the EM algorithm to evaluate the likelihood of this mixture model with multiple QTL. Once the complete model was fitted for each trait, the coefficients of determination (R^2) of each QTL and of all QTL were automatically computed by the software.

Parental inbred L-02-03D is more vigorous and presents higher mean values than parental inbred L-20-01F for all traits evaluated, except for plant lodging. Following common practice in QTL mapping studies, the signs of the additive effects of the QTL were used to identify the parental origin of the favorable alleles (Austin and Lee 1996b; Khairallah et al. 1998; Agrama et al. 1999; Sibov et al. 2003; Mangolin et al. 2004); i.e., positive and negative signs indicated that L-02-03D and L-20-01F contribute towards higher values for all traits evaluated, respectively. Levels of dominance were estimated as $LD = |d|/|a|$ ratio for each QTL, and the average level of dominance (ALD) was computed weighing each LD ratio by its respective R^2 value. Following several studies (Bohn et al. 1996; Bohn et al. 1997; Khairallah et al. 1998; Sibov et al. 2003; and others), gene action was characterized as follows: additive (A) $0.0 \leq LD \leq 0.20$; partial dominance (PD) $0.21 \leq LD \leq 0.80$; dominance (D) $0.81 \leq LD \leq 1.20$; and overdominance (OD) $LD > 1.21$.

One-LOD support intervals (~95% confidence interval) was computed for each mapped QTL as described by Lynch and Walsh (1998, p.448). Whenever the QTL mapped for different traits overlapped in the same support interval, these genomic regions were regarded as having QTL affecting more than one trait. Tests for QTL positions and pleiotropy vs. linkage were not computed because so far they have not been implemented in the QTL Cartographer software. Comparisons of QTL mapped in our population with those reported from other studies were carried out by identifying the QTL reported at the Maize Genome Data Bank site (<http://maizegdb.org>, July 2005) and their positions, and, subsequently, by considering that the QTL mapped in our population and those reported were regarded as indistinguishable whenever a marker nearest to the LR statistic peak of a mapped QTL in our population was located in the same chromosomal bin of a QTL mapped in another population.

Results and Discussion

Means, heritabilities and correlations

Environmental conditions were good for maize production at all locations and growing seasons, with normal variability among environments because of the differences in the rain distribution and types of soil, which is typical of tropical growing areas. The average grain yield was low ($40.83 \text{ g plant}^{-1}$ or 2.6 ton ha^{-1}) because the $F_{2:3}$ families presented high inbreeding depression at the high plant density used ($62,500 \text{ plants ha}^{-1}$), ranging from $14.70 \text{ g plant}^{-1}$ (0.92 ton ha^{-1}) to $68.43 \text{ g plant}^{-1}$ (4.3 ton ha^{-1}); also, notice that the $F_{2:3}$ families were a random sample of the reference population. Ears per plant, plant lodging, plant height, ear height, and number of leaves had an overall mean of 0.60, 1.26%, $157.94 \text{ cm plant}^{-1}$, $81.02 \text{ cm plant}^{-1}$, and $5.79 \text{ leaves plant}^{-1}$,

respectively. Despite the low grain yield of the families, the variances of the experimental error were not high, which assured the good quality of the data. The experimental coefficient of variation from the combined analyses of variance for grain yield was 20.42%, which is a small value considering the low mean grain yield of the experiments. For the other traits, the coefficients of variation were below 6%, except for ears per plant (19.39%) and plant lodging (26.79%). Furthermore, the quality of the data could be readily assessed by the small ranges of the confidence intervals of the estimates of genetic and genotype by environment interaction variances, heritability coefficients, and by the low standard errors of the means for all traits (Table 1).

Estimates of genetic variances ($\hat{\sigma}_G^2$), genetic by environment interaction variances ($\hat{\sigma}_{GE}^2$), and broad-sense heritability coefficients ($\hat{h}^2$) differed significantly from zero ($P \leq 0.05$) for all traits. Also, the estimates of $\hat{\sigma}_G^2$ were significantly greater ($P \leq 0.05$) than the estimates of $\hat{\sigma}_{GE}^2$ for all traits, except for ears per plant and plant lodging. Thus, genetic variation among families was detected, and the families presented differential performance across environments for all traits. The heritability coefficients were high for grain yield, plant height, ear height, and for the number of leaves ($\hat{h}^2 > 67\%$), and were of intermediate magnitudes for ears per plant and plant lodging ($60\% < \hat{h}^2 < 50\%$) (Table 1). Genotypic correlations between grain yield and the other traits were highly significant ($P \leq 0.01$) with greater and intermediate values, except for the correlation with the number of leaves. Plant lodging presented negative correlation with all other traits, and number of leaves presented significant correlation only with plant height. Phenotypic and genetic correlations presented similar values (Table 2).

-Table 1-

-Table 2-

QTL mapping

Sixteen QTL were mapped for grain yield on seven chromosomes; QTL were not mapped on chromosomes 8, 9, and 10. The phenotypic variance explained by each QTL (R^2) ranged from 1.02% to 4.66%, and all QTL explained 36.28% of the phenotypic variance. Half of the QTL mapped displayed positive additive effects, and half negative additive effects; thus, both parental inbreds had eight QTL with alleles that contributed to increase the trait. Twelve QTL (75.0%) displayed positive dominance effects, showing that there is a tendency for positive unidirectional dominance effects of the QTL, which agreed with previous reports (Cockerham and Zeng 1996; Lu et al. 2003) and could explain the high inbreeding depression for this trait. The level of dominance ranged from additive (LD=0.01) to overdominance (LD=6.50), and overdominance (ALD=1.26) was the average level of dominance. Although overdominance was the average level of dominance, only five (31.25%) of the 16 QTL displayed overdominance, and 11 (68.75%) QTL displayed additive, partial dominance, or dominance gene action. Hence, as the ALD value is near the lower bound of the overdominance scale level (1.21) and there is an inherent error associated with it, this result only suggests that overdominance could be the average level of dominance for grain yield. Overdominance in QTL mapping studies has been reported in both tropical and temperate maize germplasm (Stuber et al. 1992; Bohn et al. 1996; Agrama et al. 1999; Lu et al. 2003), although Sibov et al. (2003) reported that none of the QTL mapped displayed overdominance, and partial dominance was the average level of dominance in the tropical maize population evaluated.

Eight QTL were mapped for ears per plant on 5 chromosomes. The phenotypic variance explained by the QTL (R^2) ranged from 1.34% to 11.56%, and all QTL explained 32.28% of the phenotypic variance. Half of the QTL presented positive additive effects, and thus both parental inbreds had four QTL that increased the trait. Five of the eight QTL (62.50%) displayed positive dominance effects, and as for grain yield, there was a tendency for a positive unidirectional dominance. The gene action ranged from additive to overdominance; 50.0% of the QTL displayed overdominance, and overdominance was the average level of dominance (ALD=3.37) (Table 3). Overdominance for ears per plant was reported by Agrama et al. (1999), and partial dominance was reported by Veldboom and Lee (1994; 1996a).

-Table 3-

For plant lodging, the second most important trait in maize breeding programs, six QTL were mapped on chromosomes 1, 4, and 9. The phenotypic variance explained by the QTL ranged from 1.24% to 22.34%, and all QTL explained 45.2% of the phenotypic variance. Four of the six QTL displayed negative additive effects, and then most of the QTL that increased plant lodging are in the parental inbred L-20-01F. Gene action ranged from partial dominance to overdominance, and overdominance (ALD=1.62) was the average level of dominance (Table 4). Lu et al. (2003) reported that gene action for this trait ranged from additive to overdominance, but partial dominance was the average level of dominance.

Six and nine QTL were mapped for plant height and ear height, and the phenotypic variance explained by the all QTL was 25.38% and 39.54%, respectively. Four QTL displayed negative additive effects for both traits, and two and five QTL displayed positive additive effects for plant and ear height, respectively. Thus, QTL that reduce and increase these traits were present in both parental inbreds. The level of dominance ranged from additive to overdominance

for both traits, and the average levels of dominance were dominance (ALD=1.09) and partial dominance (ALD=0.54) for plant and ear height, respectively. For plant height, overdominance was reported by Veldboom et al. (1994), Bohn et al. (1996), Khairallah et al. (1998), and Lu et al. (2003), and partial dominance was reported by Veldboom and Lee (1996b). For ear height, partial dominance and dominance was reported by Veldboom et al. (1994) and by Veldboom and Lee (1996b), respectively.

Fifty percent of the carbohydrates in the maize kernels are attributed to the photosynthesis of the leaves above the uppermost ear (Hoyt and Bradfield 1962; Allyson and Watson 1966). Thus, it is important to know its inheritance, albeit this trait has not been routinely evaluated in maize breeding programs (Silva et al. 2004). Only two QTL on chromosome 1 were mapped for this trait, and explained 25.38% of the phenotypic variance. Overdominance was the average level of dominance, and both QTL displayed overdominance. Probably, only two QTL were mapped because the range of the families for this trait was very low, although the genetic variance differed significantly from zero (Table 1). To the author's knowledge this trait has not been mapped so far in other populations.

Although the number of QTL mapped for each trait had been greater than those usually reported, the phenotypic variance explained (R^2) by all QTL for all traits were low. These results could be due to (i) failure of the model to map QTL with very small effects, (ii) the larger distances between flanking markers in some regions of chromosomes 1, 4, and 7, that reduced the power of QTL mapping in those regions, and (iii) as the model allows to map only one QTL per interval, sets of genes in the same interval with different genetic effects signs could have the total effect canceled or highly reduced and thus not being mapped or mapped as a unique QTL with small effects. Thus, new markers should be added to the map to circumvent problems (ii) and

(iii), and quite likely new QTL could be mapped and the phenotypic variance explained by the QTL would increase.

Four of the six traits evaluated displayed overdominance as the average level of dominance. Overdominance as the average level of dominance for grain yield and other traits have also been reported from estimates of additive and dominance variances from non random-mated F_2 populations. However, further studies with F_2 populations random-mated for several generations showed that those estimates were biased because of the high linkage disequilibrium of the F_2 populations, and that the average levels of dominance of maize traits are within the range of partial to complete dominance (Hallauer and Miranda F^o 1988; Silva et al. 2004). Stuber et al. (1992) reported that for grain yield most of the mapped QTL displayed overdominance. A re-analysis of their data, however, suggested that the overdominance displayed by the QTL was in fact pseudo-overdominance caused by sets of tight-linked QTL displaying dominance as a consequence of the high linkage-disequilibrium of the population (Cockerham and Zeng 1996). Furthermore, a subsequent fine mapping on chromosome 5 showed that a QTL that displayed overdominance was comprised of at least two dominant QTL (Graham et al. 1997). On the other hand, Lu et al. (2003) mapped QTL in an F_2 population that was random-mated for three generations, and, even so, most of the QTL mapped displayed overdominance for grain yield, which was its average level of dominance. The results from the estimates of genetic variances with random-mated F_2 populations did not agree with those reported by Lu et al. (2003), but were supported by the results reported by Cockerham and Zeng (19660) and by Graham et al. (1997). Hence, as we have only few reported results on this issue; i.e., mapping QTL using random-mated populations and fine mapping at specific regions of the genome, the average level of dominance for several traits in maize at the molecular level remains unsolved.

