

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 14

Identificação de QTLs para tolerância ao encharcamen- to em milho utilizando microssatélites

Sérgio Delmar dos Anjos e Silva
José Fernandes Barbosa Neto
Claudia Fernanda Lemons e Silva
Maria Jane Cruz de Melo Sereno
Antônio Costa de Oliveira

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 Km 78

Caixa Postal 403, CEP 96001-970 - Pelotas, RS

Fone: (53) 275 8199

Fax: (53) 275 8219 - 275 8221

Home page: www.cpact.embrapa.br

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro

Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Vernetti Azambuja, Cláudio José da Silva Freire, Luís Antônio Suíta de Castro

Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Revisores de texto: Sadi Macedo Sapper/Ana Luiza Barragana Viegas

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Edição eletrônica: Oscar Castro

foto da capa: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

1a edição

1a impressão (2005): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Identificação de GTLs para tolerância ao encharcamento em milho utilizando microssatélites / Sérgio Delmar dos Anjos e Silva... [et al.]. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005.
23 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 14).

ISSN 1678-2518

1. Milho - Zea mays - Tolerância a encharcamento - Marcador molecular - SSR - QTL. I. Silva, Sérgio Delmar dos Anjos e . II. Série.

CDD 633.15

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	15
Conclusões	19
Referências Bibliográficas	20

Identificação de QTLs para tolerância ao encharcamento em milho utilizando microssatélites

Sérgio Delmar dos Anjos e Silva¹
José Fernandes Barbosa Neto²
Claudia Fernanda Lemons e Silva³
Maria Jane Cruz de Melo Sereno
Antônio Costa de Oliveira⁵

Resumo

A introdução de culturas de sequeiro em solos de várzea é importante para o desenvolvimento da região Sul do Brasil, uma vez que estas áreas estão subaproveitadas com a cultura de arroz irrigado e a pecuária extensiva. O milho é uma alternativa para o melhor aproveitamento destas terras, logo o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao encharcamento do solo é fundamental para viabilizar esta exploração. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram estudar a genética da tolerância ao encharcamento e identificar marcadores de DNA associados a esse caráter. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, sendo analisados genitores, híbridos F₁ e populações segregantes provenientes de cruzamentos entre linhagens tolerantes e sensíveis ao encharcamento do solo. A análise molecular, através de marcadores de microssatélites, foi realizada com uma população F₃, resultante do cruzamento entre os genótipos mais contrastantes para a tolerância ao encharcamento. A seleção dos marcadores obedeceu ao critério de amostrar todos os cromossomos, com preferência aos que estivessem ligados a genes pertencentes a rotas metabólicas envolvidas com a glicólise e a fermentação. Os genitores demonstraram a existência de variabilidade genética para os caracteres matéria seca de parte aérea (MSP) e matéria seca de raiz (MSR), sendo

¹ Eng. Agrôn. Dr. Embrapa Clima Temperado. E-mail: sergio@cpact.embrapa.br

² Eng. Agrôn. PhD E-mail: barbosa@ufrgs.com.br

³ Eng. Agrôn. Dr. - UFPel E-mail: lemons@terra.com.br

⁴ Bióloga Dr. Prof. - UFRGS E-mail: acosta@ufpel.tche.br

⁵ Eng. Agrôn. PhD Prof. - UFPel E-mail: 00003308@ufrgs.br

que as herdabilidades estimadas foram elevadas. Ambos os caracteres revelaram complexidade quanto ao número de genes envolvidos, onde a análise de QTL indicou a presença de pelo menos três locos envolvidos na manifestação da tolerância ao encharcamento. Três marcadores explicaram conjuntamente 33,3% da variação para MSP e 19,9% para MSR, podendo ser úteis na seleção assistida para a tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem em milho. De maneira geral, a seleção fenotípica para MSP e MSR poderá ser uma alternativa eficiente na seleção de genótipos de milho com tolerância ao encharcamento do solo.

Termos para indexação: Zea mays, flooding tolerance, SSR, QTL.

Edentification of QTLs for flooding tolerance in maize utilizing microsatellites

Abstract

The introduction of upland crops in lowland areas is important for the development of southern Brazil, since these areas are underexploited, being lowland rice and extensive cattle among the few existing alternatives for farmers. The maize crop would be an important culture for better using these lands, once flooding tolerant genotypes are available. Therefore, the objectives of this work were to study the genetics of flooding tolerance and to identify associated DNA markers. The work was carried out in a greenhouse, being analyzed parents, F_1 hybrids and segregating populations originating from crosses between soil flooding tolerant and sensitive inbred lines. The molecular analysis was performed with microsatellite markers on a F_3 population, resulting from the crossing between the most contrasting genotypes for flooding tolerance. The selection of markers aimed to cover all maize chromosomes, with preference to those linked to genes belonging to the metabolic pathways involved with the glycolysis and fermentation. The comparison of parents indicated the existence of genetic variability for the characters shoot dry matter (SDM) and root dry matter (RDM), and the estimated heritability was high. Both characters revealed complexity regarding the number of genes involved, where the QTL analysis indicated the presence of at least three loci involved in the flooding tolerance. A set of three markers explained together 33.3% and 19.9% of the variation for SDM and RDM, respectively, and could be useful in the selection for flooding tolerance in young maize plants. In general, the phenotype selection for SDM and RDM can be an efficient alternative in the selection of maize genotypes with flooding tolerance.

