

MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Puccinia polysora* Underw EM MILHO (*Zea Mays*)

KÁTIA REGIANE BRUNELLI

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro – 2000

Errata

| Página | Onde se lê | Leia-se |
|--------|----------------------------|----------------------|
| 21 | ...estádio fenológico 5... | estádio fenológico 6 |
| 21 | ...estádio fenológico 4... | estádio fenológico 5 |
| 30 | ...estádio fenológico 5... | estádio fenológico 6 |
| 31 | ...estádio fenológico 5... | estádio fenológico 6 |

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Brunelli, Kátia Regiane

Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* Underw em milho (*Zea mays*) / Kátia Regiane Brunelli. - - Piracicaba, 2000.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Ferrugem-do-milho 2. Fungo fitopatogênico 3. Gene marcador 4. Marcador genético 5. Melhoramento genético vegetal 6. Milho híbrido 7. Resistência à doença l.
Título

CDD 633.15

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Manoel e Geni,

ofereço

AGRADECIMENTOS

- À minha família pelo constante amor, incentivo e dedicação.
- Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação e apoio durante os anos de estágio e Mestrado.
- Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos valiosos ensinamentos.
- Ao Eng. Agrônomo (MS) Herberto Pereira da Silva pelo fornecimento do material vegetal e pelo precioso auxílio na condução da etapa experimental.
- À querida amiga Regina Melo Sartori Coelho Morello pelos incentivos e pela carinhosa amizade.
- Ao amigo Jorge Gioco pelo auxílio na elaboração do summary.
- Aos amigos Rodrigo Matiello e Maria Tereza Gomes Lopes pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.
- Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e do curso de Pós-graduação em Fitopatologia, em especial a Adriane Wendland, Ricardo Gioria e Paulo Rogério Parente Dias pelos momentos agradáveis e inesquecíveis.

- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Jeferson, Marina, Pedro Artuso, Edivaldo, Fernanda e Rodolfo pela amizade e dedicação.
- À Gloriosa ESALQ pela eterna vocação em ensinar.
- A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida durante a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| LISTA DE TABELAS..... | ix |
| RESUMO..... | xi |
| SUMMARY..... | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO LITERÁRIA..... | 5 |
| 2.1 Produção de milho no Brasil..... | 5 |
| 2.2 Patossistema milho/ <i>Puccinia polysora</i> Underw | 6 |
| 2.2.1 Distribuição geográfica e importância..... | 6 |
| 2.2.2 Etiologia, sintomatologia e epidemiologia..... | 7 |
| 2.2.3 Resistência genética..... | 9 |
| 2.3 Marcadores moleculares microssatélites..... | 12 |
| 2.4 Estratégia da análise de segregantes agrupados (ASA) | 14 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 Material vegetal..... | 18 |
| 3.2. Ensaio em campo..... | 19 |
| 3.2.1 Avaliação da doença..... | 21 |
| 3.3 Efeito fenotípico da associação marcador/QRL nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesão | 22 |
| 3.3.1 Inoculação do patógeno..... | 22 |
| 3.3.2 Avaliação das variáveis monocíclicas tamanho e número de lesões | 23 |
| 3.4 Genotipagem com marcadores microssatélites..... | 23 |
| 3.4.1 Extração de DNA vegetal..... | 23 |
| 3.4.2 Análise dos segregantes agrupados | 25 |
| 3.4.3 Genotipagem de plantas F ₂ com marcadores candidatos | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.4.4 Genotipagem dos indivíduos do estudo de casa de vegetação..... | 27 |
| 3.5 Análises estatísticas..... | 28 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 4.1 Ensaio em campo..... | 29 |
| 4.1.1 Primeiro ensaio (safra 97/98)..... | 29 |
| 4.1.2 Segundo ensaio (safra 98/99)..... | 31 |
| 4.2 Análise dos segregantes agrupados | 34 |
| 4.3 Ligação entre locos marcadores e o QRL | 38 |
| 4.4 Efeito fenotípico da associação marcador/QRL nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesão | 45 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 50 |
| ANEXOS..... | 51 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| 1 Distribuição fenotípica de notas de severidade de ferrugem de polissora na população F_2 no estágio fenológico 5, aproximadamente 80 dias após o plantio. Z-95, F_1 e Z-93 representam as médias obtidas destes tratamentos. BR e BS representam as plantas selecionadas para composição dos segregantes agrupados de resistência (BR) e de suscetibilidade (BS) | 30 |
| 2 Distribuição das plantas da população F_2 em oito classes fenotípicas baseando-se na severidade à ferrugem polissora aos 71 (a), 81 (b) e 92 (c) dias após o plantio. Z-95, F_1 e Z-93 representam as médias destes tratamentos..... | 33 |
| 3 Exemplo de marcadores microssatélites (1) não informativo – <i>Bngl</i> 180, (2) informativo, mas não ligado – <i>Bngl</i> 278 (não há polimorfismo entre os agrupamentos, embora haja entre linhagens genitoras) e (3) informativo potencialmente ligado ao QRL de interesse – <i>Bngl</i> 589 (polimorfismo entre linhagens genitoras e entre agrupamentos). PR representa o genitor resistente, PS o genitor suscetível, H o híbrido, BR o agrupamento de plantas resistentes e BS o agrupamento de plantas suscetíveis..... | 37 |
| 4 Padrão de bandeamento para o “primer” <i>Phi</i> 65 em 54 indivíduos extremos para o fenótipo resistência..... | 42 |

| | | |
|---|--|----|
| 5 | Distribuição de plantas da população F_2 para as variáveis número de lesões/folha (a) e média do comprimento de 10 lesões/folha (mm) (b) | 46 |
| 6 | Genótipo de 52 plantas F_2 para o marcador <i>Phi</i> 65. Pr representa o alelo do pai resistente, Ps o alelo do pai suscetível e H o híbrido. Na primeira canaleta da esquerda está o marcador molecular "ladder" 100pb | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|--|---------|
| 1 Severidade média de ataque de <i>Puccinia polysora</i> nas linhagens Z-93, Z-95 e híbrido (Z-95 X Z-93) no experimento de 1998 | 30 |
| 2 Plantas F ₂ utilizadas para composição dos segregantes agrupados (extremos de resistência e suscetibilidade) | 31 |
| 3 Severidade média da ferrugem polissora nas linhagens genitoras Z-95 e Z-93, no híbrido (Z-95 X Z-93) e na geração F ₂ em três avaliações (71, 81 e 92 dias após o plantio) | 32 |
| 4 Número de locos microssatélites informativos, não informativos e informativos possivelmente ligados a genes de resistência a <i>Puccinia polysora</i> em milho, segundo sua localização cromossômica | 36 |
| 5 Locos microssatélites utilizados na genotipagem da população extrema | 40 |
| 6 Locos microssatélites associados a resistência a ferrugem polissora | 42 |
| 7 Média das linhagens Z-95 e Z-93 e do híbrido (Z-95 X Z-93) para as variáveis número total de pústulas e comprimento de 10 lesões por folha | 46 |

| | | |
|---|---|----|
| 8 | Número médio de lesões por folha das classes genotípicas para o loco marcador <i>Phi 65</i> | 49 |
|---|---|----|

MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Puccinia polysora* Underw EM MILHO (*Zea mays*)

Autora: Kátia Regiane Brunelli

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

RESUMO

A identificação e localização de marcadores moleculares ligados a genes de interesse pode agilizar o programa de melhoramento de vegetais. Na cultura do milho, vários esforços têm sido realizados para tal finalidade. Este trabalho objetivou identificar marcadores microssatélites ligados a genes que conferem resistência a ferrugem polissora, causada por *Puccinia polysora*, e verificar o efeito fenotípico destes nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesão. Foram utilizadas duas linhagens (Z-95 e Z-93) contrastantes em níveis de resistência à doença, o híbrido (Z-95 x Z-93) e uma população F₂ obtida da autofecundação do híbrido. Esses indivíduos foram fenotipados quanto a resistência à doença em dois ensaios a campo e genotipado em laboratório com 142 marcadores microssatélites. Para agilizar a genotipagem, o método de análise dos segregantes agrupados (ASA) foi utilizado (Michelmore et al., 1991). Marcadores potencialmente ligados identificados pelo método de ASA foram utilizados para genotipar 165 indivíduos segregantes e confirmar a existência de ligação. Dois marcadores, *Phi 65* e *Phi 28*, ambos no cromossomo 9, mostraram-se significativamente

associados ($p < 0,000001$ e $p < 0,000078$, respectivamente) a um QRL (locos de resistência quantitativa) a *P. polysora*. A associação entre QRL e marcadores explicou 12,9% (*Phi* 65) e 5,10% (*Phi* 28) do fenótipo resistência. Em um terceiro ensaio em casa de vegetação, 94 plantas foram inoculadas com suspensão de uredósporos e avaliadas quinze dias após a inoculação quanto ao número total de pústulas e o comprimento de 10 lesões. Estas plantas foram genotipadas com os marcadores *Phi* 65 e *Phi* 28. Somente o marcador *Phi* 65 mostrou-se significativamente associado ($P < 0,000032$) a redução no número total de pústulas. Por outro lado, nenhum marcador mostrou associação significativa com a variável comprimento de lesão. Por estarem ligados ao mesmo marcador, sugere-se que o QRL identificado no ensaio a campo seja o mesmo identificado em casa de vegetação.

MAPPING OF RESISTANCE GENES TO *Puccinia polysora* IN MAIZE

Author: Kátia Regiane Brunelli

Adviser: Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

SUMMARY

The objectives of this study were to identify microsatellite markers linked to resistance genes to *Puccinia polysora* and estimate the phenotypic effect of these genes on the monocyclic variables lesion number and length. Two inbred lines with different degrees of resistance (Z-95 and Z-93), the hybrid (Z-95 X Z-93) and F₂ plants derived by selfing this hybrid were phenotyped for disease resistance in two field trials and genotyped for 142 microsatellite markers using bulked segregant analysis (BSA). Molecular markers putatively linked to disease resistance genes identified by this method were employed to genotype 165 segregant individuals and to confirm linkage. Two markers, *Phi 65* and *Phi 28*, both located on chromosome nine, were significantly associated ($p < 0,000001$ and $p < 0,000078$) with a QRL (quantitative resistance loci) to *P. polysora*. The association explained 12,9 and 5,10% of the phenotypic variance in resistance. In a third trial performed in the greenhouse, 94 plants were inoculated with a uredospore suspension and evaluated 15 days after inoculation for the total number of lesions and length of 10 lesions. These plants were genotyped with

Phi 65 and *Phi 28*. Only *Phi 65* showed a significant association with number of lesions ($p < 0,000032$). No marker showed significant association with lesion length. It is suggested that the QRL identified in the field trials is the same identified in the greenhouse experiment, since they are linked to the same marker.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho apresenta grande importância sócio-econômica, não só pela grande área que ocupa, mas também por todo complexo industrial que gira em torno do seu cultivo. Neste último século, a cultura experimentou grandes avanços, dada a contínua preocupação dos melhoristas com ganhos de produtividade e adaptabilidade dos materiais (híbridos) aos mais variados climas e solos. Na atualidade, a resistência dos híbridos às doenças potencialmente importantes para cada região vem sendo alvo importante nos programas de melhoramento. Entre essas doenças, a ferrugem de polissora, causada pelo fungo *Puccinia polysora*, destaca-se como uma das doenças foliares mais importantes da cultura na região Centro-Sul do Brasil.

Essa enfermidade adquiriu maior impacto econômico após 1990, quando o plantio de segunda época, também chamado “milho safrinha”, tornou-se prática comum no Brasil. As perdas segundo alguns pesquisadores podem ser elevadas, chegando a causar reduções de até 45% (Rodrigues-Arnon et al., 1980) na produtividade de alguns híbridos suscetíveis. No Brasil, não se conhece hospedeiro alternativo do patógeno e os ciclos primário e secundário

da doença são unicamente dependentes de uredósporos abundantemente produzidos em lesões suscetíveis.

O controle químico na cultura não é prática comum entre os agricultores devido a seu custo excessivo. Essa prática só é adotada em campos de produção de sementes, onde o preço conseguido com o produto a justifica. Dessa forma, o emprego de materiais resistentes tem sido a maneira mais adequada de controle da enfermidade na cultura.

A maioria dos trabalhos visando obtenção de materiais resistentes a essa doença utilizam resistência do tipo monogênica. Coletivamente, tais genes recebem a denominação *Rpp* seguida de um número que indica a raça pelo qual o gene é efetivo (Ullstrup, 1977). Esses genes *Rpp* caracterizam-se por condicionarem uma reação semelhante à de hipersensibilidade. A especificidade deste genes, no entanto, constitui-se numa característica indesejável que limita o seu emprego em amplas áreas de cultivo, uma vez que exercem pressão de seleção sobre populações do patógeno que pode redundar num aumento na frequência de novas raças (Scott & Zummo, 1989). Assim, uma outra forma de resistência a *P. polysora*, denominada de resistência do tipo “slow rusting”, tem sido almejada nos programas de melhoramento. Ela tem essa denominação por retardar o progresso de epidemias de várias formas combinadas, como por exemplo, reduzindo o número e o tamanho de pústulas e aumentando o período latente do patógeno (Scott & Zummo, 1989). Bailey et al. (1987) encontraram genes associados a diminuição da densidade de pústulas de *P. polysora* e ao decréscimo da AUDPC (área abaixo da curva de

progresso da doença) em híbridos simples de milho, indicando a ação “slow rusting” destes genes. Holland et al. (1998), estudando duas populações de milho segregantes para *P. polysora*, também identificaram genes controlando o decréscimo do número de pústulas neste patossistema. Embora se saiba que existam híbridos com alto grau deste tipo de resistência, pouco se sabe sobre sua base genética. Uma característica comum a todos estes materiais, no entanto, é a natureza quantitativa do fenótipo resistência, isto é, existe uma variação contínua em graus de resistência. Tal observação pressupõe a existência de um controle oligo ou poligênico atuando nesses materiais (Holland et al. 1998, Lübberstedt et al., 1998).