-Table 4-

QTL x E interaction

The number of QTL that interacted significantly with environments was greater for all traits. The percentage of the mapped QTL that interacted significantly with environments was 75.0% for grain yield and ears per plant, 50.0% for plant lodging and plant height, 44.4% for ear height, and 100.0% for leaf number. These results showed that the expression of most of the QTL mapped for all traits changed across environments, causing the differential performance of the families across environments, which was also previously detected by the significant G x E interaction variance. Thus, few QTL were stable across environments for all traits; i.e., only four of the 16 QTL mapped for grain yield were stable; and two, three, three, five, and zero QTL were stable across environments for ears per plant, plant lodging, plant height, ear height, and leaf number, respectively. Because of the wide range of environments in which maize is cultivated in tropical regions, genotype by environment interaction is of great concern in maize breeding programs. Thus, experiments conducted for several years in hundreds of locations are required to identify and to select high-yielding maize hybrids that are stable across environments (Ribaut et al. 1997; Silva et al. 2004). Even so, many cultivars released are region-specific because of the high genotype by environment interaction for grain yield. Thus, stable QTL across locations and years should be rare in tropical regions.

QTL and genetic correlations

Because quantitative traits under selection in maize breeding programs are usually genetic correlated, one could expect that some QTL for these traits would be mapped in the same

genomic regions due to pleiotropic effects or tight linkage of QTL affecting different traits simultaneously. Grain yield presented significant genetic correlations with all traits, except with the number of leaves. However, the number of QTL mapped in the same genomic regions for grain yield and for the other traits was low. Grain yield and ears per plant was highly correlated, as expected because ears per plant is a grain yield component, but only three of the 16 (18.75%) QTL mapped for grain yield were in the same genomic regions of the QTL mapped for ears per plant (*qgy1c* and *qep1*, *qgy2* and *qep2c*, and *qgy5d* and *qep5*). For plant height, ear height, and plant lodging, only two (*qgy3b* and *qph3a*, and *qgy3c* and *qph3b*), four (*qgy3c* and *qeh3a*, *qgy3d* and *qeh3b*, *qgy4a* and *qeh4*, and *qgy7* and *qeh7*), and two (*qgy1a* and *qpl1c*, and *qgy4a* and *apl4b*) QTL were mapped in the same genomic regions of the QTL mapped for grain yield. Plant height and ear height had only one QTL mapped in the same region (*qph3b* and *qeh3a*); ear height and plant lodging had also only one QTL in common (*qeh4* and *apl4b*). Plant lodging and prolificacy, plant height and plant lodging, as well as leaf number and the other traits had no QTL mapped in the same regions. Two QTL were mapped in the same region for grain yield, plant height, and ear height; and only one QTL was mapped in the same region for grain yield, ear height, and plant lodging. Notice that the two QTL mapped in the same regions for grain yield and plant lodging presented negative additive effects, suggesting that pleiotropic effects or effects of tightly linked QTL were in different directions for plant breeding purposes; i.e., both QTL had alleles that increase grain yield and plant lodging simultaneously. The low percentage of the total phenotypic variance explained by QTL suggests that the majority of the segregating QTL in the population remained unmapped for all traits, which could explain the low number of QTL mapped in the same genomic regions for traits that presented high genetic correlation.

Comparison with other studies

The number of QTL mapped for all traits evaluated in this study was greater than those usually reported (Stuber et al. 1992; Beavis et al. 1994; Ajmone-Marsan et al. 1995; Austin and Lee 1996ab; Bohn et al. 1996; Sibov et al. 2003; Veldboom and Lee 1996ab; and others), with few exceptions (Lu et al. 2003; Melchinger et al. 2004). These differences can be attributed to different genetic maps, population designs (F_2 , BC, Testcross, etc.), number of entries evaluated, and models used to map QTL (Beavis et al. 1994). The model used in this study, joint CIM (mCIM), uses the means of the traits from all environments in which they were evaluated, whereas the other methods use only the means across environments. Thus, the mCIM method is more powerful than the other methods to map QTL, and also it takes into account the QTL by environment interaction providing more insight into the genetic architecture of the traits (Jiang and Zeng 1995). To the author's knowledge only two reported researches have used this model for QTL mapping in maize, and the number of QTL mapped was greater than those commonly reported (Bohn et al. 1997; Khairallah et al. 1998).

The direct comparisons among the QTL mapped in different studies become difficult due to differences in the Material and methods used by the authors. Furthermore, it should be emphasized that the criteria used for those comparisons may be prone to large errors, and, therefore, one could only speculate that the QTL mapped in the same genomic regions in different studies may represent the same QTL. For grain yield QTL *qgy1b*, *qgy5a*, *qgy5d* are in the same genomic regions of the QTL reported by Beavis et al. (1994), Austin and Lee (1996b), Veldboom and Lee (1996a), and Lu et al. (2003) in temperate germplasm, and QTL *qgy1a* is in the same genomic region of a QTL mapped by Bohn et al. (1996) in tropical germplasm. For

plant height, QTL *qph3a*, *qph3b* and *qph5* were in the same genomic regions as those reported by Lu et al. (2003), Schön et al. (1994), and Bohn et al. (1996), respectively. For ears per plant only QTL *qep8a* and *qep8b* were in the same regions as those reported by Austin and Lee (1996b); whereas for ear height and plant lodging no QTL mapped in our study were in the same regions as those reported so far (Veldboom et al. 1994; Veldboom and Lee 1996b; Lu et al 2003; Sibov et al. 2003; and others). Most of the QTL mapped in our study are in genomic regions that had not yet been reported in tropical and temperate germplasm and, therefore, the QTL mapped in our study will increase the number of QTL reported for the traits evaluated.

Implications for marker-assisted selection

The mapped QTL could be used in marker-assisted selection (MAS) to design more efficient breeding programs (Stuber and Sisco 1991). In maize breeding programs, successful (Stuber and Sisco 1991; Openshaw and Frascaroli 1997) and unsuccessful (Bouchez et al. 2002; Moreau et al. 2004) results of MAS have been reported. The high proportion of QTL that interact with environments; i.e., the low proportion of stable QTL, as shown in our study, could impose considerable challenges for MAS in tropical areas. The unsuccessful results of marker-assisted selection aforementioned were, at least in part, caused by the QTL x E interaction (Moreau et al. 2004).

The high environmental variability across the maize growing areas in tropical regions could be, however, circumvented by partitioning the environments into subsets of environments that have either low or non-crossover G x E interaction; and datasets of stable QTL for each subset of environments can, then, be developed and used in MAS. Notice that MAS within subsets of environments will be conducted with specific sets of QTL and, thus, QTL x E

interaction within each subset of environments will be also exploited, which could increase the efficiency of MAS.

The marker-assisted breeding procedure described by Stuber and Sisco (1991) to improve elite single-crosses could be useful for tropical regions. Briefly, favorable QTL not present in the parental inbreds of an elite single-cross are mapped in other inbreds of the same heterotic group, and then transferred to the parental inbreds by marker-assisted backcross selection. Then, elite single-crosses could be identified in each subset of environments and improved by this breeding procedure. This approach will increase the costs of the breeding programs because QTL mapping analyses and marker-assisted selection programs will be conducted for each subset of environments. It is well-known, however, that the release of new elite single-crosses is a long-term procedure and that it requires high financial resources, mainly because of the great number of environments in which the single-crosses have to be evaluated. In the marker-assisted breeding procedure described by Stuber and Sisco (1992), existing elite single-crosses will be improved, and then the time and the number of environments to be used for the evaluation of the improved single-crosses will be lower than those required to develop new elite single-crosses. Thus, the financial resources required for this MAS procedure could not differ greatly from those required to develop new elite single-crosses from the conventional procedure; and, also, as marker technology develops the costs of marker-assisted selection programs could be significantly reduced. It should be emphasized, however, that this breeding procedure can be implemented in commercial programs only if it is more cost-effective than conventional selection.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-99/12143-1 and 01/05702-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-2003/302653). C.L.Souza Jr. and A.P. Souza are recipients of a research fellowship from CNPq. The authors express their gratitude to A.S. Oliveira, C.R. Segattelli, and A. Silva, for their assistance with the field experiments.

References

- Agrama H.A.S., Zakaria A.G., Said F.B. and Tuinstra M.R. 1999 Identification of quantitative trait loci for nitrogen use efficiency in maize. *Mol. Breed.* 5: 187-195.
- Ajmone-Marsan P., Monfredini G., Ludwing W.F., Melchinger A.E., Franceschini P., Pagnotto G. and Motto M. 1995. In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation of grain yield. *Theor. Appl. Genet.* 90: 415-424.
- Allison J.C.S. and Watson D.J. 1966. The production and distribution of dry matter maize after flowering. *Ann. Bot.* 30: 365-381.
- Austin D.F. and Lee M. 1996a. Genetic resolution and verification of quantitative trait loci for flowering and plant height with recombinant inbred lines of maize. *Genome* 39: 957-968.
- Austin D.F. and Lee M. 1996b. Comparative mapping in $F_{2:3}$ and $F_{6:7}$ generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. *Theor. Appl. Genet.* 92: 817-826.
- Beavis W.D., Smith O.S., Grant D. and Fincher R. 1994. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F_4 progeny from maize. *Crop Sci.* 34: 882-896.

- Bohn M., Khairallah M.M, González-de-León D., Hoisington D.A., Utz H.F., Deutsch J.A., Jewell D.C, Mihm J.A. and Melchinger A.E. 1996. QTLs mapping in tropical maize: I. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. *Crop Sci.* 36: 1352-1361.
- Bohn M., Khairallah M.M, Jiang C., González-de-León D., Hoisington D.A., Utz H.F., Deutsch J.A., Jewell D.C, Mihm J.A. and Melchinger A.E. 1997. QTL mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. *Crop Sc.* 37: 1892-1902.
- Bouchez A., Hospital F., Causse M., Gallais A. and Charcosset A. 2002. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines. *Genetics* 162: 1945-1959.
- Burdick R.K. and Graybill F.A. 1992. Confidence intervals on variance components. Marcel Dekker. Inc. New York. 211p.
- Cockerham C.C. and Zeng Z. 1996. Design III with marker loci. *Genetics* 143: 1437-1456.
- Doerge R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 43–52.
- Edwards M. D., Helentjaris T., Wright S. and Stuber C.W. 1992. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 765–774.
- Graham G.I., Wolff D.W. and Stuber C.W. 1997. Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five by fine mapping. *Crop Sci.* 37:1601-1610.
- Grohn S., González-de-León D., Khairallah M.M, Jiang C., Bergvinson M., Bohn M., Hoisington D.A. and Melchinger A.E. 1998. QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for

- resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two RIL populations. Crop Sci. 38: 1062-1072.
- Hallauer A.R. and Miranda-Filho J.B. 1988. Quantitative genetics in maize breeding. 2ed. Ames: Iowa State University Press, 468p.
- Hoyt P. and Bradfield R. 1962. Effect of varying leaf area by partial defoliation and plant density on dry matter production in corn. Agron. J. 54: 523-525.
- Jiang C. and Zeng Z.B. 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. Genetics 140: 1111-1127.
- Kao C., Zeng Z.B. and Teasdale R. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. Genetics 152: 1203-1216.
- Khairallah M.M., Bohn M., Jiang C., Deutsch J.A., Jewell D.C., Mihm J.A., Melchinger A.E., González-de-León D. and Hoisington D.A. 1998. Molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. Plant Breed. 117: 309-318.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12: 172-175.
- Lanza L.L.B., Souza Jr. C.L., Ottoboni L.M.M., Vieira M.L.C. and Souza A.P. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94: 1023–1030.
- Lincoln S.E., Daly M.J., and Lander E.S. 1992 Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP version 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3ed.
- Lynch M. and Walsh B. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 980p.