A análise genética de características quantitativas é grandemente facilitada pelo uso de marcadores moleculares. Estes permitem individualizar cada oligogene (ou QTL - “quantitative trait loci”) e estudar seus efeitos fenotípicos sob diversas condições experimentais. Sob o ponto de vista do melhoramento genético visando a resistência a doenças, os melhores QTLs ou QRLs (“Quantitative resistance loci”- locos de resistência quantitativa) são aqueles que têm um efeito principal sobre a resistência, ou seja, aqueles que explicam grande parte da variação fenotípica em resistência. Além disto, é importante que estes QRLs apresentem pouca interação com o ambiente e com genótipos do patógeno. Desta forma, a utilização desses marcadores em estudos sobre a base genética da resistência quantitativa em milho a várias doenças, dentre elas a ferrugem polissora, tem se revelado muito promissora. Desse modo, este trabalho teve por objetivo identificar marcadores moleculares

ligados a genes de resistência a doença citada em uma população segregante (F_2) de milho, proveniente do cruzamento entre duas linhagens (Z-95 e Z-93) contrastantes em resistência a *P. polysora*, além de caracterizar fenotipicamente o efeito destes QRLs nas variáveis epidemiológicas número e tamanho de lesões.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Produção de milho no Brasil

O milho é uma das principais culturas do Brasil, com cerca de 13 milhões de ha plantados e mais de 33 milhões toneladas colhidas na safra 97/98. Nota-se um grande aumento na produção do cereal comparada à safra 85/86, quando o volume de produção ficou na casa das 24 mil toneladas (Fonte: FAO - <http://apps.fao.org>). Esse incremento deve-se a vários fatores que aconteceram concomitantemente. Entre eles estão o aumento de área plantada com a cultura, que expandiu-se para a região Centro-Oeste, a utilização de híbridos mais produtivos, melhor manejo da cultura e a realização de plantios adicionais em épocas não convencionais de cultivo. Os plantios fora de época, ou “safrinha”, vêm adquirindo importância no volume total de produção desse cereal e, em 1997, já representava cerca de 12% da produção nacional de milho (Fernandes & Oliveira, 1997).

Com esse plantio adicional, a cultura do milho é cultivada durante todo o ano. Com isso, doenças que até então não causavam preocupações tiveram

seu inóculo aumentado e atingiram níveis epidêmicos preocupantes (Pereira, 1995).

2.2 Patossistema milho/*Puccinia polysora* Underw

2.2.1 Distribuição geográfica e importância

A ferrugem polissora, causada pelo fungo *Puccinia polysora* Underw, é uma das mais agressivas doenças da cultura do milho no Brasil. Foi relatada pela primeira vez em 1896 por Underwood em *Tripsacum dactyloides* L., (Underwood, 1897 citado por Hollier & King, 1985). Em 1949, relatos de literatura indicam que o patógeno estava restrito ao hemisfério ocidental. Neste mesmo ano, foi relatada a ocorrência do patógeno em Serra Leoa (África) (Raid et al., 1988). A partir daí a doença foi observada em muitas áreas tropicais (Rhind et al., 1952). No Brasil, ela tornou-se preocupante a partir da década de 90 graças às perdas geradas em híbridos suscetíveis, principalmente nos plantios tardios da região sul (Fernandes & Balmer, 1990).

A doença é favorecida por altitudes menores que 900m (Shurtleff, 1980), mas segundo Silva (1997), nas condições brasileiras, a doença tem sido mais problemática em altitudes inferiores a 700m em plantios tardios (novembro/dezembro), onde a condução da cultura só tem sido possível através da utilização de híbridos resistentes (Fernandes & Balmer, 1990). Perdas podem chegar a 45 - 50% (Rodrigues-Arnon et al., 1980) sob condições

favoráveis. Raid (1988) observou perdas que variaram entre 18 e 39% na Pennsylvania. No Brasil, perdas de 46% em materiais suscetíveis já foram relatadas (Von Pinho, 1999).

2.2.2 Etiologia, sintomatologia e epidemiologia

Puccinia polysora Underw pertence ao filo Basidiomycota, ordem Uredinales e família Pucciniaceae (Alexopoulos et al., 1996). Seus uredósporos são amarelo dourado com forma elipsoidal a ovóide e medem 20-29 x 29-40 μm . Já os teliósporos, produzidos em condições ambientais desfavoráveis, possuem parede pouco espessa e pedicelo curto (Shurtleff, 1980). Essa ferrugem se diferencia da ferrugem comum causada por *Puccinia sorghi* pela coloração castanha e tamanho mais elíptico de suas pústulas e estrutura de seus esporos (parede mais espessa e pedicelo mais comprido). As lesões ou pústulas são geralmente pequenas, circulares a elípticas, de coloração marrom a alaranjada, ocorrendo principalmente em folhas. Em ataques mais severos, o colmo e as brácteas que recobrem as espigas também podem apresentar os sintomas (Shurtleff, 1980). Em altas infestações, *P. polysora* pode matar a planta antes mesmo de sua maturidade fisiológica.

O ambiente é fator determinante na capacidade de infecção do patógeno. Hollier et al. (1985) demonstraram que esta capacidade está diretamente correlacionada com a germinação dos esporos. Temperaturas abaixo de 8°C

praticamente inviabilizam a germinação, independentemente da umidade relativa do ar. Temperaturas acima de 24°C com alta umidade relativa (próxima a 95%) também proporcionam um decréscimo significativo na germinação e infecção do patógeno (Hollier & King, 1985). Von Meyer (1963) descreve que o período latente de *P. polysora* é de 12-14 dias. Quando a infecção inicia-se na fase jovem da cultura é possível observar uma maior concentração de pústulas nas folhas baixas (Raid et al., 1988) e, se as condições forem favoráveis, as folhas superiores são rapidamente atacadas.

Em condições desfavoráveis ao desenvolvimento do ciclo secundário da doença, as pústulas esporulantes passam a produzir teliosporos (Krugner & Bacchi, 1995). Esse tipo de esporo não tem capacidade de infectar tecidos do milho e necessita de hospedeiros alternativos para a continuidade do ciclo. Robert (1962) cita *Euchlaena mexicana*, *Tripsacum dactyloides*, *T. loxum* e *Erianthus alopecuroides* como espécies alternativas para o patógeno, mas não há relatos da existência dessas espécies em território brasileiro.

A rápida disseminação da doença dá-se quase que exclusivamente pelo vento, através da dispersão de uredósporos produzidos abundantemente em lesões esporulantes. Esta facilidade no transporte de propágulos infectivos facilita a ocorrência de grandes pandemias. Em 1973, por exemplo, uma epidemia de *P. polysora* ocorrida no Sul dos EUA teve como inóculo primário uredósporos possivelmente trazidos pelo vento de plantações de milho do Caribe (Furtrell et al., 1975).

2.2.3 Resistência genética

Resistência à doenças resulta da interação de diversos fatores que vão desde o estado nutricional da planta, passando por condições climáticas, estresse hídrico e fatores genéticos. Estes últimos podem retardar ou impedir a penetração do patógeno no tecido hospedeiro, reduzir sua frequência de penetração, além de diminuir o número de esporos produzidos nas lesões esporulantes (Agrios, 1997). O tipo de infecção é governado pela interação entre genes de resistência do hospedeiro e genes de patogenicidade do patógeno (Hooker, 1967; Lewin, 1997).

No patossistema *Puccinia polysora*-milho já foram descritos vários monogenes de resistência. Storey et al. (1959) por exemplo, demonstraram a existência de 2 genes conferindo resistência as raças 1 e 2 do patógeno, os quais foram designados de *Rpp*₁ e *Rpp*₂. Ullstrup (1965) identificou um gene dominante designado de *Rpp*9 por conferir resistência a raça 9 do patógeno. Ao todo, este autor encontrou 11 monogenes designados *Rpp*1 a *Rpp*11 (Ullstrup, 1977). Outra descrição de um gene dominante conferindo resistência a essa mesma raça foi feita por Furtrell et. al. (1975). Ullstrup (1965) demonstrou que o gene *Rpp*9 está localizado no cromossomo 10, ligado a um outro gene dominante, *Rp*1, que confere resistência a ferrugem comum (*P. sorghi*). Nesta região cromossômica, na verdade, existe um complexo gênico denominado de *Rp* que consiste em seqüências duplicadas que correspondem a vários alelos

de resistência a *P. sorghi* (Scott & Zummo, 1989). Genes *Rpp* conferem resistência do tipo hipersensibilidade e podem ser efetivos na redução de epidemias, já que diminuem a produção do inóculo secundário (Storey, 1959). A limitação do seu uso está na possibilidade de haver seleção de outras raças virulentas, tornando o material novamente suscetível ao patógeno (Scott & Zummo, 1989). Onze raças fisiológicas do patógeno já foram descritas (Ullstrup, 1977), indicando a dificuldade de localizar um material com esse tipo de resistência a todas essas raças.

Outro tipo de resistência, chamada poligênica, oligogênica ou “slow-rusting”, tem como característica a redução da taxa da epidemia através da diminuição dos sítios de infecção, diminuição do tamanho das pústulas, diminuição da produção de uredósporos e extensão do período de latência. Isso faz com que a população do patógeno seja drasticamente reduzida, diminuindo a quantidade de inóculo e conseqüentemente da doença (Scott & Zummo, 1989; Luke et al., 1975; Holland, et al., 1998). Luke et al. (1975) demonstraram que essas características possuem alta herdabilidade (87%), indicando que a seleção pode ser efetiva. Esse tipo de resistência é controlada por genes de efeito menor que, se agregados, podem contribuir para um controle efetivo da moléstia.

Vários locos de resistência parcial (oligogênes) para esta doença já foram identificados e localizados. Holland et al. (1998), trabalhando com uma população F₃ segregante para resistência a ferrugem polissora, identificaram

um gene no braço curto do cromossomo 10 responsável por cerca de 83% da variação fenotípica. Numa segunda população encontraram duas regiões associadas a resistência nos cromossomos 3 e 4, explicando respectivamente 13 e 15% do fenótipo resistência. Baylei et al. (1987) identificaram resistência do tipo “slow-rusting” para *P. polysora* em híbridos simples de milho baseado na diminuição da densidade de pústulas por folha e no decréscimo da área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC). Zummo (1988) observou que número de pústulas esporulantes é um componente importante na resistência parcial porque diminui o número de uredósporos produzidos e liberados, influenciando sobremaneira no progresso da doença. Esses mesmos pesquisadores encontraram correlações altamente significativas entre experimentos realizados a campo e em casa de vegetação. Holland et al. (1998) também avaliaram a resistência à ferrugem contando número de pústulas em plantas jovens em casa de vegetação, obtendo resultados semelhantes àqueles observados em campo. Portanto, experimentos conduzidos em ambientes fechados, desde que simulando umidade e temperatura do campo, podem ser usados nos estudos desse tipo de resistência.

2.3 Marcadores moleculares microssatélites

Genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetitivas, denominadas microssatélites ou SSR. Essas pequenas seqüências são constituídas de 2 a 5 nucleotídeos, repetidas em tandem e flanqueadas por seqüências de DNA conservadas e não repetidas (Yu et al., 1994; Vogel, 1997). Freqüentemente essas seqüências variam quanto ao número de repetições, o que dá origem a polimorfismos de comprimento (Chin et al., 1996) que ao serem amplificados via PCR resultam em fragmentos de DNA com pesos moleculares diferentes que podem ser resolvidos em gel de agarose de alta resolução ou de poliacrilamida. A origem na variação do número de repetições pode estar associada a “crossing-over” desiguais ou a um mecanismo que ocorre durante a replicação do DNA. Esse mecanismo conhecido como “derrapamento” ou “pareamento desigual” é geralmente seguido de uma falha no sistema enzimático responsável pela reparação da seqüência original (Levinson & Gutman, 1987). Oliveira et al. (1996), estudando diversidade genética em sorgo, observaram que marcadores do tipo SSR são altamente informativos e que revelam alto grau de polimorfismo.

A distribuição de locos microssatélites pelo genoma é geralmente uniforme e abundante em eucariotos (Hearne et al., 1992; Gupta et. al., 1996). Em milho, a freqüência média é de um loco a cada 50 mil pares de base (Chin

et al., 1996; Morgante & Olivieri, 1993), o que torna essas seqüências passíveis de serem utilizadas como marcadores moleculares.

Os primeiros estudos envolvendo essa classe de marcadores genéticos ocorreram em seres humanos e em outros genomas de mamíferos. Aplicações desses marcadores moleculares em plantas constituem uma técnica relativamente recente. Nos últimos anos, a presença de locos microssatélites tem sido documentada em várias espécies de plantas, incluindo soja (Morgante & Olivieri, 1993; Rongwen et al., 1995), arroz (Wu & Tanksley, 1993), brassica (Lagercrantz et al., 1993), videira (Browers et. al., 1996), trigo e cevada (Saghai-Marrof et. al., 1994) e algumas espécies de árvores tropicais (Condit & Hubbell, 1991). Morgante & Olivieri (1993) e Akagi et al. (1997) descreveram o di-nucleotídeo AT como sendo o elemento mais comumente repetido em vegetais.

A técnica para detecção dessas regiões consiste em amplificar, via reações de PCR, as regiões microssatélites. Para tanto são utilizados pares de "primers" específicos (20-30 bases) complementares às seqüências únicas que as flanqueiam (Chin et al., 1996).

Locos SSR possuem geralmente expressão codominante. Esses locos têm se mostrado multialélicos numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Por isso são marcadores ideais para estudos envolvendo genética de populações, mapeamento e estimativa de variabilidade (Chin et al., 1996; Yu et al., 1994; Powell, et al. 1996).

2.4 Estratégia da análise de segregantes agrupados (ASA)

A genotipagem de uma população segregante com marcadores moleculares pode ser agilizada e facilitada quando a técnica de “bulked segregant analysis”, ou análise dos segregantes agrupados (ASA), é utilizada. Trata-se de uma estratégia molecular que identifica rapidamente regiões genômicas potencialmente associadas a caracteres de herança simples ou complexa. Esta técnica, proposta inicialmente por Arnheim et al. (1985) e modificada posteriormente por Michelmore et al. (1991), consiste em comparar duas amostras agrupadas de DNA obtidas a partir de indivíduos extremos de uma população segregante originária de um simples cruzamento. Esses agrupamentos devem conter quantidades iguais de DNA de indivíduos idênticos para dada característica (no caso deste trabalho, suscetíveis e resistentes para *P. polysora*) mas arbitrárias para regiões não ligadas à característica desejada (Staub et al., 1996). A evidência de ligação entre um dado marcador e o loco usado como referência na construção das amostras é fornecida pela presença de marcas polimórficas entre os dois agrupamentos de DNA. Qualquer loco marcador não ligado a característica desejada resulta em monomorfismo entre os agrupamentos, dada a frequência de recombinação dos indivíduos ser suficiente para aleatorizar esses marcadores em relação a região alvo.

Michelmore et al. (1991) defendem a aplicação do método por ele promover uma rápida saturação do genoma, sendo eficiente na localização de marcadores de interesse além de serem ideais para mapear regiões pouco

saturadas do genoma. Outra vantagem do método é proporcionar uma economia em reagentes, pois agrupa-se em apenas duas amostras de DNA os indivíduos utilizados no estudo. Kesseli et al. (1993) utilizaram com sucesso o método para identificar marcadores RAPD ligados a genes de resistência a *Plasmopara lactucae-radiciis* em alface. Para tanto, 300 marcadores foram utilizados e 4 deles mostraram-se ligados ao gene de interesse (*plr*). Timmerman-Vaughan et al. (1996) identificaram marcadores RAPD e RFLP ligados a QTLs que controlam peso de sementes em ervilha, utilizando a técnica ASA. Chagué et al. (1997) também utilizaram ASA para identificar 4 marcadores RAPD ligados a um QRL ao vírus TYLCV em tomate. Esse QRL, localizado no cromossomo 6, explicou 27,7% do fenótipo resistência. A técnica também vem sendo utilizada para identificar genes de resistência a pragas. Moreira et al. (1999) localizaram marcadores RAPD ligados a um QRL a *Liriomyza trifolii*, um inseto que ataca arroz. Utilizando 281 “primers” RAPD eles identificaram 30 locos polimórficos entre agrupamentos, sendo que 2 marcadores estavam ligados a um QRL que explicou 11,9% da resistência.

Essa técnica pode ser comparada com a técnica de linhagem quase-isogênicas (LQIs), isso porque o que diferencia os agrupamentos é a característica fenotipada (resistência/suscetibilidade, por exemplo) sendo as demais características não contrastantes entre as amostras. Uma falha da técnica, embora ocorra com menor intensidade que em LQIs, pode estar na ocorrência de falsos-positivos (marcadores aparentemente ligados). Isso pode ser rapidamente verificado testando-se estes marcadores em uma população

segregante, onde deve-se observar a co-segregação entre marcador/gene caso não sejam falsos-positivos. Esses falsos-positivos são mais freqüentes quando se usa uma pequena amostragem (menos de 10 plantas), onde os genótipos de umas poucas plantas podem não retratar o genótipo da população naquele loco (Michelmore et al., 1991).

Existem outras limitações da técnica que devem ser salientadas, tal como a limitada habilidade de identificar polimorfismos para marcadores localizados a uma distância maior que 30 cM. Portanto, marcas distantes não são detectadas (Michelmore et al., 1991). A análise planta a planta na população segregante também se faz necessária para verificar quanto do fenótipo é explicado pela associação gene/marcador. Portanto, ASA só permite localizar a região alvo, mas não indicar, por si só, o quanto esta região contribui para o fenótipo.

Outra técnica capaz de agilizar o mapeamento é a genotipagem de indivíduos extremos em uma população segregante. Esta técnica, ao contrário de ASA, preconiza a genotipagem de todos os indivíduos das classes extremas para a característica estudada. Lin & Ritland (1996) utilizaram a técnica de amostragem dos indivíduos extremos. No estudo, esses pesquisadores genotiparam 96 indivíduos extremos (48 de cada classe recessiva e dominante) de um total de 247, conseguindo detectar vários marcadores ligados a QTLs de interesse em flores do campo (*Mimulus spp*).

Mesmo sendo técnicas distintas elas podem ser usadas em conjunto para agilizar o mapeamento de genes de interesse. Zhang et al. (1994)

determinaram duas regiões cromossômicas contendo locos controladores de macho-esterilidade genética sensível a fotoperíodo em arroz, utilizando primeiramente ASA e posteriormente a genotipagem dos extremos da classe recessiva. Inicialmente eles utilizaram DNA agrupados (ASA) a partir de plantas extremas da geração F_2 , identificando segmentos cromossômicos portadores da esterilidade/fertilidade. Em seguida, os indivíduos extremos da classe recessiva foram genotipados, localizando assim os genes que controlavam tal característica. A utilização de indivíduos da classe recessiva na genotipagem é possível desde que esses sejam homozigotos recessivos para o locus de interesse, caso contrário os extremos de ambas as classes devem ser genotipados (Zhang et al., 1994). Estratégia semelhante foi utilizada por Ogliari (1999) para mapear um gene de resistência a *Exserohilum turcicum* em milho. Portanto, esta técnica associada a ASA propicia uma economia de tempo e reagentes e pode identificar e localizar QTLs de interesse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo pertence ao programa de melhoramento da Empresa Brasileira de Sementes (EBS) Ltda./Dow Agrosience e constou de 2 linhagens (Z-93 e Z-95) em avançado grau de endogamia, um híbrido e plantas de uma população F2 provenientes do cruzamento destas linhagens. Em ensaios realizados previamente, a linhagem Z-93 foi classificada como suscetível ao patógeno, enquanto Z-95 foi classificada como resistente a *P. polysora*. A linhagem Z-95 é uma linhagem precoce de grão duro laranja oriunda de um sintético constituído de linhas provenientes de materiais tropicais flints. A linhagem Z-93 é uma linhagem superprecoce de grão dentado e amarelo proveniente de materiais temperados derivados do sintético Iowa Stiff Stalk Synthetic formado a partir de 16 linhagens, sendo pelo menos sete derivadas da população Reid Yellow Dent, largamente utilizadas nos programas de melhoramento dos Estados Unidos,

Europa e Argentina. As demais gerações foram obtidas na própria estação no ano de 1997.

3.2 Ensaio em campo

Os ensaios foram conduzidos no campo da estação experimental da companhia EBS Ltda./Dow Agrosience, na cidade de Cravinhos (SP), no período de janeiro a maio de 1998 e janeiro a maio de 1999. A estação está localizada a uma altitude de 820 metros, com latitude 23°, no Nordeste do Estado de São Paulo. O regime de manejo adotado foi de plantio direto na palhada de aveia preta. Os experimentos receberam bordaduras com um híbrido altamente suscetível que foi plantado 30 dias antes da instalação do ensaio. Para garantir a presença do inóculo, foram realizadas inoculações nestas linhas de bordaduras com uredósporos provenientes de plantios infestados com a doença.

No primeiro experimento, realizado nos meses de janeiro a maio de 1998, a parcela experimental foi constituída de uma linha de cinco metros com cinco plantas/m para as linhagens Z-93, Z-95 e o híbrido (F_1), e quatro linhas, com a mesma dimensão, para a geração F_2 , sendo realizadas três repetições (totalizando 300 plantas F_2 e 75 para os demais tratamentos). Este primeiro experimento foi utilizado para seleção de plantas pertencentes aos extremos de resistência ou suscetibilidade que compuseram os agrupamentos no estudo de genotipagem.

No segundo experimento, implantado nos meses de janeiro a maio de 1999, a parcela experimental foi composta por uma repetição contendo uma linha de cinco metros com cinco plantas/m para cada linhagem e híbrido mais oito linhas, com as mesmas dimensões, para a população F₂. Este segundo experimento foi necessário para a confirmação da ligação entre QRL e os marcadores que se mostraram ligados no estudo com os agrupamentos. Essa nova população segregante permitiu verificar a co-segregação entre marcadores/genes, eliminando, desta forma, marcadores falso-positivos (marcador aparentemente ligado) segundo resultado do estudo dos segregantes agrupados, mas que não co-segregam com o gene de interesse. Esses falso-positivos podem aparecer quando a fenotipagem da população foi mal feita ou quando se utiliza uma pequena amostragem dos extremos, onde o genótipo de umas poucas plantas pode não retratar o estado genotípico da população naquele locus. Das 200 plantas que iniciaram os estudos, 165 foram utilizadas para a genotipagem. Em ambos experimentos, tratamentos receberam bordaduras de híbridos e linhagens para que não ocorresse competição entre os materiais nas parcelas.

As adubações foram de 400 Kg/ha do adubo 10-20-20 no plantio e 200 Kg/ha de uréia como cobertura aos 35 dias após o plantio. O controle de pragas foi realizado utilizando o produto lambda-cyhalothrina em aplicações semanais, entre o 10^o e 45^o dias após o plantio.

3.2.1 Avaliação da doença

No primeiro experimento, a severidade da doença foi avaliada no estágio fenológico 5, que corresponde ao estágio de grãos leitosos segundo Fancelli (1986). A severidade média do tecido foliar da planta inteira foi avaliada através da escala diagramática desenvolvida pela Empresa de Sementes Agrocere (Agrocere, 1996). Essa escala possui uma diagramação de plantas inteiras apresentando diferentes graus de severidade da doença, com notas que variam de 1 (0% de tecido atacado) até 9 (75% de tecido atacado). Esta é utilizada rotineiramente em programas de melhoramento que visam selecionar plantas resistentes ou inspecionar campos de produção de sementes. Dez plantas de cada extremo de resistência da população F_2 foram selecionadas para compor os agrupamentos de segregantes.

No segundo experimento, a severidade da doença foi avaliada em 3 épocas diferentes a partir do estágio fenológico 4 (milho verde) segundo Fancelli (1986). As avaliações ocorreram aos 71, 81 e 92 dias após o plantio. A severidade média da doença foi avaliada através da mesma escala já citada acima. A partir daí, folhas do ápice de cada planta foram coletadas e o DNA extraído para posterior análise genotípica através de marcadores microssatélites.

3.3 Efeito fenotípico da associação marcador/QRL nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesão

Este terceiro experimento foi realizado para verificar se as variáveis monocíclicas comprimento e número de lesão, são influenciadas pelos QRLs identificados nos experimentos a campo.

O ensaio foi conduzido nas dependências do campo experimental do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP. No ensaio, foi utilizado delineamento experimental inteiramente ao acaso com 7 plantas para cada linhagem parental e híbrido e 94 plantas F₂. A unidade experimental foi constituída de vasos com capacidade para cinco quilos de solo contendo uma planta cada, espaçados 50 cm entre eles, e distribuído em quatro linhas com 24 plantas cada. A adubação no plantio foi de aproximadamente 1,2 g de nitrogênio, 4,2 g de fósforo e 2,4 g de potássio por vaso. A adubação de cobertura foi realizada aos 15 dias antes da emergência, aplicando-se 2 g de sulfato de amônia/vaso.

3.3.1 Inoculação do patógeno

Plantas no estágio 5-6 folhas receberam 1 ml de suspensão contendo 2×10^4 uredósporos/ml, diretamente no cartucho, com o auxílio de uma micropipeta. Estes uredósporos foram coletados de pústulas em plantas cultivadas em casa de vegetação. Os esporos que deram origem a essas

pústulas foram coletados de plantas severamente atacadas no campo experimental da EBS Ltda./Dow Agrosience no município de Cravinhos-SP.

3.3.2 Avaliação das variáveis monocíclicas tamanho e número de lesões

O número total de pústulas por folha e comprimento de 10 lesões por folha inoculada foram avaliados 15 dias após a inoculação. As variáveis foram mensuradas com o auxílio de um microscópio estereoscópio sob aumento aproximado de 20 x. O teste de tukey foi aplicado para comparação das médias entre os tratamentos Z-93, Z-95 e F₁, em nível de 5% de probabilidade.

3.4 Genotipagem com marcadores microssatélites

3.4.1 Extração de DNA vegetal

A extração de DNA de tecido vegetal foi realizada de acordo com Hoisington et al. (1994), modificada para tubos pequenos (1,5 mL). Aproximadamente 200 µg de material vegetal moído foi adicionado o tampão de extração 1% CTAB (70 µM de NaCl; 50 µM de EDTA pH 8.0; 100 µM Tris-HCl pH7,5; 1% p/v de CTAB, 140 µM de β-mercapto-etanol e água destilada e

deionizada para completar o volume de 600 μL por amostra). As amostras foram incubadas em banho-maria a uma temperatura de 65°C por aproximadamente uma hora, sendo agitadas levemente por quatro a cinco vezes durante esse período de incubação. Após esse tempo, foi adicionado às amostras o mesmo volume de clorofórmio/álcool-isoamílico (CIA) (24:1), as quais foram centrifugadas à 3480 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e passado para novos tubos. À fase aquosa remanescente foi adicionado o mesmo volume de álcool etílico absoluto gelado, promovendo, então, a precipitação do DNA. A centrifugação do precipitado foi efetuada, descartando o sobrenadante. Os precipitados foram lavados com etanol 75% por 10 minutos e etanol absoluto por 20 minutos. O DNA foi colocado em suspensão utilizando 100 μL de TE pH 8,0 (10mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA).