- Lu H., Romero-Severson J. and Bernardo R. 2003. Genetic basis of heterosis explored by simple sequence repeat markers in a random-mated maize population. *Theor. Appl. Genet.* 107: 494-502.
- Maize Data Bank. 2005. Query at URL <http://www.maizegdb.org> (July).
- Mangolin C.A., Souza Jr. C.L., Garcia A.A.F., Garcia A.F., Sibov S.T. and Souza A.P. 2004. Mapping QTLs for kernel oil content in a tropical maize population. *Euphytica* 137: 251-259.
- Melchinger A.E., Utz H.F. and Schön C.C. 2004. QTL analysis of complex traits with cross validation, bootstrapping and other biometric methods. *Euphytica* 137: 1-11.
- Mihaljevic R., Schön C.C, Utz H.F. and Melchinger A.E. 2005. Correlations and QTL correspondence between line per se and testcross performance for agronomic traits in four populations of European maize. *Crop Sci.* 45: 114-122.
- Mode C.J. and Robinson H.F. 1959. Pleiotropism and the genetic variance and covariance. *Biometrics* 15:518-537.
- Moreau L., Charcosset A. and Gallais A. 2004. Experimental evaluation of several cycles of marker-assisted selection in maize. *Euphytica* 137: 111-118.
- Openshaw S. and Frascaroli E. 1997. QTL detection and marker-assisted selection for complex traits in maize. In: *Proc. 52th Annual Corn and Sorghum Research Conference*, ASTA, Washington, D.C.
- Ribaut J.-M., Jiang C. and González-de-Léon D. 1997. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* 94: 887-896.
- SAS Institute. 2001. SAS/STAT user's guide v. 8.2. SAS Institute. Cary, N.C. 1028p.

- Schön C.C., Melchinger A.E., Boppenmaier J., Brunklaus-Jung E., Herrman R.G. and Seitzer J.F. 1994. RFLP mapping in maize: quantitative trait loci affecting performance of elite European flint lines. *Crop Sci.* 34: 378-389.
- Schön C.C., Utz S., Groh B., Truberg S., Openshaw S. and Melchinger A.E. 2004. QTL mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment confirms the infinitesimal model of quantitative genetics for complex traits. *Genetics* 167: 485-498.
- Sibov T.S., Souza Jr. C.L., Garcia A.A.F., Silva A.R., Garcia A.F., Mangolin C.A., Benchimol L.L. and Souza A.P. 2003. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture.
- Silva A.R., Souza Jr. C.L., Aguiar A.M. and de Souza A.P. 2004. Estimates of genetic variance and level of dominance in a tropical maize population. I. Grain yield and plant traits. *Maydica* 49: 65-71.
- Stuber C.W. and Sisco P. 1991. Marker-facilitated transfer of QTL alleles between elite inbred lines and responses in hybrids. *Proceedings of the 46th Annual Corn and Sorghum Research Conference, ASTA, Washington, D.C.*, pp. 104–113.
- Stuber C.W., Lincoln S.E., Wolff D.W., Helentjaris T. and Lander E.S. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823-839.
- Veldboom L.R. and Lee M. 1994. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. II. Determination of QTLs for grain yield and yield components. *Theor. Appl. Genet.* 89: 415-458.

- Veldboom L.R. and Lee M. 1996a. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: I. Grain yield and yield components. *Crop Sci.* 36: 1310-1319.
- Veldboom L.R. and Lee M. 1996b. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: II. Plant height and flowering. *Crop Sci.* 36: 1320-1327.
- Veldboom L.R., Lee M., and Woodman W.L. 1994. Molecular marker-facilitated studies in an elite maize population: I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. *Theor. Appl. Genet.* 88:7-16.
- Vieira C., Pasyukova E.G., Zeng Z.B., Hackette J.B., Lyman R.F. and Mackay T.F.C. 2000. Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 154: 213-227.
- Wang S., Basten C.J., Z.-B. Zeng. 2005. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics. North Carolina State University, N.C. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.)
- Zeng Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1466.
- Zeng Z.B., Kao C. and Basten C.J. 1999. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genet. Res.* 74: 279-289.

Table 1. Estimates of variance components, heritability coefficients, means and ranges of the F_{2:3} families for several maize traits.

Parameters ^a	Grain yield (g plant ⁻¹)	Ears per plant ^b (ears plant ⁻¹)	Plant lodging ^b (%)	Plant height (cm plant ⁻¹)	Ear height (cm plant ⁻¹)	Number of leaves ^b (n° plant ⁻¹)
$\hat{\sigma}_G^2$	64.29 [51.61; 82.31]	5.38 [4.09; 7.40]	36.35 [26.05; 54.28]	64.04 [52.28; 80.28]	27.62 [22.40; 34.92]	65.07 [50.85; 86.25]
$\hat{\sigma}_{G \times A}^2$	36.25 [27.62; 49.70]	4.30 [2.91; 6.99]	33.40 [20.88; 61.88]	18.90 [13.65; 27.92]	7.60 [5.03; 12.83]	14.01 [6.12; 58.03]
$\hat{h}^2$	75.24 [69.76; 79.50]	59.78 [51.19; 66.91]	49.52 [37.98; 58.49]	81.67 [77.47; 84.92]	79.05 [74.26; 82.77]	67.61 [59.77; 73.73]
Means	40.83 ± 3.25	0.60 ± 0.04	1.26 ± 0.14	157.94 ± 2.68	81.02 ± 1.91	5.79 ± 0.12
Range	14.70 - 68.43	0.37 - 0.87	0.67 - 2.36	130.23 - 181.54	62.50 - 98.08	5.00 - 6.67

^a Exact 95% confidence intervals between brackets; ^b Variances multiplied by 10³.

Table 2. Estimates of genetic (above diagonal) and phenotypic (below diagonal) correlations between several traits.

Traits	Grain yield	Ears per plant ^a	Plant height	Ear height	Plant lodging	Number of leaves
Grain yield		0.82 ⁺⁺	0.62 ⁺⁺	0.55 ⁺⁺	-0.57 ⁺⁺	0.11
Ears per plant ^a	0.83 ^{**}		0.30	0.56 ⁺⁺	-0.52 ⁺⁺	-0.03
Plant height	0.67 ^{**}	0.33		0.85 ⁺⁺	-0.58 ⁺⁺	0.43 ⁺
Ear height	0.57 ^{**}	0.45 [*]	0.88 ^{**}		-0.64 ⁺⁺	-0.10
Plant lodging	-0.60 ^{**}	-0.60 ^{**}	-0.59 ^{**}	-0.62 ^{**}		-0.32
Number of leave	0.15	-0.10	0.42 [*]	0.12	-0.19	

^a Refers to the average production of ears per plant; ^{***} Phenotypic correlation was significant at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively; ^{+,++} Genetic correlation exceeded one and two times its standard error, respectively.

Table 3. Genomic positions, LR values, gene actions and average levels of dominance (ALD), and coefficients of determination (R^2) for the QTL mapped for grain yield and ears per plant evaluated in five environments (A, B, C, D, and E).

QTL ^a	QTL position			LR ^b							Genetic effect ^c		Gene action ^d		Direction ^e	R ² (%)
	Bin	cM	Marker Interval	A	B	C	D	E	JOIN _T	QTLXE	Additive	Dominance	Idi/la _I	Type		
Grain yield																
<i>qgy1a</i>	1.05 - 1.06	148	umc2025 - bnlg2057	4.2	3.3	2.5	<u>6.6</u>	0.3	<u>23.30</u>	<u>22.20</u>	-1.71	1.70	0.99	D	L-20-01F	3.38
<i>qgy1b</i>	1.08 - 1.09/1.10	213	dupssr12 - bnlg1720	4.3	<u>18.0</u>	1.2	<u>11.0</u>	2.2	<u>28.69</u>	<u>23.55</u>	-1.37	0.03	0.02	A	L-20-01F	1.58
<i>qgy1c</i>	1.10 - 1.11	263	umc1737 - umc1630	0.8	0.9	<u>19.5</u>	1.1	1.6	<u>27.39</u>	17.41	2.13	-0.50	0.24	PD	L-02-03D	3.92
<i>qgy2</i>	2.02 - 2.03	85	bnlg125 - bnlg2248	<u>16.3</u>	5.5	<u>8.4</u>	2.3	-0.1	<u>28.15</u>	<u>19.90</u>	0.51	3.34	6.50	OD	L-02-03D	4.66
<i>qgy3a</i>	3.04 - 3.05	46	umc1025 - phi053	1.6	2.3	4.1	<u>6.8</u>	<u>14.6</u>	<u>36.83</u>	<u>28.20</u>	2.24	0.40	0.18	A	L-02-03D	3.02
<i>qgy3b</i>	3.05	76	phi053 - phi073	<u>8.2</u>	1.1	2.0	5.0	<u>13.0</u>	<u>37.40</u>	<u>32.74</u>	1.54	-0.68	0.44	PD	L-02-03D	2.83
<i>qgy3c</i>	3.06 - 3.07	128	dupssr17 - umc1659	0.2	<u>6.8</u>	<u>10.7</u>	0.2	<u>7.2</u>	<u>23.36</u>	10.93	-2.24	0.51	0.23	PD	L-20-01F	4.35
<i>qgy3d</i>	3.07 - 3.08	137	umc1528 - bnlg1108	0.0	<u>9.9</u>	<u>6.6</u>	0.4	4.9	<u>23.53</u>	14.52	-2.06	1.17	0.57	PD	L-20-01F	4.07
<i>qgy4a</i>	4.10	246	umc1532 - umc1109	0.3	<u>6.3</u>	3.4	<u>20.6</u>	2.3	<u>28.85</u>	<u>23.13</u>	-1.52	-0.02	0.01	A	L-20-01F	1.02
<i>qgy4b</i>	4.10 - 4.11	265	umc1738 - bnlg1890	5.6	<u>6.4</u>	2.4	<u>21.6</u>	2.9	<u>29.76</u>	<u>23.24</u>	-1.55	0.01	0.01	A	L-20-01F	1.97
<i>qgy5a</i>	5.03 - 5.04	48	bnlg1700 - dupssr10	<u>11.0</u>	<u>14.5</u>	3.1	<u>12.0</u>	0.1	<u>29.01</u>	<u>23.43</u>	0.92	1.49	1.61	OD	L-02-03D	2.32
<i>qgy5b</i>	5.04	56	dupssr10 - bnlg1208	<u>6.5</u>	<u>13.2</u>	3.6	<u>14.7</u>	0.5	<u>27.35</u>	<u>21.79</u>	0.89	1.52	1.72	OD	L-02-03D	2.33
<i>qgy5c</i>	5.04 - 5.05	59	bnlg1208 - mmc282	4.0	<u>13.6</u>	4.2	<u>16.0</u>	1.0	<u>26.10</u>	<u>18.83</u>	0.88	1.81	2.05	OD	L-02-03D	2.88
<i>qgy5d</i>	5.07 - 5.08	121	bnlg2305 - umc1792	<u>13.6</u>	<u>13.6</u>	3.7	<u>10.0</u>	5.1	<u>25.50</u>	14.18	2.35	0.40	0.17	A	L-02-03D	3.92
<i>qgy6</i>	6.07	135	umc1248 - umc1653	1.2	<u>12.2</u>	0.7	2.0	0.3	<u>22.99</u>	<u>22.08</u>	-1.06	1.71	1.61	OD	L-20-01F	2.54
<i>qgy7</i>	7.02	41	phi034 - bnlg657	0.4	<u>15.2</u>	0.6	0.4	0.7	<u>29.02</u>	<u>26.56</u>	-1.08	-0.42	0.39	PD	L-20-01F	1.78
Ears per plant												ALD	1.26	OD	Total	36.28
<i>qep1</i>	1.10 - 1.11	264	umc1737 - umc1630	4.7	0.3	<u>11.5</u>	2.5	0.7	<u>23.6</u>	<u>23.30</u>	13.04	-25.27	1.94	OD	L-02-03D	7.55
<i>qep2a</i>	2.01 - 2.02	58	umc1227 - mmc111	2.6	<u>12.3</u>	0.5	<u>10.2</u>	<u>10.3</u>	<u>26.3</u>	10.85	-35.64	9.50	0.27	PD	L-20-01F	11.56
<i>qep2b</i>	2.02	72	mmc111 - bnlg125	<u>10.0</u>	5.0	3.3	1.8	2.1	<u>22.9</u>	<u>20.57</u>	-0.75	18.39	<u>24.5</u> ₂	OD	L-20-01F	1.34
<i>qep2c</i>	2.02 - 2.03	81	bnlg125 - bnlg2248	<u>11.4</u>	2.9	3.9	0.6	3.4	<u>23.3</u>	<u>21.47</u>	6.87	14.94	2.17	OD	L-02-03D	2.32
<i>qep5</i>	5.07 - 5.08	116	bnlg2305 - umc1792	<u>9.6</u>	<u>15.4</u>	2.1	<u>8.1</u>	1.3	<u>26.6</u>	16.61	24.86	2.12	0.09	A	L-02-03D	5.96
<i>qep6</i>	6.00	0	bnlg238 - bnlg1600	<u>11.9</u>	0.1	0.6	<u>8.7</u>	1.8	<u>24.6</u>	<u>19.62</u>	-16.83	-3.27	0.19	A	L-20-01F	3.02
<i>qep8a</i>	8.02 - 8.03	22	bnlg2235 - phi125	1.0	2.2	3.0	<u>19.5</u>	<u>6.1</u>	<u>30.2</u>	<u>20.26</u>	26.99	9.90	0.37	PD	L-02-03D	6.87
<i>qep8b</i>	8.07 - 8.08	95	umc1055 - bnlg1056	1.0	2.1	<u>10.5</u>	<u>8.5</u>	0.1	<u>28.6</u>	<u>27.53</u>	-1.29	-24.38	<u>18.9</u> ₀	OD	L-20-01F	2.48
												ALD	3.37	OD	Total	32.28