Em todas as extrações, um tratamento com RNase se fez necessário. Aos 100 μL de DNA em suspensão foi adicionado 1 μL de RNase (1mg/ml), incubando a 37°C por 2h. Materiais vegetais coletados dos experimentos a campo sofreram uma extração com fenol mas este tratamento não foi necessário para o DNA extraído das plantas cultivadas em casa de vegetação. Para a lavagem com fenol, foi adicionado ao DNA em suspensão igual volume de fenol-saturado, mexendo gentilmente o tubo por aproximadamente 30 vezes. Logo após, adicionou-se à suspensão o mesmo volume de CIA 24:1, o qual foi agitado gentilmente e centrifugado por 10 minutos (12000rpm). O sobrenadante

foi retirado e a ele adicionado 60 μ L de NaCl e 250 μ L de etanol absoluto. Nessa fase ocorreu a precipitação do DNA. O material passou por uma centrifugação de 10 minutos a 12000 rpm, onde o sobrenadante foi descartado e o precipitado tratado com uma solução de lavagem 1 (76mL de etanol absoluto, 20 mL de 1M KOAc e 4 mL de água destilada e deionizada) por aproximadamente 15 minutos e lavado rapidamente com solução de lavagem 2 (76 mL de etanol absoluto, 100 μ L de NH₄OAc e 23,9 mL de água destilada e deionizada). O precipitado foi seco e suspenso em 250 μ L de TE pH 8,0.

A concentração do DNA foi estimada através de fluorômetro (Hoefer - DyNA Quant 200). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1x (5,4g de Tris base, 2,75 g de ácido bórico e 2,0 mL de EDTA pH 8,0 e água destilada e deionizada até completar 100 mL). Para visualização do DNA, o gel recebeu, após a fusão da agarose, brometo de etídeo na proporção de 0,5 μ g/mL de gel. Após a eletroforese, o gel foi fotografado com o aparelho ImageMaster®VDS (Pharmacia Biotech) sob luz ultra-violeta

3.4.2 Análise dos segregantes agrupados

Um total de 142 locos microssátélites foram utilizados neste estudo. As reações de amplificação destes locos foram feitas em volume final de 30 μ L, contendo 30 ng de DNA molde, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase

(Promega), 1x tampão da *Taq*, 2,5 μM de cloreto de magnésio, 100 μM de cada DNTP (A, C, G, T), 0,125 μM de “primer” anverso, 0,125 μM de “primer” reverso e 23,2 μL de água Milli Q autoclavada. Para algumas reações as concentrações de “primers” e cloreto de magnésio tiveram de ser alteradas para proporcionar uma melhor qualidade dos produtos amplificados (Ogliari et al. 2000). As amplificações ocorreram em termociclador PTC-100 (M.J. Research, Inc.) e os primers utilizados foram adquiridos da Research Genetics (EUA).

Os programas de amplificações foram extraídos de Ogliari et al. (2000). Após a amplificação, cada amostra recebeu 4 μL de tampão de carregamento [500 μL de EDTA 0,5M (pH 8,0), 500 μL de glicerol 99% e 2,16 mg de bromofenol], sendo que os fragmentos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose (Promega) 3% em tampão TBE 1x por aproximadamente 3 horas a 100 volts. A extremidade esquerda de cada gel recebeu 15 μL de um padrão molecular do tipo “ladder” 100pb (Promega) ou 50 pb (Promega) para informação do peso molecular das bandas resolvidas. O gel foi corado seguindo o mesmo procedimento já descrito no item 3.2.2. Logo após a eletroforese, os géis foram fotografados em aparelho ImageMaster®VDS (Pharmacia Biotech).

3.4.3 Genotipagem de plantas F₂ com marcadores candidatos

As reações de amplificação dos locos microssatélites foram realizadas aos moldes daquelas descritas no item acima. Num primeiro instante, foram utilizados apenas 73 dos 165 indivíduos do segundo ensaio a campo. Estes representaram os indivíduos mais extremos da população em termos de resistência e suscetibilidade. Estes indivíduos extremos foram genotipados com aqueles marcadores identificados como potencialmente ligados no estudo de segregantes agrupados. Outros marcadores polimórficos, ligados a estes, também foram testados.

Os demais indivíduos da população (92) foram genotipados somente com aqueles marcadores que mostraram suspeita de ligação aos genes de interesse na genotipagem realizada com os 73 indivíduos extremos.

3.4.4 Genotipagem dos indivíduos do estudo de casa de vegetação

As reações de amplificação dos locos microssatélites foram realizadas de acordo com aquelas descritas no item 3.4.2. Os 94 indivíduos F₂ foram genotipados com os marcadores identificados nos experimentos conduzidos a campo (item 3.4.3) como ligados a QRL.

3.5 Análises estatísticas

Análises estatísticas para verificação de ligação entre locos marcadores e genes de resistência a *Puccinia polysora* foram realizadas por meio de análise de variância, onde os genótipos marcadores para cada loco foram considerados variáveis independentes e a nota de severidade das plantas, variáveis dependentes. Observando diferenças significativas entre genótipos marcadores, a interpretação é a que o(s) marcador(s) estão ligados a genes que controlam a característica estudada (Edwards et al., 1987; Holland, et al., 1998). Para estimar a magnitude da variância fenotípica em resistência pela associação gene-marcador foi utilizado um teste de regressão linear. Essa magnitude reflete a porcentagem que tal região (QRL) explica da variância fenotípica em resistência. Para verificar o efeito fenotípico do QRL nas variáveis monocíclicas foram realizados os mesmos testes estatísticos, sendo que na análise de variância e no teste de regressão linear, genótipos marcadores foram as variáveis independentes e número de pústulas ou comprimento de lesão foram as variáveis dependentes. As análises foram feitas com auxílio do programa Statistica versão 5.0 (StatSoft, EUA). Houve transformação de dados para o experimento de casa de vegetação usando o fator $\text{Log}(x+1)$. Para os experimentos a campo não foi necessário transformação de dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaaios em campo

4.1.1 Primeiro ensaio (safra 97/98)

O clima no local do ensaio (quente e seco) favoreceu o desenvolvimento da doença, evidenciado pelas altas severidades obtidas nas plantas mais suscetíveis. As médias de severidade da doença foram bastante contrastantes entre os pais, sendo 3,3 para a linhagem Z-95 (resistente) e 7,7 para a linhagem Z-93 (suscetível). A média da população F₁, que foi de 4,5, ficou intermediária aos pais (Tabela 1). Todas as médias diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). A distribuição fenotípica da severidade da população F₂ foi contínua indicando a possibilidade de controle poligênico (Figura 1). Das 60 plantas da população F₂, as 20 com notas de severidade/resistência mais extremas foram selecionadas para compor os segregantes agrupados nos estudos de genotipagem (Tabela 2).

Tabela 1 – Severidade média de ataque de *Puccinia polysora* nas linhagens Z-93, Z-95 e híbrido (Z-95 x Z-93) no experimento de 1998.

| Tratamento | Severidade Média |
|----------------|------------------|
| Z-95 | 3,3 a |
| Z-93 | 7,7 b |
| F ₁ | 4,5 c |

Médias seguidas de mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

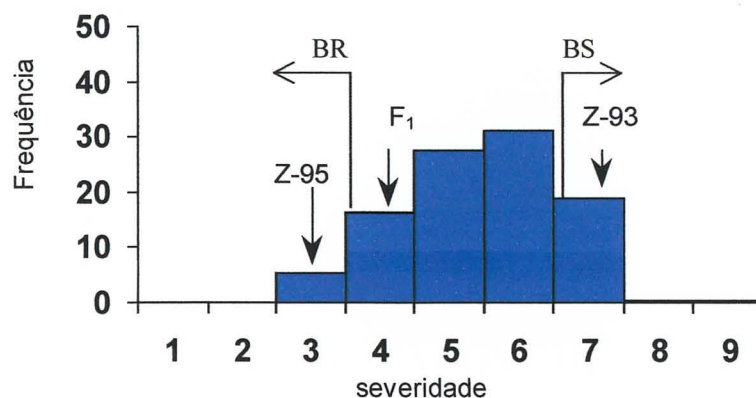


Figura 1 – Distribuição fenotípica de notas de severidade da ferrugem de polissora na população F₂ no estágio fenológico 5, aproximadamente 80 dias após o plantio. Z-95, F₁ e Z-93 representam as médias destes tratamentos. BR e BS representam as plantas selecionadas para composição dos segregantes agrupados de resistência (BR) e de suscetibilidade (BS)

Tabela 2 – Plantas F₂ utilizadas para composição dos segregantes agrupados (extremos de resistência e suscetibilidade).

| Nº da planta | Nota ¹ | ASA (R/S) ² | Nº da planta | Nota ¹ | ASA (R/S) ² |
|--------------|-------------------|------------------------|--------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 7,0 | S | 36 | 3,0 | R |
| 2 | 7,0 | S | 37 | 3,0 | R |
| 3 | 7,0 | S | 42 | 3,0 | R |
| 6 | 8,0 | S | 43 | 3,0 | R |
| 10 | 8,0 | S | 44 | 3,0 | R |
| 22 | 7,5 | S | 45 | 3,0 | R |
| 23 | 7,5 | S | 46 | 3,0 | R |
| 24 | 7,5 | S | 48 | 3,0 | R |
| 25 | 7,5 | S | 49 | 3,0 | R |
| 26 | 7,5 | S | 50 | 3,0 | R |

¹- Escala 1 – 9, onde 1 = 0% de tecido atacado e 9 = 75% do tecido atacado (Agrocere, 1996); ² – R = resistente, S = suscetível

4.1.2 Segundo ensaio (safra 98/99)

O clima do local, assim como no ensaio anterior, também favoreceu o desenvolvimento da doença. As médias de severidade da doença foram bastante contrastantes entre os progenitores e híbrido em todas as avaliações, diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$) (Tabela 3). Para as análises genóticas, foram utilizados dados da 2ª avaliação (estádio fenológico 5), uma vez que verificou-se a ocorrência tardia de *Physopella zea*, o que pode ter influenciado negativamente a 3ª avaliação. A distribuição fenotípica da severidade da ferrugem polissora na população F₂ nas três avaliações, assim como ocorreu no experimento anterior (seleção dos segregantes agrupados) também foi contínua. Isso é uma indicativa de que

pode haver ação de mais de um gene contribuindo para o fenótipo resistência (Figura 2). No Anexo A estão listadas as severidades individuais da população F_2 nas 3 avaliações.

Tabela 3 - Severidade média da ferrugem polissora nas linhagens genitoras Z-95 e Z-93, no híbrido (Z-95 X Z-93) e na geração F_2 em três avaliações (71, 81 e 92 dias após o plantio).

| Tratamento | 1ª Avaliação | 2ª Avaliação | 3ª Avaliação |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| Z-95 | 2,17 a | 2,42 a | 3,14 a |
| Z-93 | 5,05 b | 6,30 b | 7,70 b |
| F_1 | 3,43 c | 4,21 c | 4,45 c |
| F_2 | 3,49 c | 4,76 c | 5,15 c |

Médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

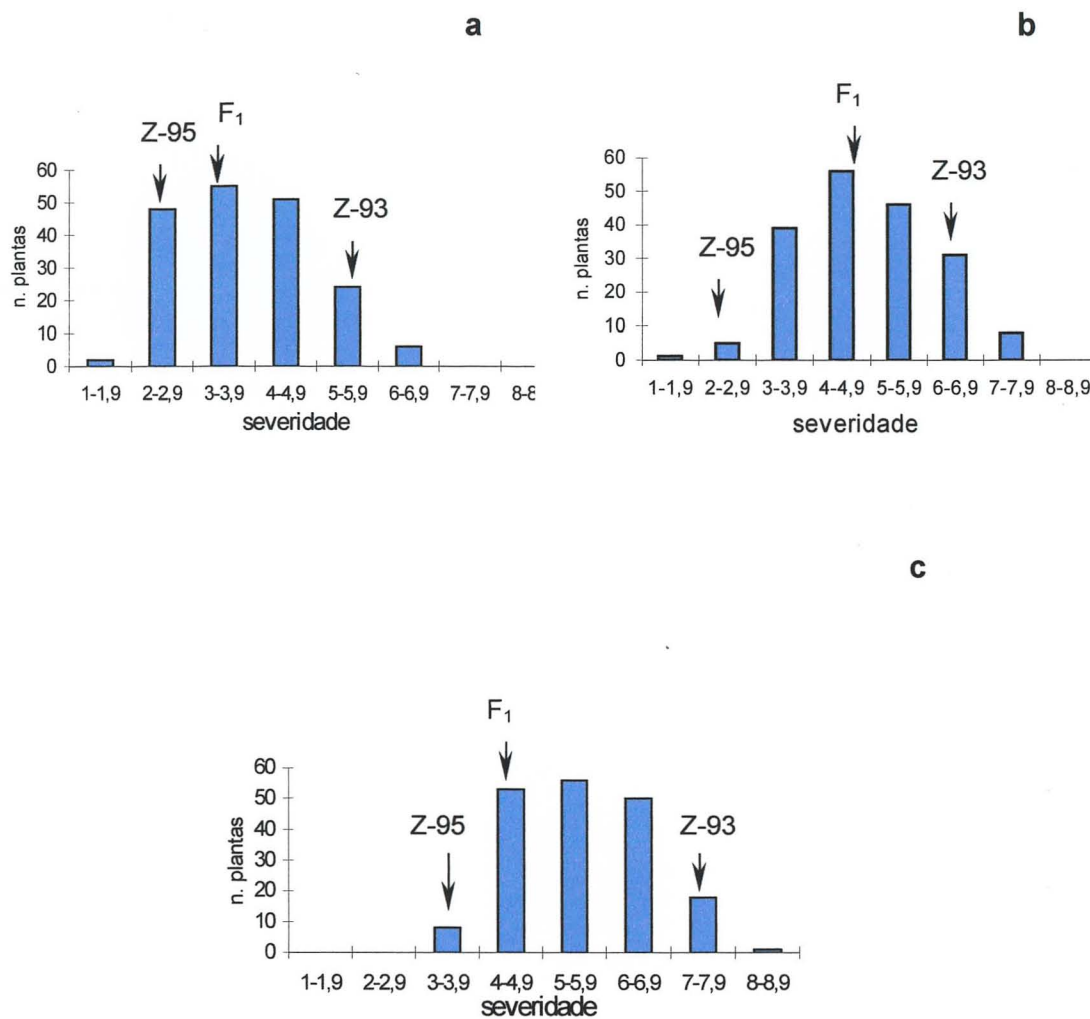


Figura 2 - Distribuição das plantas da população F_2 em oito classes fenotípicas baseando-se na severidade à ferrugem polissora aos 71 (a), 81 dias (b) e 92 (c) dias após o plantio. Z-95, F_1 e Z-93 representam as médias destes tratamentos.