^a QTL names are indicated as *qgy* (QTL for grain yield) and as *qep* (QTL for ears per plant) followed by a number (chromosome number) and by a word (for more than one QTL on the same chromosome).

^b Underlined likelihood ratio (LR) numbers indicate significant values.

^c Values multiplied by 10^3 for ears per plant.

^d Gene action type see Material and Methods.

^e Direction indicates the parental lines which contributes for the increase the trait.

Table 4. Genomic positions, LR values, gene actions and average levels of dominance (ALD), and coefficients of determination (R^2) for the QTL mapped for plant lodging, plant height, and ear height evaluated in four environments (A, B, C, and D).

QTL ^a	QTL position			LR ^b						Genetic effect ^c		Gene action ^d		Direction ^e	R ² (%)	
	Bin	cM	Marker Interval	A	B	C	D	JOIN T	QTLXE	Additive	Dominance	d / a	Type			
Plant lodging																
<i>qpl1a</i>	1.06 - 1.07	177	umc1919 - bnlg615	1.4	<u>8.3</u>	0.6	<u>20.7</u>	<u>27.41</u>	15.53	-55.97	-148.98	2.66	OD	L-20-01F	22.34	
<i>qpl1b</i>	1.07	194	bnlg615 - umc1147	0.8	<u>14.3</u>	0.1	<u>23.9</u>	<u>31.79</u>	<u>22.44</u>	-64.23	-86.67	1.35	OD	L-20-01F	18.37	
<i>qpl1c</i>	1.08 - 1.09/1.10	213	dupssr12 - bnlgl720	1.1	<u>10.7</u>	2.3	<u>9.7</u>	<u>23.46</u>	<u>20.80</u>	-33.23	15.21	0.46	PD	L-20-01F	1.92	
<i>qpl4a</i>	4.05	124	nc005 - umc1088	1.5	<u>17.8</u>	<u>8.1</u>	3.8	<u>23.55</u>	14.84	66.89	-14.21	0.21	PD	L-02-03D	7.39	
<i>qpl4b</i>	4.10	252	umc1109 - umc1738	<u>10.1</u>	2.3	0.2	<u>8.1</u>	<u>20.81</u>	14.18	-40.82	53.80	1.32	OD	L-20-01F	4.94	
<i>qpl9</i>	9.02	47	bnlg1082 - bnlgl401	2.8	<u>7.1</u>	<u>7.9</u>	0.1	<u>20.91</u>	<u>18.93</u>	31.54	8.97	0.28	PD	L-02-03D	1.24	
												ALD	1.62	OD	Total	45.22
Plant height																
<i>qph1a</i>	1.02	54	bnlg1178 - bnlgl953	2.1	1.5	<u>7.8</u>	3.3	<u>23.16</u>	<u>19.65</u>	-1.22	-0.11	0.09	A	L-20-01F	2.07	
<i>qph1b</i>	1.02 - 1.03	71	bnlg1083 - bnlgl439	1.8	<u>11.8</u>	<u>19.1</u>	3.3	<u>27.02</u>	15.02	-1.70	2.16	1.27	OD	L-20-01F	4.45	
<i>qph3a</i>	3.05	85	phi053 - phi073	0.7	1.7	<u>10.6</u>	<u>8.5</u>	<u>23.05</u>	<u>18.58</u>	1.35	1.21	0.89	D	L-02-03D	3.89	
<i>qph3b</i>	3.06 - 3.07	128	dupssr17 - umc1659	5.8	<u>11.7</u>	<u>11.4</u>	<u>17.6</u>	<u>23.72</u>	9.89	-2.52	-0.97	0.39	PD	L-20-01F	6.03	
<i>qph4</i>	4.08	196	bnlg2162 - umc1086	<u>6.2</u>	5.5	2.4	<u>14.5</u>	<u>23.77</u>	<u>18.30</u>	1.02	1.82	1.79	OD	L-02-03D	2.84	
<i>qph5</i>	5.01 - 5.03	9	umc1365 - bnlgl660	<u>13.1</u>	0.4	5.8	-0.3	<u>21.22</u>	12.04	-1.92	3.34	1.74	OD	L-20-01F	6.89	
												ALD	1.09	D	Total	25.38
Ear height																
<i>qeh2a</i>	2.02	65	mmc111 - bnlgl125	<u>11.6</u>	5.6	<u>6.4</u>	<u>16.7</u>	<u>24.52</u>	10.75	-1.37	1.81	1.32	OD	L-20-01F	6.14	
<i>qeh2b</i>	2.07 - 2.08	161	bnlg1721 - bnlgl045	2.6	<u>13.1</u>	<u>6.3</u>	<u>7.5</u>	<u>26.24</u>	<u>22.17</u>	1.12	-0.89	0.79	PD	L-02-03D	3.36	
<i>qeh3a</i>	3.06 - 3.07	128	dupssr17 - umc1659	4.1	<u>16.8</u>	<u>18.5</u>	<u>14.1</u>	<u>27.31</u>	8.92	-1.99	-0.33	0.17	A	L-20-01F	7.47	
<i>qeh3b</i>	3.07 - 3.08	134	umc1528 - bnlgl1108	4.7	<u>14.5</u>	<u>14.1</u>	<u>12.0</u>	<u>21.09</u>	4.78	-2.03	-0.34	0.17	A	L-20-01F	8.02	
<i>qeh4</i>	4.10	254	umc1109 - umc1738	<u>6.6</u>	1.6	2.8	4.8	<u>24.24</u>	<u>21.28</u>	-0.71	-0.70	0.98	D	L-20-01F	1.47	
<i>qeh7</i>	7.02	51	phi034 - bnlgl657	<u>7.3</u>	4.5	3.4	0.8	<u>29.38</u>	<u>27.37</u>	0.30	0.98	3.21	OD	L-02-03D	1.02	
<i>qeh9a</i>	9.07	119	bnlg1525 - bnlgl128	3.7	<u>11.5</u>	<u>17.4</u>	<u>10.2</u>	<u>22.56</u>	8.46	2.07	0.59	0.29	PD	L-02-03D	8.92	
<i>qeh9b</i>	9.07	129	bnlg128 - bnlgl279	3.6	<u>11.3</u>	<u>13.4</u>	<u>11.8</u>	<u>21.69</u>	9.54	1.71	0.61	0.36	PD	L-02-03D	6.52	
<i>qeh10</i>	10.04	29	bnlg1526 - umc1827	4.4	3.2	<u>8.6</u>	5.5	<u>24.61</u>	<u>18.52</u>	1.18	-0.70	0.59	PD	L-02-03D	3.35	
												ALD	0.54	PD	Total	39.54

^a QTL names are indicated as *qpl* (QTL for plant lodging), *qph* (QTL for plant height), *qeh* (QTL for ear height) followed by a number (chromosome number) and by a word (for more than one QTL on the same chromosome).

^b Underlined likelihood ratio (LR) numbers indicate significant values.

^c Values multiplied by 10^3 for plant lodging.

^d Gene action type see Material and Methods.

^e Direction indicates the parental lines which contributes for the increase the trait.

5. Conclusões e Perspectivas

⇒ Ocorreu uma cobertura total de 79% no mapa genético obtido de uma população F_2 de milho tropical (*Zea mays* L.), utilizando 139 marcadores microssatélites.

⇒ A extensão total do mapa foi de 1.858,61 cM e intervalo médio de 13,47 cM que foi o menor intervalo médio encontrado na literatura.

⇒ Novas marcas devem ser adicionadas ao mapa genético, principalmente nas regiões cromossômicas 1, 4 e 7 que apresentaram grandes distâncias entre os marcadores microssatélites.

⇒ O método de mapeamento por intervalo em ambientes múltiplos foi eficiente para o mapeamento de QTL para os caracteres avaliados e para a detecção da interação QTL x A nas progênies do milho tropical nos diversos ambientes.

⇒ Novos QTL foram mapeados, no total foram dezesseis QTL para produção de grão, oito QTL para espiga por planta, seis QTL para acamamento, seis QTL para altura de plantas, nove QTL para altura de espiga e dois QTL para número de folhas acima da primeira espiga.

⇒ Os efeitos dos QTL para todos os caracteres variaram em magnitude e sinal, mostrando que os QTL individuais contribuem de forma diferenciada para as expressões destes caracteres.

⇒ Cinco dos seis caracteres avaliados apresentaram ação gênica total do tipo sobredominância, o que pode ser uma pseudo-dominância causada pelo conjunto muito ligados de QTL dominantes, conseqüência do alto desequilíbrio de ligação.

⇒ Os valores da variância fenotípica total (R^2) explicada pelos QTL para todos os caracteres avaliados foi no geral baixos, indicando uma falha do modelo de mapeamento para locos com pequenos efeitos.

⇒ Poucos QTL foram estáveis nos ambientes para todos os caracteres, mostrando uma significativa interação QTL X E.

⇒ O grande número de QTL que foram significativos com os ambientes impõe dificuldades adicionais para os programas de seleção assistida utilizando marcadores moleculares em regiões tropicais. Assim, os programas de melhoramento brasileiros em milho deverão ser desenvolvidos em regiões específicas de interesse.

⇒ A adição de novos marcadores moleculares nas regiões que apresentaram grandes distâncias no mapa genético aumentará o poder do mapeamento de QTL nestas regiões, tanto aumentando o número de QTL mapeados, quanto aumentando os valores dos R^2 totais.

6. Anexo

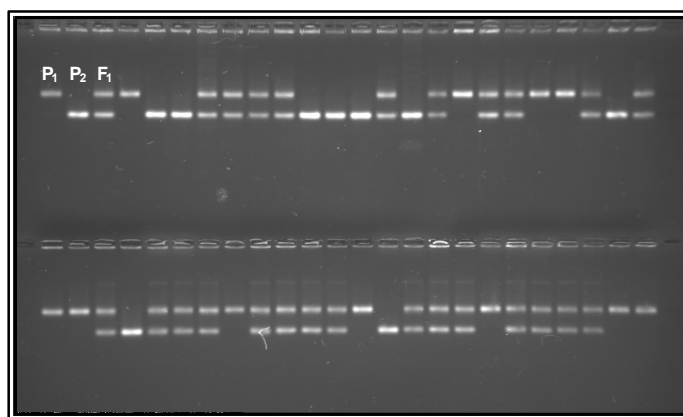


Figure 1A. Perfil do polimorfismo alélico da população F_2 sob mapeamento, utilizando o microssatélite (GGAGA)₆ denominado umc1069, localizado no braço longo do cromossomo 8. No gel os três primeiros correspondem, ao parental 1 (P_1), parental 2 (P_2) e a geração F_1 , em seguida 45 progênies F_2 . A eletroforese foi realizada em um gel de agarose de alta resolução (agarose/MetaPhor) a 4%, corado com brometo de etídio e digitalizada pelo equipamento GeneGenius (Syngene Ltda.).

Tabela 1A. Os 64 microssatélites selecionados e utilizados no mapa genético saturado, apresentados na ordem de sua localização no genoma do milho, denominação dos locos e o respectivo programa de amplificação.

N ^o .	Bin ^a .	Nome	Programa ^b .	N ^o .	Bin ^a .	Nome	Programa ^b .
1	1.01	umc1177	TA (55°C)	33	4.08	umc1086	TD
2	1.02	bnlg1007	TA (55°C)	34	4.09	umc1939	TA (55°C)
3	1.02	bnlg1178	TA (55°C)	35	4.10	umc1532	TD
4	1.03	bnlg1203	TA (52°C)	36	4.10	umc1738	TD
5	1.03	bnlg1953	TA (55°C)	37	5.02	bnlg105	TD
6	1.04	umc1558	TD	38	5.03	bnlg1879	TD
7	1.04	umc1917	TA (54°C)	39	5.03	bnlg1660	TA (55°C)
8	1.05	umc2025	TA (55°C)	40	5.04	bnlg1208	TA (55°C)
9	1.06	umc1919	TA (60°C)	41	5.07	umc2013	TA (55°C)
10	1.10	umc1737	TD	42	5.08	umc1792	TD
11	1.11	umc1630	TA (60°C)	43	6.00	bnlg1600	TA (57°C)
12	1.12	umc1797	TA (60°C)	44	6.04	mmc0523	TA (50°C)
13	2.01	umc1227	TA (55°C)	45	6.04	umc2006	TD
14	2.02	bnlg1017	TA (55°C)	46	6.06	umc1762	TD
15	2.03	mmc0111	TA (55°C)	47	6.07	umc1653	TA (60°C)
16	2.07	umc1560	TA (55°C)	48	7.01	umc1066	TD
17	2.07	umc1042	TA (50°C)	49	7.06	phi116	
18	2.07	umc1946	TA (55°C)	50	8.08	umc1069	TD
19	2.08	bnlg1329	TA (52°C)	51	9.01	bnlg1583	TD
20	2.08	bnlg1662	TA (52°C)	52	9.01	bnlg1810	TD
21	2.08	bnlg1721	TA (54°C)	53	9.01	umc1040	TA (55°C)
22	2.08	bnlg2077	TA (55°C)	54	9.02	umc1037	TA (55°C)
23	2.08	umc1516	TD	55	9.02	bnlg1401	TA (55°C)
24	3.04	bnlg1647	TD	56	9.02	bnlg1082	TD
25	3.04	bnlg1904	TD	57	9.07	bnlg1525	TA (55°C)
26	3.04	umc1025	TD	58	9.07	bnlg279	TA (55°C)
27	3.07	umc1528	TD	59	10.05	umc2043	TD
28	3.07	umc1659	TA (60°C)	60	10.05	umc1827	TA (55°C)
29	3.09	bnlg1496	TA (55°C)	61	10.07	umc1038	TA (55°C)
30	3.09	umc1052	TD	62	10.07	umc1569	TA (54°C)
31	3.09	umc1639	TD	63	10.07	umc2021	TA (55°C)
32	4.07	bnlg1189	TA (55°C)	64	10.06	umc1993	TD

^a. O genoma do milho foi dividido em 100 "bins", sendo que cada "bin" corresponde a uma região cromossômica (Gardiner *et al.* 1995).

^b. TA designa o programa de temperatura de anelamento específica, calculado pela fórmula de Marmur e Doty (1962), com as temperaturas de anelamento adotada entre parêntese. TD designa as modificações do programa "Touchdown PCR" (Don *et al.* 1991).

Tabela 2A: QTL mapeados para o caráter número de folhas acima da primeira espiga: posição genômicas, valores de LR, tipo de ação gênica, grau médio de dominância, e coeficiente de determinação (R^2).

QTL ^a	Intervalo entre marcas	Posição ^b (cM)	LR (QTLXA)	Efeito Genético ^c		Ação Gênica ^d		Direção ^e	R^2 (%)
				Aditivo	Dominante	d / a	Tipo		
<i>qIn1a</i>	bnlg1007 - bnlg1083	71	<u>22,65</u>	-0,62	2,21	0,28	SD	L-20-01	14,36
<i>qIn1b</i>	umc1737 - umc1630	269	<u>19,92</u>	1,05	1,46	0,72	SD	L-02-03	11,02
						GMD	SD	Total	25,38

^a Os QTL estão indicados pelas iniciais do nome do caráter em inglês (ex. *In, leaves number*), seguidos por um número (número do cromossomo) e por uma letra (para mais de um QTL no mesmo cromossomo).

^b Valores significativos de LR estão sublinhados.

^c Valores foram multiplicados por 10.

^d Tipo de ação gênica seguiu o descrito em Material e Métodos (Capítulo II).

^e Direção da linhagem parental que contribui para o aumento do caráter.

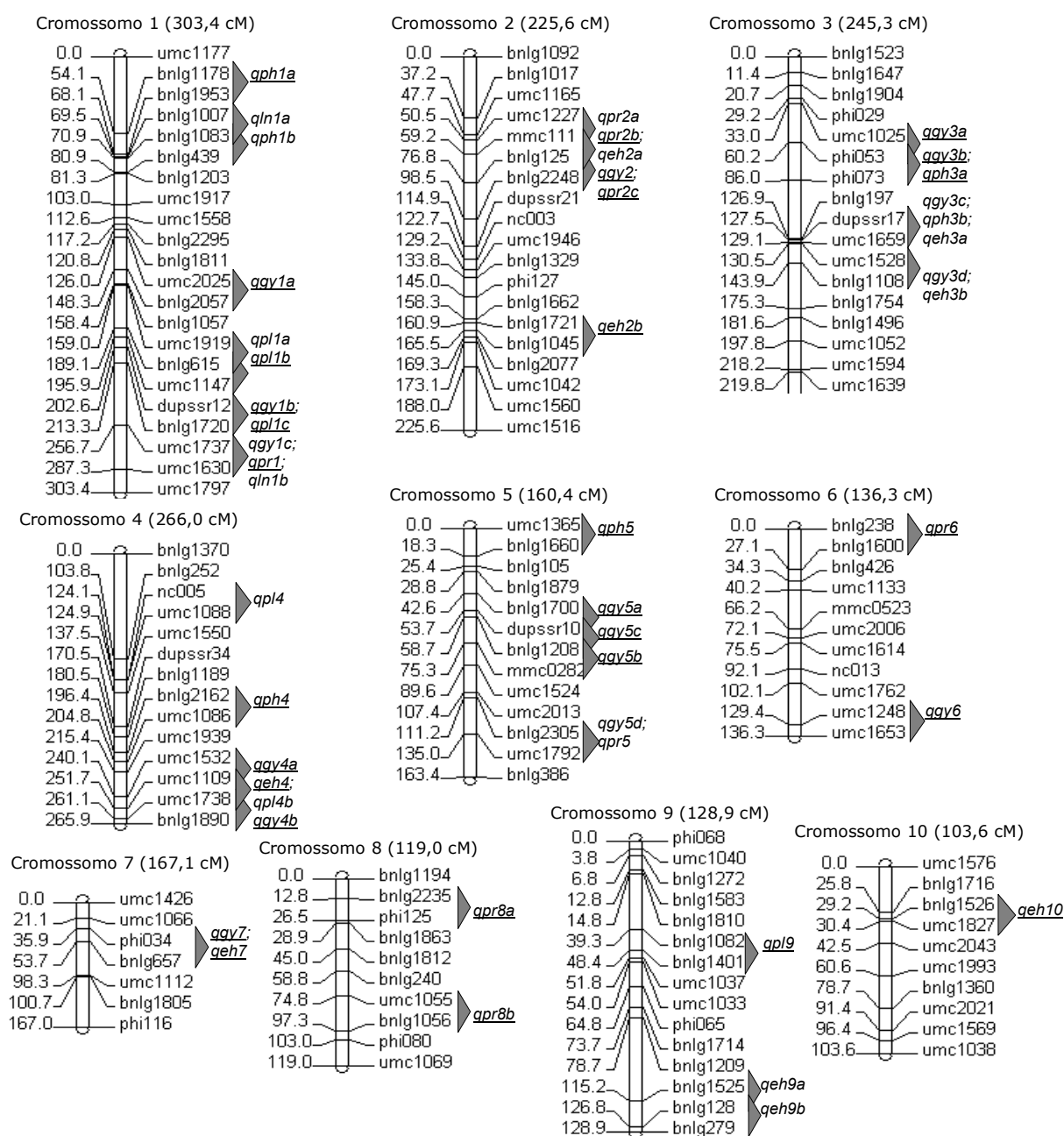


Figura 2A. Mapa genético dos 10 cromossomos da população F_2 de milho tropical derivada das linhagens L-02-03D e L-20-01F, construído com 139 marcadores microsatélites. Os nomes de cada marcador estão identificados do lado direito de cada cromossomo e do lado esquerdo estão suas distâncias em *centimorgans* (cM). A extensão total do mapa é de 1.858,61 cM com intervalo médio de 13,47 cM entre marcadores. As posições dos 47 QTL mapeados estão indicadas pelos triângulos. Cada QTL foi chamado pelas iniciais do nome do caráter em inglês (ex. *gy*, *grain yield*), seguido por um número (número do cromossomo) e por uma letra (para mais de um QTL no mesmo cromossomo).