4.2 Análise dos segregantes agrupados

Dos 142 marcadores moleculares testados (Anexo B), 98 mostraram-se não informativos, ou seja, não revelaram polimorfismos entre as linhagens genitoras, ao passo que 44 foram informativos. Desses 44 informativos, sete apresentaram polimorfismo entre os segregantes agrupados (Tabela 4), demonstrando a potencialidade de serem marcadores ligados a QTLs de resistência ao patógeno (Figura 3). Esse nível de polimorfismo (44 marcadores polimórficos em 142, ou 31%) é relativamente baixo comparado ao estudo de Ogliari (1999), que um nível de aproximadamente 50% entre duas linhagens de milho utilizadas em seus estudos de mapeamento. Smith et al. (1992), estudando diversidade genética em híbridos de milho dos Estados Unidos, relataram que muitos híbridos comerciais utilizados naquele país possuem grande parte de seu germoplasma em comum, o que pode revelar o estreitamento da base genética das linhagens utilizadas na composição dos híbridos. Essa base genética estreita pode dificultar a localização de genes de interesse em estudos de mapeamento, isso porque as regiões que flanqueiam a região alvo (por exemplo gene de resistência), geralmente utilizadas na localização dos genes de interesse, podem apresentar-se idêntica entre as linhagens (monomorfismo), fazendo com que a região de interesse não seja localizada. Neste trabalho, entretanto, utilizamos duas linhagens bem contrastantes geneticamente, comprovados

por testes de *pedigree*. É possível explicar esse baixo polimorfismo encontrado entre as linhagens de várias formas. A primeira seria a utilização de géis de agarose na resolução dos fragmentos microssatélites. Trabalhos envolvendo estudos de diversidade genética (Powell et al. 1996; Chin et al. 1996) indicam géis de poliacrilamida como o polímero ideal para a melhor resolução dos fragmentos amplificados por este tipo de marcador. Neste trabalho, no entanto, optou-se pelo uso de agarose de alta resolução (Promega), a exemplo de Ogliari (1999); Camargo et al. (1998) e Lespinasse et al. (2000), devido a praticidade e baixo custo. Isso pode ter contribuído para que polimorfismos de poucos pares de base não fossem detectados. Uma outra explicação seria o fato de que os próprios marcadores microssatélites podem não ser marcadores tão polimórficos quanto se imaginava, pelo menos entre as linhagens cultivadas de milho. Este baixo polimorfismo encontrado poderia ter contribuído negativamente na localização de um número maior de QRL, já que uma certa parte do genoma não pode ser estudado devido ao baixo nível de polimorfismo entre os genitores.

Tabela 4 – Número de locos microsatélites informativos, não informativos e informativos possivelmente ligados a genes de resistência a *Puccinia polysora* em milho, segundo sua localização cromossômica.

| CONDIÇÃO ALÉLICA DO LOCO MARCADOR | CROMOSSOMO | | | | | | | | | | TOTAL | |
|---|------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | S/L* |
| Locos marcadores Informativos ^a | 4 | 5 | 1 | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 6 | 1 | 1 | 37 |
| Locos marcadores não informativos ^b | 18 | 6 | 4 | 15 | 11 | 6 | 6 | 9 | 13 | 9 | 1 | 98 |
| Locos marcadores possivelmente ligados aos genes ^c | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| TOTAL | 23 | 13 | 6 | 19 | 16 | 9 | 11 | 13 | 20 | 10 | 2 | 142 |

^a Contraste alélico do loco marcador entre as linhagens Z-93 e Z-95. ^b Igualdade alélica do loco marcador entre as linhagens Z-93 e Z-95. ^c Contraste alélico no loco marcador entre as linhagens Z-93 e Z-95 e igualdade alélica entre os segregantes agrupados e pelo menos uma das linhagens – indicativa de ligação aos genes de resistência. * Marcador sem localização definida.

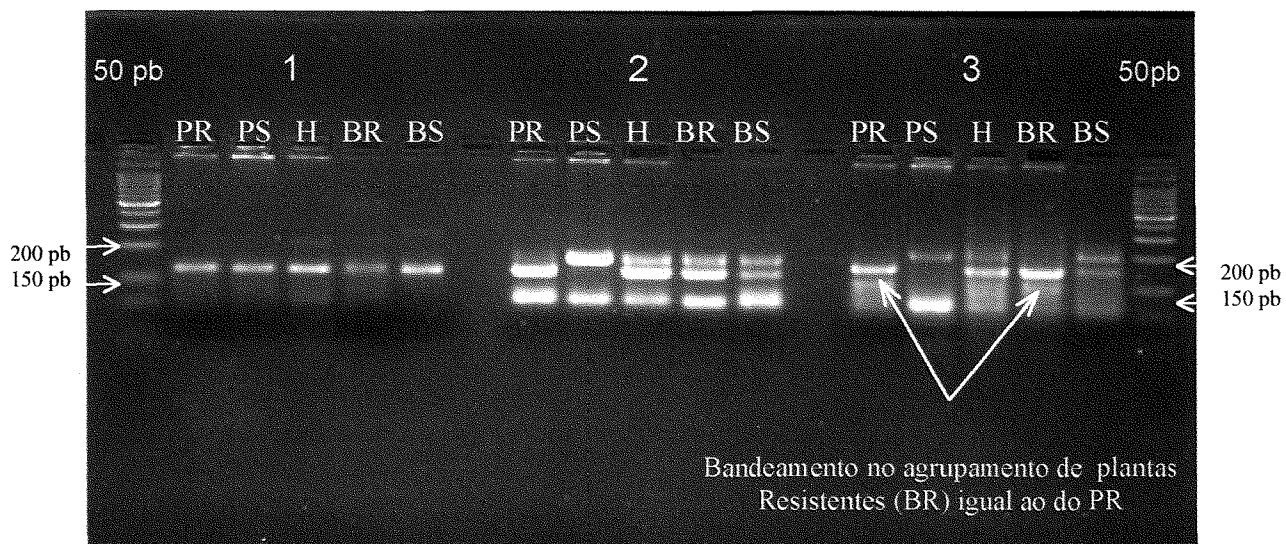


Figura 3 – Exemplo de marcadores microssatélites (1) não informativo – *Bngl* 180, (2) informativo, mas não ligado – *Bngl* 278 (não há polimorfismo entre os agrupamentos, embora haja entre linhagens genitoras) e (3) informativo potencialmente ligado ao QRL de interesse – *Bngl* 589 (polimorfismo entre linhagens genitoras e entre agrupamentos). PR representa o genitor resistente, PS o genitor suscetível, H o híbrido, BR o agrupamento de plantas resistentes e BS o agrupamento de plantas suscetíveis.

4.3. Ligação entre locos marcadores e o QRL

Para verificar se os marcadores candidatos identificados com a genotipagem dos segregantes agrupados estavam realmente ligados a genes de resistência, estes foram testados na população segregante produzida no experimento da safra 98/99. Inicialmente, somente as 73 plantas extremas em resistência/suscetibilidade foram testadas. Lin & Ritland (1996) também utilizaram esta técnica de amostragem dos indivíduos extremos. Neste trabalho, os autores genotiparam 96 indivíduos extremos de um total de 247, conseguindo detectar vários marcadores ligados a QTLs de interesse em flores do campo (*Mimulus spp*). Essa etapa permitiu eliminar marcadores falso-positivos, economizando tempo e reagentes, já que somente parte da população foi genotipada. Além dos sete marcadores potencialmente ligados ao QRL, outros 15 também foram testados por estarem próximos àqueles primeiros, segundo o mapa genético consensual do milho (<http://www.agron.missouri.edu>).

Dos 22 locos marcadores analisados (Tabela 5), dois mostraram-se ligados a uma região (QRL) que confere resistência quantitativa a ferrugem polissora. Esses marcadores estão localizados no cromossomo 9. *Phi* 28 encontra-se na posição 01 e *Phi* 65 na posição 03 segundo o mapa consenso. Para esses marcadores, o restante da população segregante (107 indivíduos) também foi genotipada e o teste de regressão linear aplicado para verificar a magnitude do efeito fenotípico desses genes. A associação entre o loco

marcador *Phi* 65 (Figura 4) e os genes de resistência explicou 12,9% da variação fenotípica em resistência verificada entre as plantas F_2 (Tabela 6). Esse valor encontra-se bem próximo àqueles descritos por Holland et al. (1998) em seus estudos de mapeamento de genes de resistência a *P. polysora*. Esses autores encontraram duas associações marcador/gene de resistência a esta ferrugem nos cromossomos 3 e 4 do milho, cada uma explicando 13 e 15%, respectivamente. A associação entre *Phi* 28 e os genes explicou 5,10% do efeito (Tabela 6). Convém ressaltar que este marcador não apresentou polimorfismo entre os segregantes agrupados no estudo de ASA. Isso pode indicar que este marcador já está bem distante do QRL de interesse, a uma distância maior que 30 cM, já que, segundo Michelmore et al. (1991), o método ASA não consegue detectar associações genes/marcadores que estejam ligados a distâncias maiores que esta. Outros dois marcadores que encontram-se na posição 01 (a mesma do *Phi* 28) e na 04 (próxima a região 03 - marcador *Phi* 65) não mostraram sinais de ligação com o QRL em questão, talvez devido ao mesmo fator.

Kerns et al. (1999) também localizaram, através de marcadores RFLP, genes nesta mesma posição controlando resistência parcial a ferrugem comum e ao carvão do milho (*Ustilago maydis*). Isso pode ser uma indicativa de que nesta região haja um “cluster” gênico controlando a resistência a pelo menos três patógenos. A ocorrência de famílias gênicas vem sendo descritas em milho. Ullstrup (1997) já havia descrito um destes “clusters” no cromossomo 10 contendo genes de resistências a essas duas ferrugens. McMullen & Simcox

(1995b) relataram a ocorrência de uma família gênica no cromossomo 3, controlando resistência ao vírus do mosaico do milho e a ferrugem comum. Segundo estes autores, há evidências de que muitos genes de resistência a pragas e doenças estejam distribuídos no genoma em forma de "clusters". É provável que estas famílias gênicas estejam envolvidas em sinais de transdução ou em eventos que tornam incompatíveis a interação entre planta-patógeno (McMullen & Simcox, 1995a).

Tabela 5 - Locos microssatélites utilizados na genotipagem da população extrema

| "Primer" | Localização ¹ | "Status nos segregantes agrupados" ² | "Status" na população segregante ³ |
|-----------------|--------------------------|---|---|
| Phi 64 | 1.11 | Polimórfico ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 381 | 2.03 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 125 | 2.03 | Polimórfico ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 108 | 2.04 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| MagE 05 | 2.05/2.06 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| Mag01F03 | 2.08 | Polimórfico ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 29 | 3.04 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 73 | 3.05 | Polimórfico ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 79 | 4.05 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 589 | 4.09 | Polimórfico ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 278 | 5.06 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 657 | 7.02 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 082 | 7.06 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Bngl</i> 240 | 8.04 | Polimórfico ligado | Polimórfico não ligado |

Continua.....

| | | | |
|-----------------|-------|------------------------|---------------------------|
| <i>Phi</i> 115 | 8.04 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 15 | 8.08 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 33 | 9.01 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 28 | 9.01 | Polimórfico não ligado | Polimórfico ligado |
| <i>Phi</i> 65 | 9.03 | Polimórfico ligado | Polimórfico ligado |
| <i>Bngl</i> 430 | 9.04 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| <i>Phi</i> 59 | 10.02 | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |
| MacT02B10 | - | Polimórfico não ligado | Polimórfico não ligado |

¹ Posição dos locos microssatélites em milho - mapa consenso. Disponível em <http://www.agron.missouri.edu>, onde a localização foi designada por X.Y. X = corresponde ao número do cromossomo e Y = a localização no cromossomo

² Status na fenotipagem dos segregantes agrupados - Polimórfico não ligado - polimorfismo de bandas entre genitores mas não entre os segregantes agrupados, Polimórfico ligado - polimorfismo entre genitores e entre segregante agrupados

³ Status na fenotipagem dos 73 indivíduos da população segregante, onde Polimórfico não ligado indica diferença não significativa na análise de variância e Polimórfico ligado, indica significância na mesma análise.

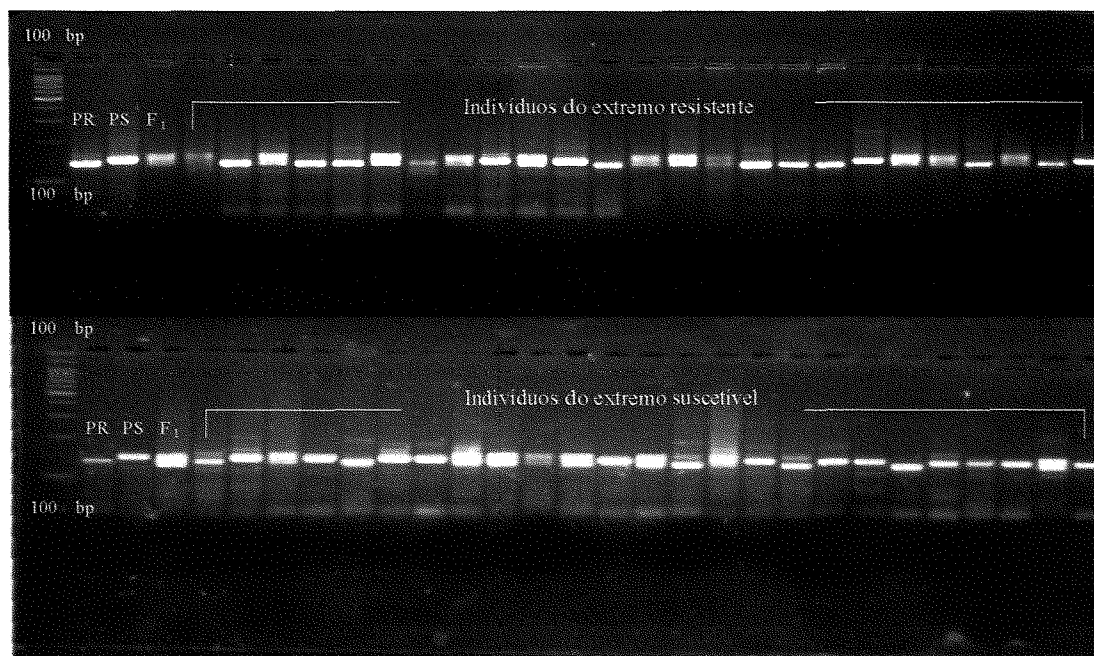


Figura 4 – Padrão de bandeamento para o “primer” *Phi 65* em 54 indivíduos extremos para o fenótipo resistência.

Tabela 6 - Locos microssatélites associados a resistência a ferrugem polissora.

| Marcador | | Média de severidade ^a | R ^{2b} | P ^c | Nº de indivíduos genotipados |
|----------|---|----------------------------------|-----------------|----------------|------------------------------|
| Phi 65 | s | 6,0 a | 12,90 | < 0,000001 | 149 |
| | r | 4,45 b | | | |
| | h | 4,68 b | | | |
| Phi 28 | s | 4,91 b | 5,10 | < 0,000078 | 157 |
| | r | 3,79 a | | | |
| | h | 5,07 b | | | |

^a Média de severidade para cada classe genotípica, onde r = indivíduos homocigotos para alelos marcadores do pai resistente, s = indivíduos homocigotos para alelos do pai suscetível e h = heterocigotos. Dentro de cada loco marcador as médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

^b porcentagem da variação fenotípica da resistência a *Puccinia polysora* explicada pela associação do loco marcador e o gene estimado por regressão linear

^c nível de significância da análise de variância.

O(s) gene(s) de resistência à doença em questão ligado(s) ao marcador *Phi 65* ($P < 0,000001$) conferem, para este loco, um efeito de dominância à característica, já que quando o material combina alelos dos dois genitores (genótipo híbrido), a média de severidade da doença mostra-se estatisticamente igual a média do genitor resistente. Nesta associação, a severidade média da classe genotípica homozigota para alelos do genitor resistente foi de 4,45, enquanto que aquela homozigota para alelos do genitor suscetível foi de 6. Para a classe heterozigota, a média foi de 4,68. Sendo assim, o alelo do genitor resistente contribuiu em 22% na redução da severidade da doença quando em heterozigose. Quando em homozigose, a diminuição foi de 25%.

Para *Phi 28*, o efeito sobre a característica não foi o mesmo que no caso do marcador anterior, podendo indicar que esse marcador está já bem distante do gene de interesse ou ligado a outro QTL de expressão fenotípica menor, observado pelo valor menor de R^2 (5,10%). Nesta associação ($P < 0,000078$), a severidade média da classe homozigota para alelos do genitor resistente foi de 3,79, ao passo que para a classe homozigota para alelos do genitor suscetível foi de 4,91, o que representa uma diferença de 23% na severidade. A classe heterozigota obteve média de severidade de 5,07, não diferindo estatisticamente da classe homozigota para alelos do genitor suscetível (Tabela 5).

A localização de somente uma região contendo genes de resistência a doença pode ser explicada pelo baixo polimorfismo entre as linhagens parentais (já discutido anteriormente) e pelas metodologias utilizadas neste estudo. Holland et al. (1998), utilizando população F_3 segregante para resistência a ferrugem polissora encontraram 2 marcadores RFLP ligados a genes de resistência quantitativa em 2 cromossomos do milho. Estes pesquisadores utilizaram marcadores somente em regiões dos cromossomos 3, 4 e 10, que sabidamente contém genes conhecidos de resistência a *P. sorghi* (Ullstrup, 1997; Wilkinson & Hooker, 1968). Eles genotiparam agrupamentos de DNA de todas as famílias F_3 , utilizando 10 indivíduos de cada família para compor os agrupamentos. Lübberstedt et al. (1998), por sua vez, encontraram vários poligenes de resistência a *P. sorghi*, distribuídos em todos os cromossomos do milho, utilizando quatro populações européias de milho. Detectaram mais de 20 genes de pequeno efeito influenciando a resistência àquela ferrugem nas quatro populações estudadas. Neste trabalho, os pesquisadores também utilizaram a genotipagem de todos os indivíduos das populações estudadas, ao contrário do presente trabalho, onde o método ASA foi utilizado. A genotipagem de um número maior de indivíduos permite detectar associações marcadores/QRLs mais eficientemente que o método ASA, o que pode explicar o fato de Holland et al.(1998) e Lübberstedt et al. (1998) terem relatado um número maior de QRL.

Outro ponto que certamente implicou na localização de somente um QRL foi a utilização de população F_2 , onde ao contrário de populações F_3 , não há

possibilidade de replicar o experimento. Essa falta de repetição pode fazer com que fatores ambientais influam na fenotipagem, prejudicando a genotipagem da população. Outro fator importante que pode ter influenciado na localização de somente uma região de resistência é o tamanho da população estudada. Utilizamos neste estudo 165 indivíduos. Marrof et al. (1996) utilizaram 239 indivíduos F_2 em seus estudos de mapeamento para genes de resistência a *Cercospora zea-maydis* causadora da mancha de cercospora em milho, localizando através de marcadores RFLP três regiões de resistência a esta doença. Este maior número de indivíduos pode aumentar a chance de localizar genes de interesse em populações onde não é possível existir repetições de indivíduos (como populações F_2). Esta estratégia de aumentar o número de indivíduos pode diluir o efeito ambiental, melhorando a eficácia das análises.

4.4 Efeito fenotípico da associação marcador/QRL nas variáveis monocíclicas número e comprimento de lesões

Neste experimento, houve diferença significativa entre os tratamentos Z-95, Z-93 e F_1 , em nível de 5% de probabilidade (Tabela 7) para a variável número de lesão. Para a variável comprimento de lesão, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos Z-95 e Z-93, havendo, contudo, diferença significativa de F_1 quando comparado com os genitores. A distribuição fenotípica contínua da população F_2 , para as duas variáveis avaliadas (Figura

5), indica a possibilidade de existir uma ação poligênica controlando essas características.

Tabela 7 - Média das linhagens Z-95 e Z-93 e do híbrido (Z-95 X Z-93) para as variáveis número total de pústulas e comprimento de 10 lesões por folha

| Tratamento | Nº de pustulas/folha inoculada | Comp. Médio de 10 lesões na folha inoculada (mm) |
|----------------|--------------------------------|--|
| Z-95 | 47,83 b* | 0,75 a |
| Z-93 | 135 a | 0,74 a |
| F ₁ | 71,2 a | 0,87 b |

* Médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

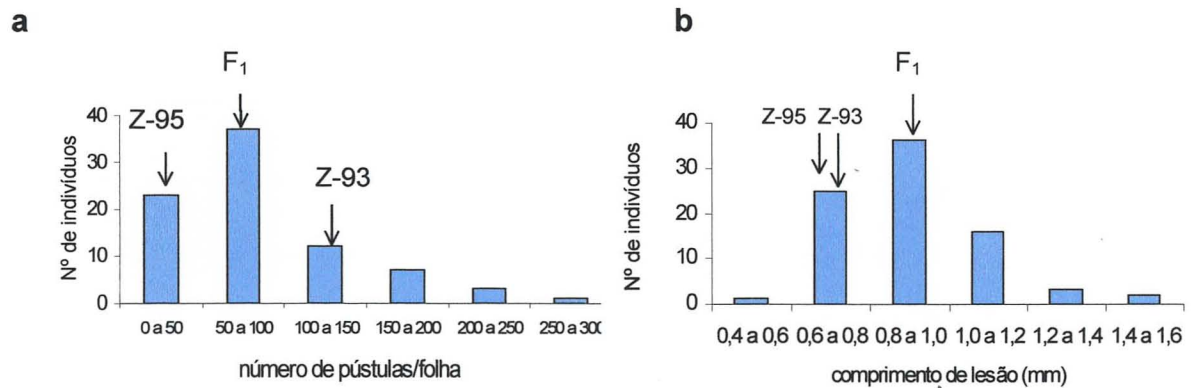


Figura 5 - Distribuição de plantas da população F₂ para as variáveis número de lesões/folha (a) e média do comprimento de 10 lesões/folha (mm) (b).

Todas as 94 plantas foram genotipadas com os dois marcadores (*Phi* 65 e *Phi* 28) ligados ao QRL. Destes, somente *Phi* 65 (Figura 6) mostrou-se efetivamente ligado ($P < 0.00032$) à característica número de lesão/folha inoculada (Tabela 8). *Phi* 28 não apresentou indicativa de ligação em nível de 5% de probabilidade no teste F da análise de variância com nenhuma das duas variáveis estudadas. A associação entre *Phi* 65 e o QRL mostrou R^2 de 19,54% e um coeficiente de variação de 6,2% para dados transformados [$\log(x+1)$]. Nenhum dos dois marcadores mostrou-se associado a característica comprimento de lesão. Isso pode ser explicado pela não diferenciação significativa entre os progenitores (Z-95 e Z-93) para esta variável.

Assim como neste trabalho, Holland et al. (1998) também avaliaram a resistência a ferrugem de polissora em casa de vegetação contando o número de pústulas em plantas jovens de milho. Esses autores encontraram resultados semelhantes àqueles produzidos em campo, quando mediram a severidade a doença, indicando que o QRL que controlava número de lesões estava efetivamente contribuindo para o decréscimo da doença no campo. Desta forma, levando-se em conta que uma redução no número de lesão igualmente acarreta uma diminuição da taxa de progresso da doença (Bergamim Filho & Amorim, 1996), o QRL aqui descrito pode ser classificado como do tipo "slow rusting" segundo Scott & Zummo (1989). Esses genes são desejáveis do ponto de vista do melhoramento por serem mais estáveis frente a variações genéticas por parte do patógeno. No entanto, por terem baixa expressão fenotípica, o piramidamento de vários destes genes em um único genótipo, com o auxílio de

marcadores moleculares, surge como uma proposta interessante na obtenção de híbridos com altos e duráveis níveis de resistência a este patógeno.

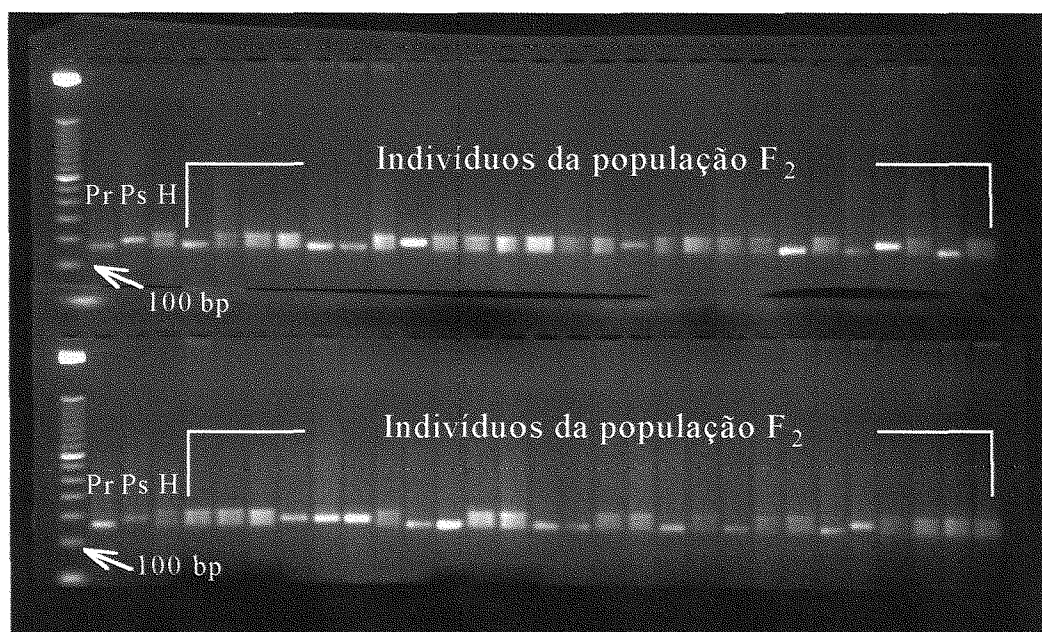


Figura 6 – Genótipo de 52 plantas F_2 para o marcador *Phi 65*. Pr representa o alelo do pai resistente, Ps o alelo do pai suscetível e H o híbrido. Na primeira canaleta da esquerda está o marcador molecular “ladder” 100 pb.