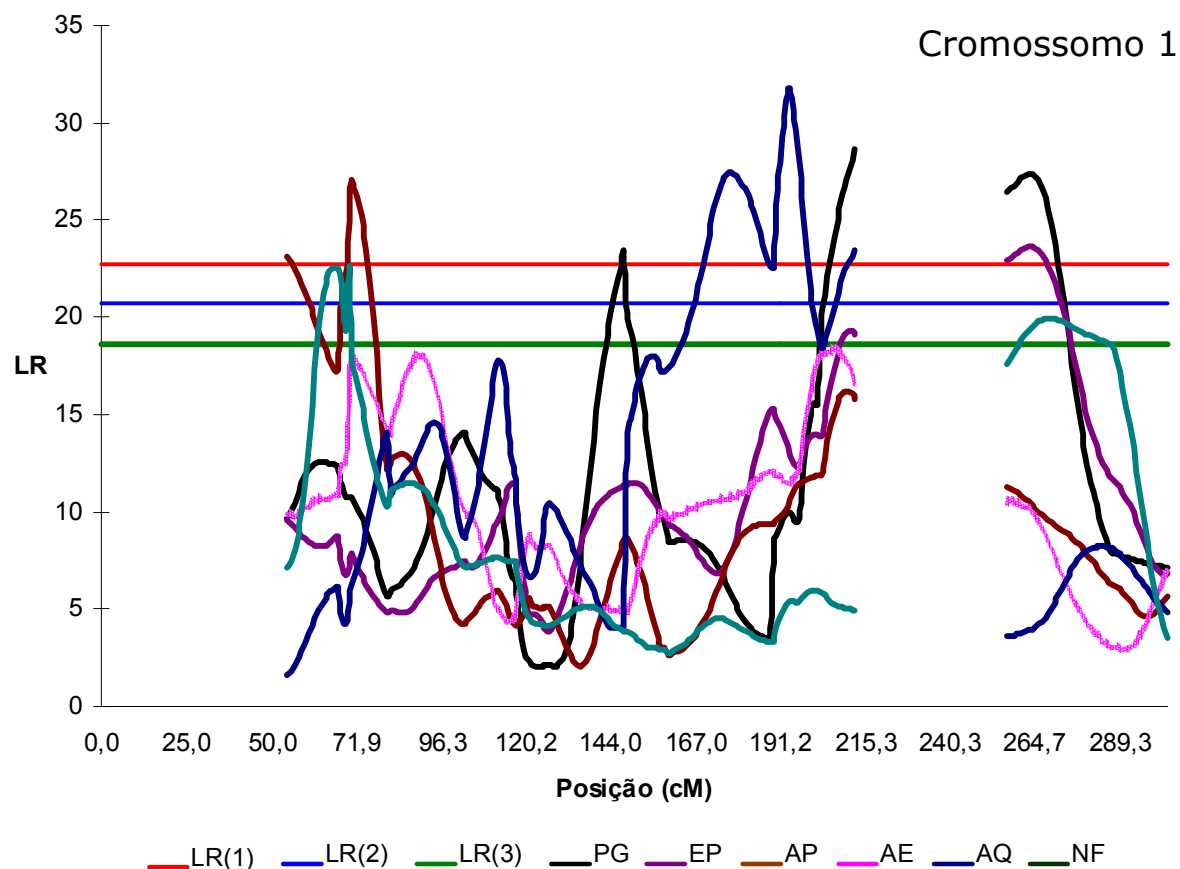


Figura 3A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 1 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

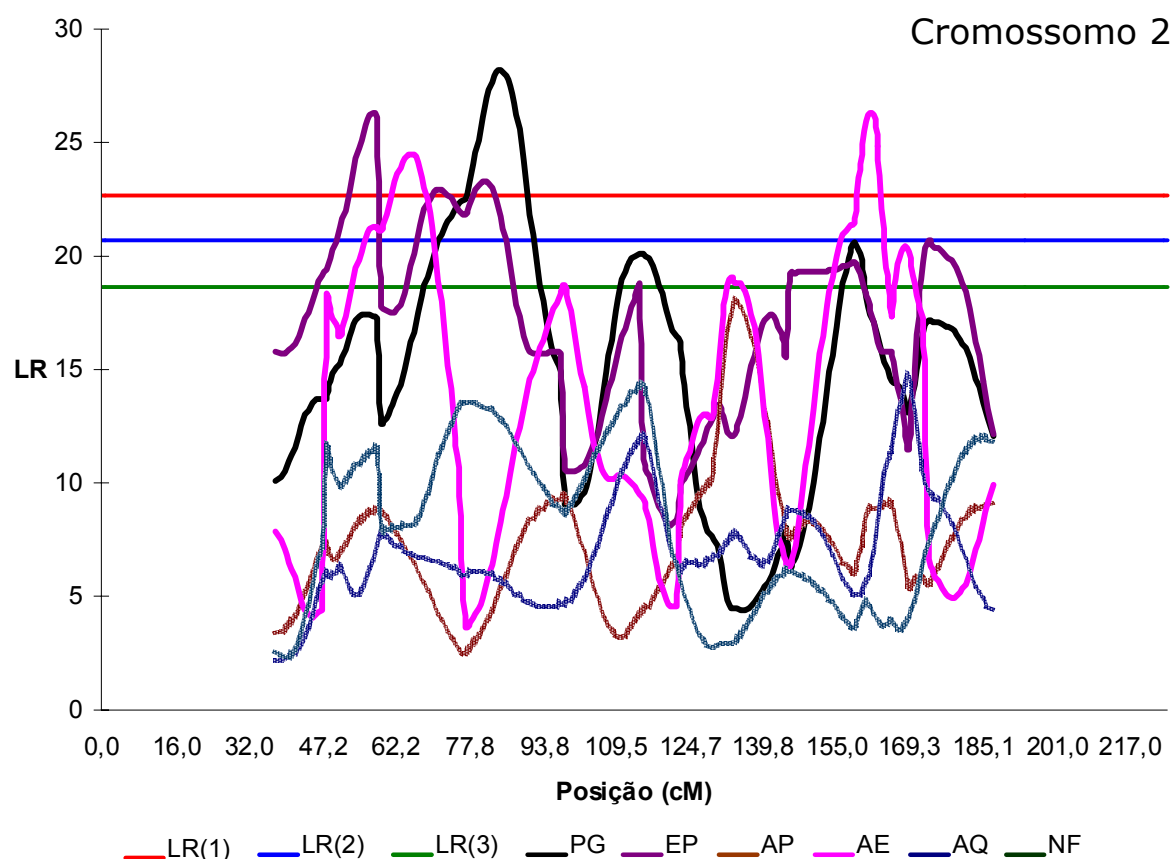


Figura 4A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 2 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

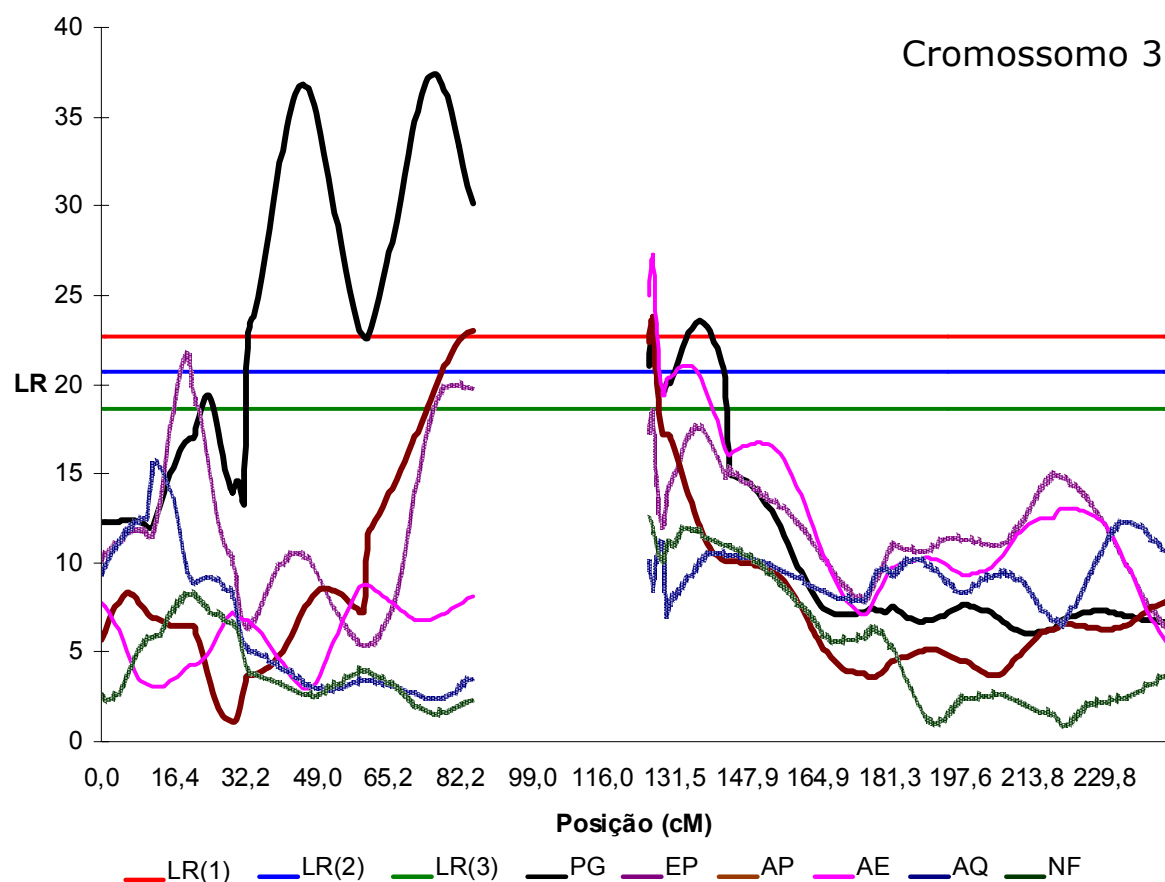


Figura 5A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 3 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

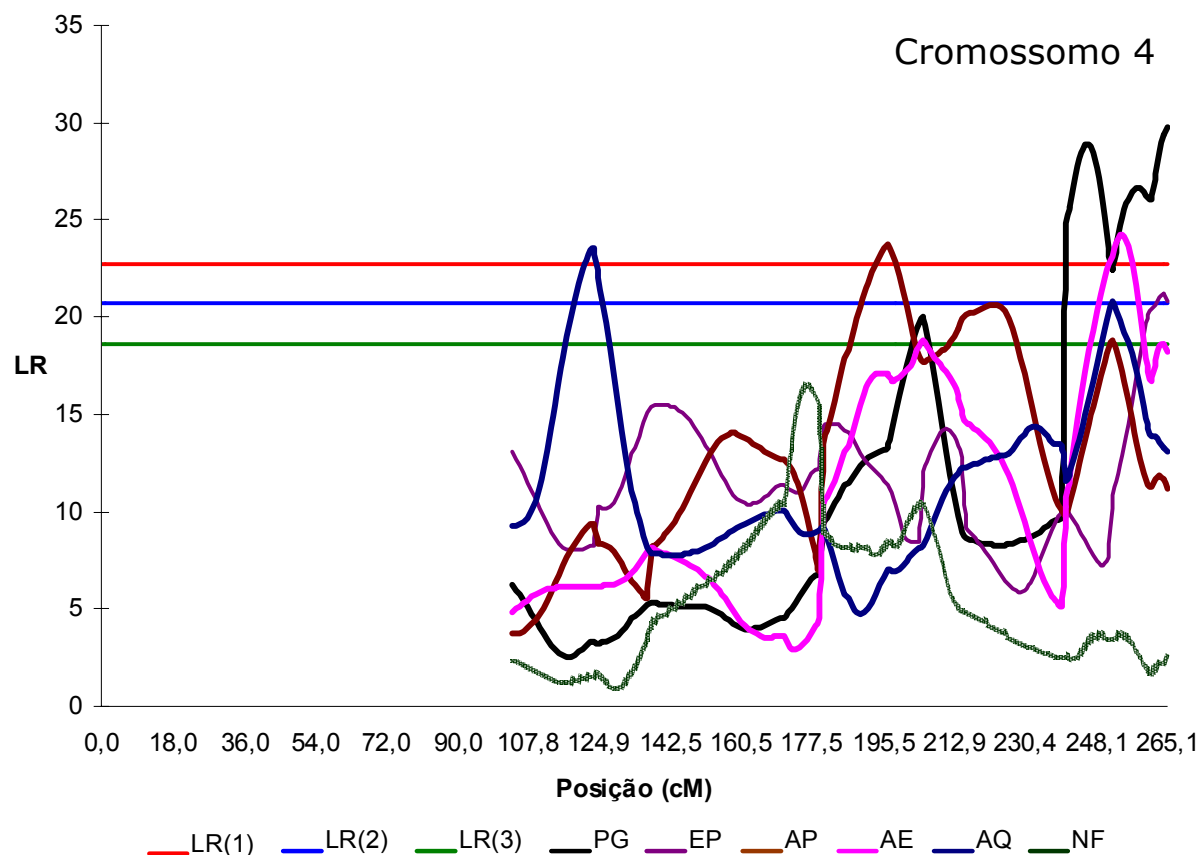


Figura 6A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 4 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

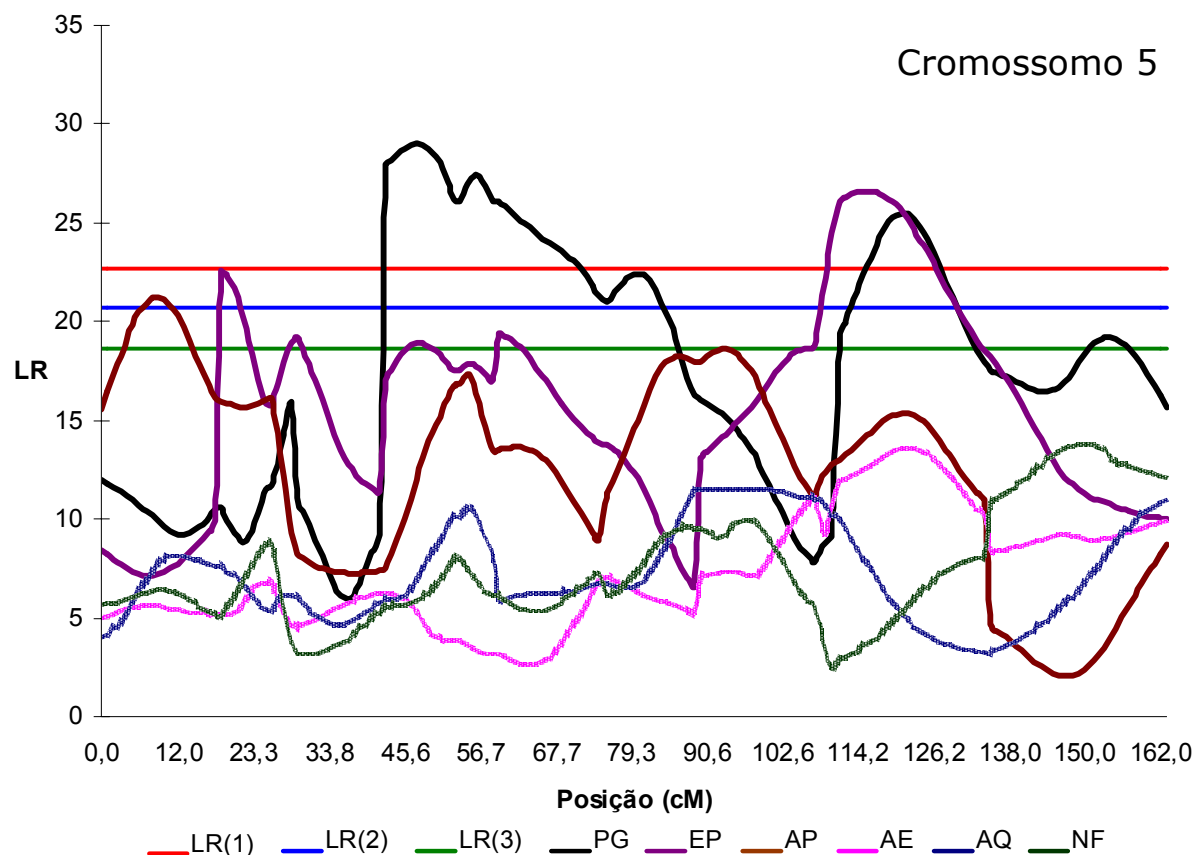


Figura 7A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 5 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

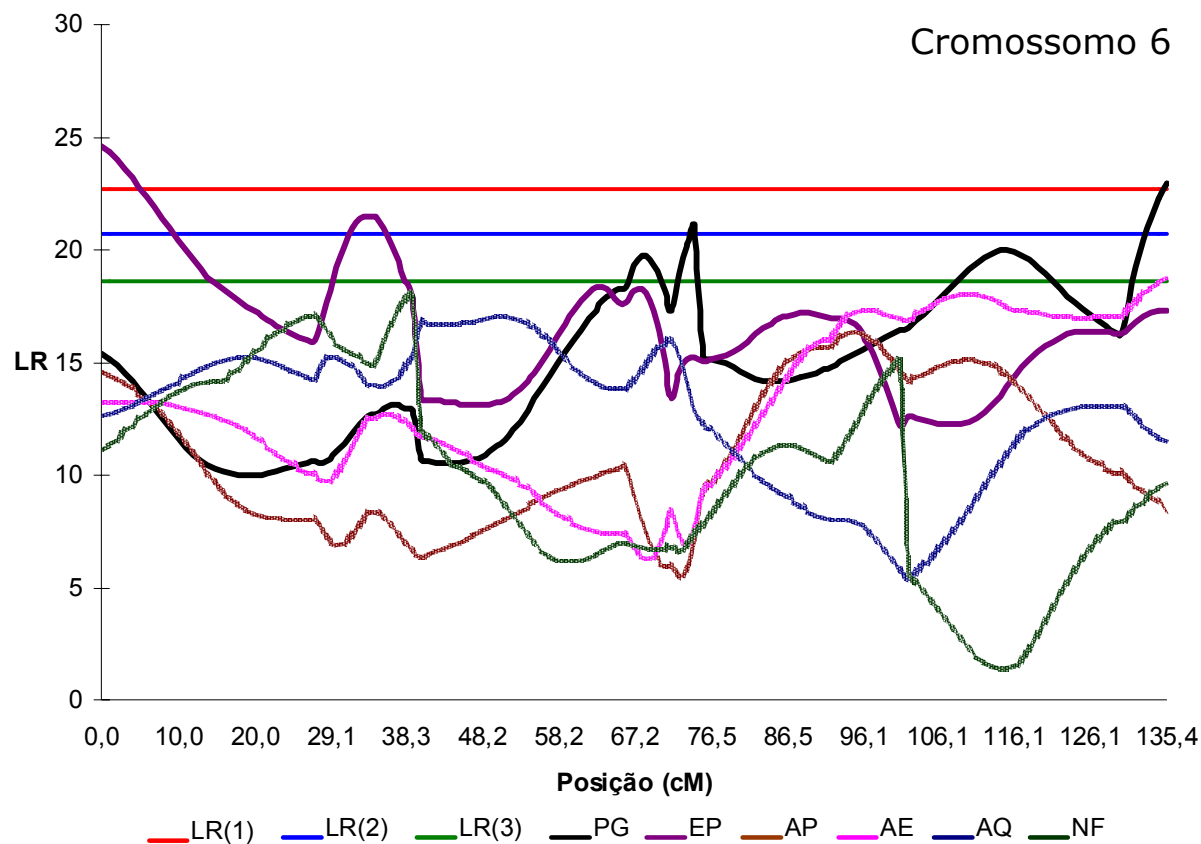


Figura 8A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 6 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

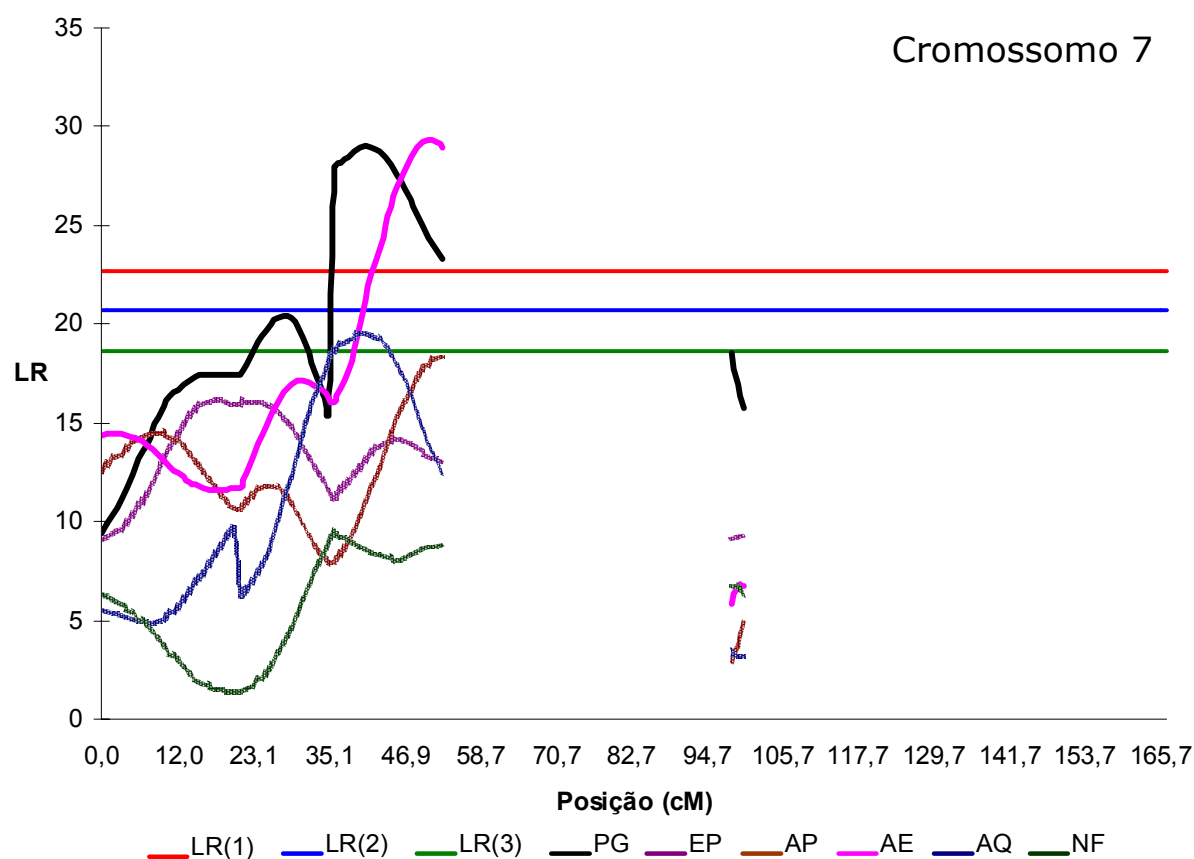


Figura 9A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 7 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