Tabela 8 – Número médio de lesões por folha das classes genotípicas para o loco marcador *Phi 65*.

| | Número de lesão/folha ^a | R ^{2b} | P ^c | Nº de indivíduos genotipados |
|---|------------------------------------|-----------------|----------------|------------------------------|
| S | 145 a | | | |
| R | 63 b | 19,54 | 0,000032 | 82 |
| H | 83 b | | | |

^a Média de severidade para cada classe genotípica, onde r = indivíduos homocigotos para alelos marcadores do pai resistente, s = indivíduos homocigotos para alelos do pai suscetível e h = heterocigotos. Dentro de cada loco marcador as médias na coluna seguidas de mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

^b porcentagem da variação fenotípica da resistência a *Puccinia polysora* explicada pela associação do loco marcador e o gene estimado por regressão linear

^c nível de probabilidade da análise de variância.

5 CONCLUSÕES

- Dos 142 locos microssatélites amostrados, 31% mostraram-se polimórficos entre as linhagens genitoras.
- A utilização de 142 locos marcadores foi suficiente para localizar marcadores ligados a uma região (QRL) controlando resistência a doença para qual a população estava segregando.
- Utilizando população segregante F_2 para fenotipagem e o método de segregantes agrupados (ASA) associado a genotipagem dos segregantes extremos foi possível localizar dois marcadores microssatélites (*Phi 65* e *Phi 28*) ligados a uma região (QRL) que controla resistência a *P. polysora*.
- Este QRL tem um efeito “slow rusting” uma vez que diminuiu o número de lesões.

ANEXOS

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| A Severidade de <i>P. polysora</i> nos indivíduos da população F ₂ na safra 98/99 nas 3 avaliações (71, 81 e 92 dias após o plantio)..... | 53 |
| B Marcadores microssatélites utilizados no estudo | 56 |

Anexo A – Severidade de *P. polysora* nos indivíduos da população F₂ na safra 98/99 nas 3 avaliações (71, 81 e 92 dias após o plantio)

| Planta | Avaliações | | | Planta | Avaliações | | |
|--------|----------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|----------------|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a |
| 1 | 3 | 4 | 5 | 36 | 3,5 | 7 | 7 |
| 2 | 3,5 | 4 | 5 | 37 | 4 | 6 | 6 |
| 3 | 4,5 | 5 | 5 | 38 | 4 | 5,5 | 6 |
| 4 | 4 | 4 | 6 | 39 | 2 | 5 | 5 |
| 5 | 5 | 6 | 6 | 40 | 2,5 | 3 | 4 |
| 6 | 4 | 5 | 5 | 41 | 2,5 | 4 | 4 |
| 7 | 5 | 5 | 6 | 42 | 2,5 | 4 | 4,5 |
| 8 | 3 | 4 | | 43 | 2 | 4 | 4 |
| 9 | 3,5 | 4 | 4 | 44 | 4 | 4,5 | 5 |
| 10 | 3 | 6 | 6 | 45 | 3 | 5 | 6 |
| 11 | 4 | 4 | 4 | 46 | 2 | 4 | 4 |
| 12 | 4,5 | 6 | 5 | 47 | 2 | 4 | 5 |
| 13 | 4,5 | 5,5 | 6 | 48 | 3 | 3 | 4 |
| 14 | 6 | 7 | 7 | 49 | 3 | 5 | 5 |
| 15 | 2 | 6 | | 50 | 3,5 | 4 | 4,5 |
| 16 | 2,5 | 5 | 6 | 51 | 2,5 | 5,5 | 6 |
| 17 | 2,5 | 4 | 5 | 52 | 4 | 5,5 | 5,5 |
| 18 | 2 | 3 | 3 | 53 | 3,5 | 6 | 6 |
| 19 | 4 | 6 | 6,5 | 54 | 4,5 | 6 | 6 |
| 20 | 2 | 3 | 3 | 55 | 3 | 4 | 6 |
| 21 | 4 | 6,5 | 7 | 56 | 2 | 3,5 | 3 |
| 22 | 2,5 | 5 | 5 | 57 | 2 | 3 | 4 |
| 23 | 3 | 5 | 6 | 58 | 2,5 | 3 | 5 |
| 24 | 2,5 | 5,5 | 5,5 | 59 | 4,5 | 6 | 7 |
| 25 | 2 | 4 | 4 | 60 | 5 | 6 | 6 |
| 26 | 2 | 4,5 | 5 | 61 | 4 | 6 | 6 |
| 27 | 4 | 3 | 4 | 62 | 2,5 | 3 | 5 |
| 28 | 3 | 5 | 5,5 | 63 | 5 | 6 | 7 |
| 29 | 3 | 7 | 7 | 64 | 3 | 6 | 6 |
| 30 | 3,5 | 6 | 6 | 65 | 3 | 5 | 5 |
| 31 | 4 | 6,5 | 6,5 | 66 | 2,5 | 5 | 4 |
| 32 | 2 | 5 | 5 | 67 | 2,5 | 5 | 5 |
| 33 | 2,5 | 3 | 3,5 | 68 | 4 | 6 | 6 |
| 34 | 4,5 | 6 | 6 | 69 | 4 | 5 | 6 |
| 35 | 5 | 6,5 | 7 | 70 | 5,5 | 5,5 | 7 |

Continua

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 71 | 6 | 7 | 7,5 | 117 | 5,5 | 5,5 | 6 |
| 72 | 2 | 4 | 5 | 118 | 5 | 6 | 6,5 |
| 73 | 5 | 6 | 6 | 119 | 5 | 7 | 6 |
| 74 | 6 | 7 | 7 | 120 | 4 | 6 | 6 |
| 75 | 5 | 7 | 7 | 121 | 4 | 5 | 5 |
| 76 | 4 | 5 | 5,5 | 123 | 3 | 4 | 4 |
| 77 | 3 | 4 | 5 | 124 | 2 | 3 | 4 |
| 78 | 3 | 4 | 6 | 125 | 3 | 3 | 4 |
| 79 | 3 | 5 | 6 | 126 | 4 | 4 | 4,5 |
| 80 | 2,5 | 4 | 5 | 127 | 5 | 6 | 6 |
| 81 | 3 | 4 | 4,5 | 128 | 5 | 5 | 5 |
| 82 | 3 | 5 | 5,5 | 130 | 6 | 7 | 7 |
| 85 | 1,5 | 3 | 4 | 134 | 6 | 5,5 | 6 |
| 86 | 5,5 | 6 | 7 | 135 | 5 | 6 | 7 |
| 87 | 2 | 5,5 | 5,5 | 136 | 4 | 5 | 5 |
| 89 | 5 | 6 | 6 | 137 | 3 | 5 | 5 |
| 90 | 5 | 7 | 7 | 138 | 3 | 4 | 4,5 |
| 91 | 4 | 5 | 5 | 139 | 3 | 3,5 | 4 |
| 93 | 4 | 5 | 5 | 140 | 2,5 | 3,5 | 4 |
| 94 | 3 | 5 | 6 | 141 | 4 | 4,5 | 4,5 |
| 95 | 4 | 6 | 6 | 142 | 3 | 4 | 4 |
| 96 | 3 | 6 | 6,5 | 144 | 3 | 3,5 | 4 |
| 97 | 4 | 4 | 5 | 145 | 4 | 5 | 5 |
| 98 | 4,5 | 5 | 6 | 146 | 4 | 4 | 5 |
| 99 | 3,5 | 5 | 5 | 147 | 3 | 4 | 5 |
| 100 | 3,5 | 4 | 4 | 148 | 3 | 3,5 | 4 |
| 101 | 5 | 6 | 6 | 149 | 2 | 3 | 3 |
| 102 | 4,5 | 6 | 7 | 150 | 2,5 | 4 | 4 |
| 103 | 4 | 5 | 5 | 151 | 5,5 | 6 | 6 |
| 104 | 5 | 7 | 7 | 153 | 5 | 5 | 5 |
| 105 | 5 | 6 | 6 | 155 | 4 | 5 | 5 |
| 106 | 4 | 5 | 6 | 158 | 3 | 4 | 4 |
| 107 | 5 | 6 | 6 | 159 | 2 | 3 | 3 |
| 108 | 3 | 5 | 5 | 160 | 2,5 | 6 | 6 |
| 109 | 4 | 5 | 5 | 161 | 2 | 4 | 4 |
| 111 | 3 | 4,5 | 4 | 162 | 3 | 4,5 | 5 |
| 112 | 4 | 4,5 | 6 | 164 | 2,5 | 3 | 3 |
| 113 | 3 | 3,5 | 4 | 165 | 2,5 | 3 | 4 |
| 115 | 4 | 4 | 4 | 167 | 3,5 | 4 | 5 |
| 116 | 4 | 4 | 5 | 168 | 3 | 4,5 | 5 |

Continua

| | | | | | | | |
|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 169 | 3 | 4 | 4 | 180 | 3 | 4 | 4 |
| 171 | 4 | 5 | 6 | 184 | 1,5 | 2,5 | 4 |
| 172 | 4 | 5 | 5 | 189 | 2 | 3 | 3 |
| 173 | 4 | 4 | 5 | 191 | 2 | 3 | 4 |
| 174 | 3 | 4 | 4 | 192 | 2,5 | 3 | 4 |
| 175 | 3 | 4 | 4,5 | 193 | 2 | 3,5 | 4 |
| 178 | 2,5 | 4 | 4 | 194 | 3 | 4 | 4,5 |
| 179 | 4 | 4 | 4 | | | | |

Anexo B - Marcadores microsatélites utilizados no estudo.

| Loco SSR | Localização (BIN) | T°C. de Anelamento ¹ | Concentração de primer | "Status" ² | Loco SSR | Localização (BIN) | T° de Anelamento ¹ | Concentração de primer | "Status" ² |
|-----------|-------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------|-------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
| BNGL 182 | 1.00 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | BNGL 180 | 2.06 | 65 - 55 | 0,165µM | NI |
| BNGL 149 | 1.00/1.05 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | BNGL 371 | 2.06/2.10 | 65 - 60 | 0,33 µM | INFOR |
| PHI 056 | 1.01 | 65 - 60 | 0,50 µM | NI | BNGL 198 | 2.08 | 65 - 60 | 0,33µM | INFORM |
| PHI 097 | 1.01 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | MAG01F03 | 2.08 | 65 - 55 | 0,33 µM | IL |
| BNGL 109 | 1.02 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | MAG01A01 | 2.08 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 176 | 1.02 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 029 | 3.04 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR |
| PHI 001 | 1.03 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | NC 030 | 3.04 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| BNGL 439 | 1.03 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | BNGL 602 | 3.04 | 65 - 55 | 0,50µM | NI |
| BNGL 147 | 1.03 | 60 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 073 | 3.05 | 65 - 55 | 0,165µM | IL |
| PHI 095 | 1.03 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI | BNGL 420 | 3.05 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| BNGL 652 | 1.04 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | BNGL 197 | 3.07 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| BNGL 421 | 1.06 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | PHI 072 | 4.01 | 65 - 55 | 0,165µM | NI |
| BNGL 615 | 1.07 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI | NC 004 | 4.03 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| MAGE01F06 | 1.08 | 60 - 55 | 0,33 µM | NI | PHI 021 | 4.03 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| PHI 055 | 1.09 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 074 | 4.04 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| PHI 094 | 1.09 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 079 | 4.05 | 65 - 55 | 0,33 µM | INFOR |
| BNGL 100 | 1.09 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | NC 005 | 4.05 | 65 - 55 | 0,50µM | INFOR |
| PHI 011 | 1.09 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI | PHI 026 | 4.05 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 400 | 1.10/1.12 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 096 | 4.05 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 504 | 1.11 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | BNGL 667 | 4.05 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| BNGL 131 | 1.11 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | BNGL 490 | 4.05 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| PHI 064 | 1.11 | 65 - 55 | 0,50 µM | IL | BNGL 252 | 4.05 | 65 - 55 | 0,165µM | NI |
| BNGL 257 | 1.12 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | MTTGB02 | 4.06/4.07 | 65 - 55 | 0,50 µM | INFOR |
| BNGL 469 | 2.02/7.05/9.03 | 70 - 75 | 0,33 µM | NI | PHI 093 | 4.08 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 125 | 2.03 | 65 - 55 | 0,165µM | IL | PHI 092 | 4.08 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 381 | 2.03 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | BNGL 292A | 4.09/9.06 | 60 - 55 | 0,33 µM | NI |
| PHI 083 | 2.04 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 006 | 4.10 | 65 - 55 | 0,50µM | NI |
| BNGL 166 | 2.04 | 65 - 60 | 0,33 µM | NI | PHI 076 | 4.11 | 65 - 55 | 0,50µM | NI |
| BNGL 108 | 2.04 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | BNGL 589 | 4.10 | 65 - 55 | 0,33 µM | IL |
| BNGL 121 | 2.04 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | PHI 019 | 4.11 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| MAGE05 | 2.05/2.06 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | BNGL 565 | 5 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |

Continua....