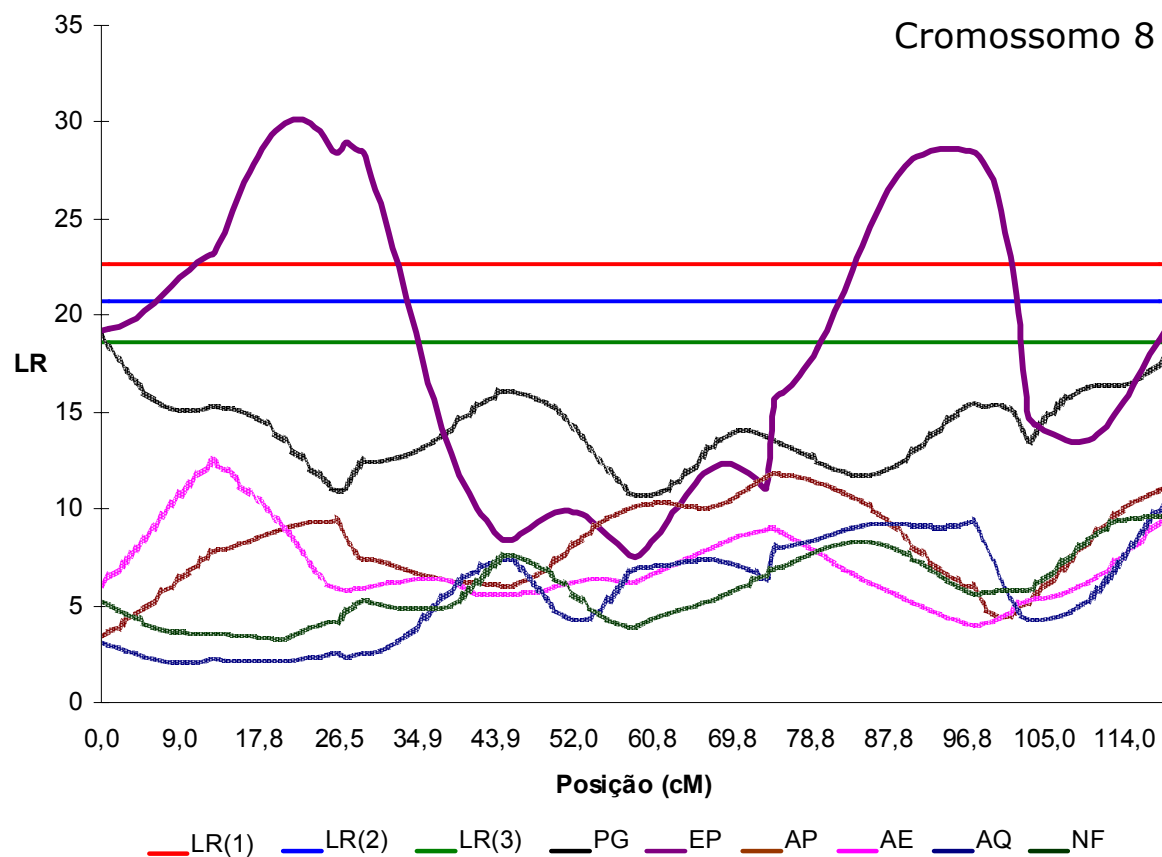


Figura 10A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 8 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

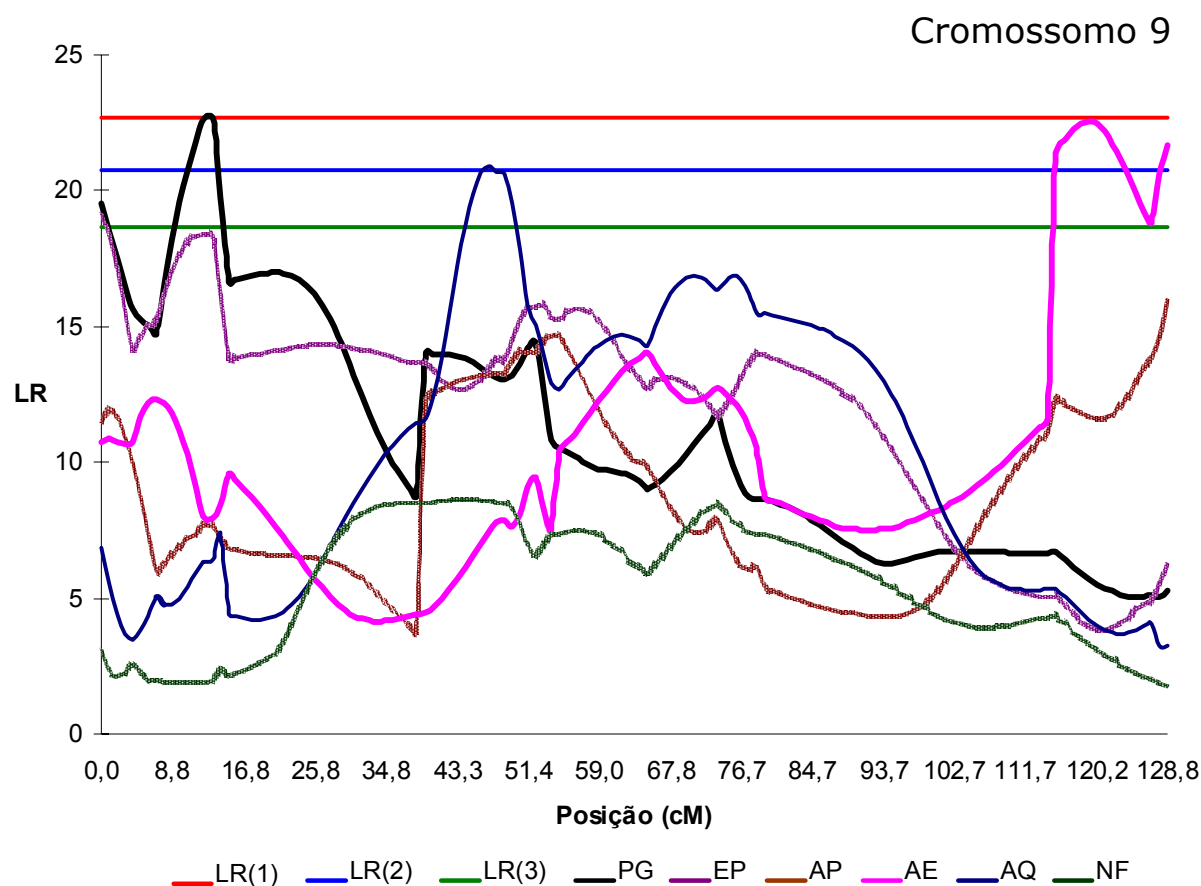


Figura 11A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 9 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.

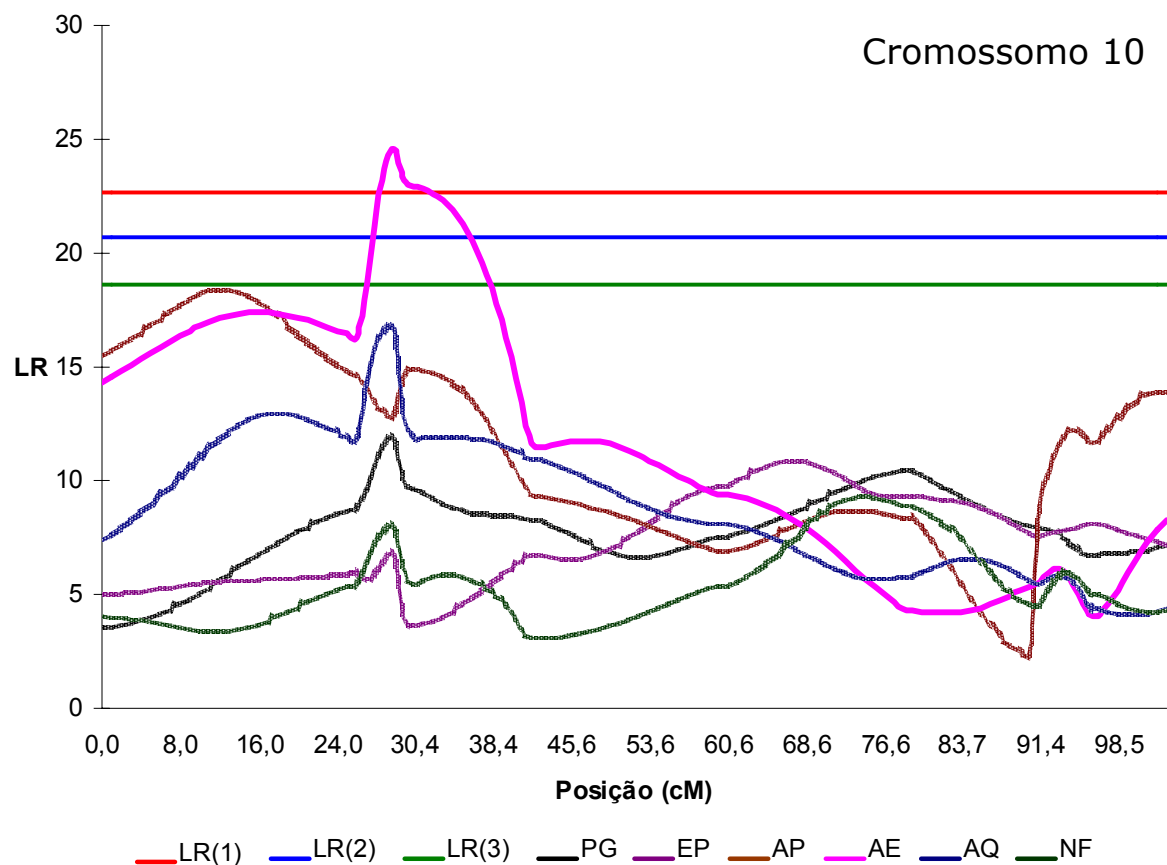


Figura 12A. Gráfico da distribuição dos valores do teste da razão de verossimilhança (LR) indicando as localizações dos QTL no cromossomo 10 do milho para os caracteres produção de grãos (PG), espiga por planta (EP), altura de planta (AP), altura de espiga (AE), acamamento (AQ) e número de folhas acima da primeira espiga (NF). Os valores dos limites críticos de significância para o mapeamento dos QTL estão indicados pelas linhas LR(1)=22,68 para os caracteres produção de grãos e espiga por planta avaliados em cinco ambientes, LR(2)=20,73 para os caracteres altura de planta, altura de espiga e acamamento avaliados em quatro ambientes e LR(3)=18,68 para o caráter número de folhas acima da primeira espiga avaliado em três ambientes.