| Loco SSR | Localização (BIN) | T°C.de Anelamento | Concentração de primer | "Status" ¹ | Loco SSR | Localização (BIN) | Tº de Anelamento | Concentração de primer | "Status" ¹ |
|-----------|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|-----------|-------------------|------------------|------------------------|-----------------------|
| PHI 024 | 5.00 | 65 - 55 | 0,165µM | INFOR | BNGL 339 | 7.03/7.06 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| MACE00B03 | 5.01 | 55 - 50 | 0,50 µM | INFOR | MACE01F07 | 7.05 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR |
| BNGL 143 | 5.01 | 65 - 55 | 0,165µM | NI | BNGL 572 | 7.06/7.04 | 65 - 60 | 0,33 µM | INFOR |
| PHI 113 | 5.02 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | PHI 082 | 7.06 | 65 - 55 | 0,50 µM | INFOR |
| PHI 008 | 5.03 | 60 - 55 | 0,33µM | NI | MACE01C08 | 8.02 | 60 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 105 | 5.03 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR | BNGL 669 | 8.03 | 65 - 55 | 0,50 µM | INFOR |
| BNGL 557 | 5.03 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI | BNGL 162 | 8.03 | 65 - 55 | 0,50µM | NI |
| BNGL 150 | 5.03/5.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI | BNGL 119 | 8.04 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| BNGL 653 | 5.04 | 70 - 65 | 0,33 µM | NI | PHI 060 | 8.04 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI |
| MACE01A03 | 5.04 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | PHI 115 | 8.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR |
| BNGL 278 | 5.06 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR | PHI 014 | 8.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |
| BNGL 609 | 5.06 | 70 - 65 | 0,50 µM | NI | BNGL 666 | 8.05 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| PHI 085 | 5.07 | 65 - 60 | 0,33 µM | NI | BNGL 162 | 8.05 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |
| BNGL 118 | 5.08 | 65 - 55 | 0,50 µM | INFOR | BNGL 166 | 8.05 | 65 - 60 | 0,33µM | NI |
| BNGL 389 | 5.09 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI | BNGL 240 | 8.06 | 65 - 55 | 0,165 µM | IL |
| PHI 075 | 6.00 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | PHI 080 | 8.08 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| BNGL 238 | 6.01 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR | PHI 015 | 8.08 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR |
| PHI 077 | 6.01 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR | MACT02B08 | 9.01/9.02 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |
| BNGL 107 | 6.01 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI | PHI 028 | 9.01 | 65 - 55 | 0,33 µM | INFOR |
| BNGL 480 | 6.04 | 65 - 60 | 0,50 µM | NI | PHI 068 | 9.01 | 65 - 55 | 0,33µM | INFOR |
| BNGL 345 | 6.05 | 65 - 55 | 0,33µM | INFOR | PHI 033 | 9.01 | 65 - 55 | 0,33µM | INFOR |
| PHI 078 | 6.05 | 65 - 60 | 0,33 µM | NI | PHI 017 | 9.02 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI |
| MACT02E01 | 6.06 | 65 - 60 | 0,50µM | NI | BNGL 244 | 9.02 | 70 - 65 | 0,33 µM | NI |
| PHI 070 | 6.07 | 65 - 60 | 0,33 µM | NI | PHI 065 | 9.02 | 65 - 55 | 0,165 µM | IL |
| PHI 112 | 7.01 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI | MAGE01 | 9.03 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| PHI 057 | 7.01 | 65 - 55 | 0,50 µM | INFOR | PHI 022 | 9.03 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| PHI 034 | 7.01 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI | PHI 027 | 9.03 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| PHI 114 | 7.02 | 65 - 55 | 0,33 µM | NI | PHI 061 | 9.03 | 65 - 55 | 0,33µM | INFOR |
| BNGL 398 | 7.02 | 65 - 55 | 0,50 µM | NI | MACE01E07 | 9.03 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| BNGL 657 | 7.02 | 65 - 55 | 0,50µM | INFOR | MMCO051 | 9.03 | 65 - 55 | 0,50µM | NI |
| BNGL 155 | 7.03 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | MACT02E08 | 9.03 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |

Continua

| | | | | | | | | | |
|----------|-----------|---------|----------|-------|-----------|-------|---------|----------|----|
| BNGL 434 | 9.03 | 65 - 55 | 0,50 µM | INFOR | BNGL 127 | 9.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |
| PHI 042 | 9.04 | 65 - 55 | 0,33µM | NI | PHI 062 | 10.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |
| PHI 040 | 9.05 | 65 - 60 | 0,33µM | NI | PHI 071 | 10.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |
| BNGL 430 | 9.04 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR | BNGL 640 | 10.04 | 70 - 65 | 0,50 µM | NI |
| BNGL 128 | 9.07 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI | PHI 084 | 10.04 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| BNGL 619 | 9.07/9.08 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | BNGL 137 | 10.05 | 65 - 55 | 0,33µM | NI |
| PHI 059 | 10.02 | 65 - 55 | 0,165 µM | INFOR | BNGL 153 | 10.06 | 70 - 65 | 0,33 µM | NI |
| PHI 063 | 10.02 | 65 - 55 | 0,50µM | NI | MACT02B10 | - | 65 - 55 | 0,33 µM | IL |
| BNGL 210 | 10.03 | 65 - 55 | 0,165 µM | NI | MAG1E07 | - | 65 - 55 | 0,165 µM | NI |

[†] -Status quanto ao polimorfismo nos 'bulks' - INFOR - loco informativo; IL - loco informativo com suspeita de estar ligado ao gene de resistência; NI - loco não informativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. Plant Pathology, 4 ed. Academic Press: 1997, 635p.

AGROCERES. Guia Agroceres de Sanidade. São Paulo. Sementes Agroceres S/A. 1996.

AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.61-67, 1997.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M.. **Introductory mycology** 4 ed. Jonh Wiley & Sons, Inc.: New York. 598-635, 1996.

ARNHEIM, M.S.; BRAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p. 1131-1139, 1992.

- BAILEY, B.A.; SCHUNH, W.; FREDERIKSEN, R.A.; BOCKHOLT, A.J.; SMITH, J.D. Identification of slow-rusting resistance to *Puccinia polysora* in maize inbreds and single crosses. **Plant Disease**, v.71, p.518-521, 1987.
- BROWES, J.E.; DANGI, G.S.; VIGNANI, R. MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, v.39, p.628-633, 1996.
- CHAGUÉ, V.; MERCIER, J.C.; GUÉNARD, M.; COURCEL, A. de; VEDEL, F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw-5 in tomato by bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.1045-1051, 1996.
- CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SMITH, J.S.C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allelic variation. **Genome**, v.39, p.866-873, 1996.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v.34, p.66-71, 1991.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. - numbers, genomic, distribution and types of genes action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987

FANCELLI, A.L. Plantas alimentícias - Guia prático para aulas, estudos e discussões.: Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", 131p., 1986.

FERNANDES, F.T.; BALMER, E. Situação das doenças de milho no Brasil. In: **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte. v.14 p.35-37, 1990.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças da cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA. 1997, p.12-21

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FUTRELL, M.C. *Puccinia polysora* epidemics on maize associated with cropping practice and genetic homogeneity. **Phytopathology**, v.65, p.1040-1042, 1975.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. **Current Science**, v.70, n.1, p.45-54. 1991.

HEARNE, C.M.; GHOSH, S.; TODD, J.A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics**, v.8, p.288-294, 1992.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ DE LEON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. 2.ed. Mexico: CIMMYT, 1994, 51p.

HOLLAND, J.B.; UHR, D.V.; JEFFERS, D.; GOODMAN, M.M. Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical-by-corn-belt maize populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.232-241, 1998.

HOLLIER, C.A.; KING, S. B. Effects of temperature and relative humidity on germinability and infectivity. **Plant Disease**, v.69, p.937-939, 1985.

HOOKER, A.L. The genetics and expression of resistance in plants to rust of the genus *Puccinia*. **Annual Review of Phytopathology**, v.5, p.163-163, 1967.

HUANG, N.; ANGELES, E.R.; DOMINGO, J.; MAGPANTAY, G.; SINGH, S.; ZHANG, G.; KUMARAVADIVEL, N.; BENNETT, J.; KHUSH, G.S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical and Applied Genetics**. n. 95, p.313-320, 1997.

KESSELI, R.; HANNEKE, W.; STANGHELLINI, M.; VANDERMARK, G.; MICHELMORE, R. Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radicis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.722-728, 1993.

KERNS, M.R.; DUDLEY, J.W.; RUFENER II, G.K. QTL for resistance to common rust and smut in maize. **Maydica**. n. 44, p.37-45, 1999.

KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos**. v-1, 3 ed.: Ceres, 1995, 46-95p.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.206-211, 1995.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology Evolution**, v.4, p.203-221, 1987

LEWIN, B. **Gene**. New York,: Oxford Universit press V.6, cap.3, p.51-70. 1997

- LIN, J.Z.& RITLAND, K. The effects of selective genotyping on estimates of proportion of recombination between linked trait loci. **Theoretical and Applied Genetics** V.93, p.1261-1266, 1996.
- LUBBERSTEDT, T.; KLEIN, D.; MELCHINGER, A.E. Comparative quantitative trait loci mapping of parcial resistance to *Puccinia sorghi* across four populations of european flint maize. **Phytopathology**. v. 88, n.12, 1998.
- LUKE, H.H.; BARNETT, R.D.; PFAHLER, P.L. Incidence of horizontal resistance to crown rust in oat. **Phytopathology**, v.65, p.631-632, 1975.
- McMULLEN, M.D.; SIMCOX, K.D. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, n.6, p.811-815, 1995a.
- McMULLEN, M.D.; SIMCOX, K.D. Clustering of disease resistance loci in the maize genome. **Newsletter**, n.69, p.52-53, 1995b
- MELCHINGER, A. E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, v.104, p.1-19, 1990.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.88, p.9828-9832, 1991

MOREIRA, L.A.; MOLLEMA, C; VAN HEUSDEN, S. Search for molecular markers linked to *Liriomyza trifolii* resistance in tomato. **Euphytica**. n. 109, p/149-156, 1999.

MORGANTE, M.; OLIVIERI. 1993 Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome**, v.36, p.884-889, 1993.

OGLIARI, J.B. Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs através do uso de marcadores moleculares microssatélites. Piracicaba, 1999. 114p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, universidade de São Paulo.

OGLIARI, J.B.; BOSCARIOL, R.L. & CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, n.23, p.395-398, 2000.

OLIVEIRA, A.C.; RICHER, T.; BENNETZEN, J.L. Regional and racial specificities in sorghum germoplasm assessed whit DNA markers. **Genome**, v.39, p.579-587, 1996.

PEREIRA, O.A.P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. **Anais do 12º encontro sobre temas de genética e melhoramento**. p.25-30. 1995.

RAID, R.N.; PENNYPACKER, S.P.; STEVENSON, R. E. Characterization of *Puccinia polysora* epidemics in Pennsylvania and Maryland. **Phytopathology**, v.78, p.579-585, 1998.

RHIND, D., WATERSTON J.M.; DEIGHTON, F.C. 1952. Occurrence of *Puccinia polysora* Underw in West Africa. **Nature**, v.169, p.631. 1952.

ROBERT, A.L. Host ranges and races of the corn rusts. **Phytopathology**, v.52, p.1010-1015,1962.

RODRIGUES-ARNON, R.; SCOT, G.E.; KING, S.B. Maize yield losses caused by southern corn rust. **Crop science**, v. 20, p.812-814, 1980.

RONGWEN, J.; CREGAN, P.B.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U. The use of simple sequence repeat DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p.43-48, 1995.

SAGHAI-MAROOF, M.; BIYASHEV, R.M.; YANG, G.P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R.W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.91, p.5466-5470, 1994

SCOTT, G.E.; ZUMMO, N. Effect of genes with slow-rusting characteristics on southern corn rust in maize. **Maize newsletter**, v. 70, p.50-54, 1989

SENIOR, M.L.; CHIN,E.; AUSTIN, D.; LEE, M.; SMITH, S. Mapping Simple Sequence Repeats in maize. **Maize Newsletter**. v.70, p.50-54, 1996.

SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn disease**. 2ed. Urbana: American Phytopathological Society. 1980, 105p.

SILVA, H.P. Incidência de doenças fúngicas na "safrinha". In: DUARTE, A.P., Coord. **IV seminário sobre a cultura do milho "Safrinha"**. Campinas, IAC/CDV, p. 81-86, 1997.

SIMCOX, K.D.; BENNETZEN, J.L.; The use of molecular markers to study *Septosphaeria turcica* resistance in maize. **Phytopathology**, v.83, p.1326-1330, 1993.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v.31, p.729-741, 1996

STOREY, H.H.; HOWLAND, A.K. Resistance in maize to the tropical american rust fungus *Puccinia polysora*. **Heredity**, v.13, p.61-65, 1959.

TIMMERMAN-VAUGHAN, G.M.; McCALLUM, J.A.; FREW, T.J.; WEEDEN, N.F.; RUSSELL, A.C. Linkage mapping of quantitative trait loci controlling seed weight in pea (*Pisum sativum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, n. 93, p.431-439, 1996.

ULLSTRUP, A.J. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to an american race of *Puccinia polysora*. **Phytopathology**, v. 55, p.425-428, 1965

ULLSTRUP, A.J. Diseases of corn, In: SPRAGUE, G.F (Ed). **Corn and Corn Improvement**. American society of Agronomy Press: Madison, 1977, p.

VOGEL, J.M. Application of molecular markers to plant breeding and genetics.

In: Thirty-third of Illinois Corn Breeders' School, University of Illinois at Urbana-Champaign. **Anais**. Urbana-champaign: Marc-Apr 1997. p.56-68.

VON MEYER, W.C. The influence of storage conditions on the longevity of uredospores of *Puccinia polysora* Underw. and *Puccinia sorghi* Schw. **Plant Disease**, v.47, p.614-616, 1963.

VON PINHO, R. G. Metodologias de avaliação, quantificação de danos e controle genético da resistência a *Puccinia polysora* Underw., e *Physopella zae* (Mains) Cummins e Ramachar na cultura do milho. Lavras, 1998. 137p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras.

WU, K.S.; TANSKLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular General Genetics**. V.241, p.225-235, 1993.

YU, Y.G.; SAGHAI MARROF, M.A.; BUSS, G.R.; MAUGHAN, P.J.; TOLIN, S.A.. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopathology**, v.84, n.1, p.60-64, 1994.

ZHANG, Q.; SHEN, B.Z.; DAÍ, X.K.; MEI, M.H.; SANGHAI MAROOF, M.A., LI, Z.B. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 91, p.8675-8679, 1994.

ZUMMO, N. Components contributing to partial resistance in maize to *Puccinia polysora*. **Plant Disease**, v.72, p.157-160, 1988.