Index terms : *Zea mays*, *flooding tolerance*, *SSR*, *QTL*.

Introdução

A tolerância ao encharcamento está relacionada com a ação coordenada de adaptações morfológicas, anatômicas e bioquímicas (Bucher & Kuhlemeier, 1993). Kennedy et al. (1992) indicaram que o estresse anaeróbico, determinado pelo encharcamento do solo, induz mudanças no padrão protéico em várias espécies, devido à dissociação dos poliribossomos, impossibilitando a tradução do mRNA. Um grupo de 20 polipeptídios anaeróbicos (ANP's), designado por Sachs et al. (1980), foi seletivamente sintetizado em raízes primárias de milho, após cinco horas de anoxia. Ao mesmo tempo, a síntese de proteínas aeróbicas foi significativamente reprimida. Esses polipeptídios anaeróbicos têm sido bastante estudados em milho e, de maneira geral, estão envolvidos na glicólise e fermentação (Lazlo & Lawrence, 1983; Kennedy et al., 1992; Andrews et al., 1993). Segundo Crawford (1992), o fenômeno mais associado com o déficit de oxigênio é a indução da síntese e da atividade da enzima ADH, confirmando os dados de Sachs & Freeling (1978), onde esta enzima foi o principal polipeptídio anaeróbico sintetizado.

O estresse anaeróbico pode reduzir significativamente a sobrevivência e o crescimento de plântulas em solos alagados. A maioria dos genótipos de milho sobrevive até três dias de tratamento anaeróbico a 27°C (Subbaiah & Sachs, 2003). Por outro lado, mutantes que são nulos para a atividade de ADH sobrevivem somente poucas horas. Resultados de cruzamentos entre genótipos tolerantes e sensíveis sugerem que o caráter tolerância à anoxia é dominante e apresenta segregação simples (Sachs et al., 1996).

Avanços ao nível molecular têm sido feitos através da análise de vários cDNAs e genes envolvidos na resposta anaeróbica (Sachs, 1994; Sachs et al., 1996). Até recentemente, os únicos genes descritos em plantas que eram induzidos em condição de anoxia ou hipoxia, codificam enzimas do metabolismo da glicose fosfato, principalmente glicólise e fermentação (Sachs, 1993; Sachs, 1994; Sachs et al., 1996). Atualmente, Subbaiah & Sachs (2003) estão desenvolvendo linhagens tolerantes à anoxia para análise de genes envolvidos com este caráter. Recentemente, foram descritos três sistemas de genes que parecem funcionar fora da rota glicolítica (Huq & Hodges, 2000).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites vêm sendo usados com muito sucesso em milho (Taramino & Tingey, 1996; Smith et al., 1997; Lubberstedt et al., 1998; Pejic et al., 1998). Diversos trabalhos de mapeamento de caracteres de importância agrônômica em milho foram publicados, como rendimento de grãos (Stuber et al., 1992; Veldboom & Lee, 1994; Ajmone et al., 1995;), estatura de planta (Beavis et al., 1991; Koester et al., 1993), ciclo (Koester et al., 1993; Ribaut et al., 1996), altura de inserção de espiga (Veldboom et al., 1994) e qualidade de amido e proteína (Goldman et al., 1993). Nestes trabalhos têm sido identificadas regiões associadas com a herança de caracteres quantitativos (QTL) com ação gênica de sobredominância e pleiotropia.

A dificuldade em definir os marcadores que devem ser empregados e o efeito do ambiente na análise de QTL têm retardado o avanço desta técnica em programas de melhoramento de plantas. No caso do milho, muitos marcadores de microssatélites estão disponíveis no *Maize DB* (<http://www.agron.missouri.edu>). A partir destes marcadores, foi realizado este trabalho, que teve por objetivo identificar QTL envolvidos na tolerância ao encharcamento do solo em plantas jovens de milho.

Material e Métodos

A análise fenotípica e a coleta de folhas para a extração de DNA foram realizadas em um experimento em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) no período de dezembro de 2001 a janeiro de 2002. No total, foram avaliadas 117 famílias F_3 provenientes de cruzamentos entre duas linhagens de milho, uma tolerante (R2) e a outra sensível (S5) ao encharcamento do solo. Foram avaliados também os

genitores e duas testemunhas, os híbridos triplos comerciais AG 5011 e BRS 3060. Esses dois híbridos foram escolhidos por serem testemunhas na rede de experimentação para os ensaios de milho em várzea.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com duas repetições, sendo semeadas 12 sementes por repetição para cada família F_3 . A semeadura foi realizada em copos plásticos de 200ml perfurados na base e preenchidos com solo contendo 20% de areia. Os copos foram colocados em tanques de madeira, revestidos com lona plástica para evitar a saída da água. Um dia antes da semeadura, foi colocada uma lâmina de água de 4cm. Nessas condições, foram semeadas três sementes por copo, com o embrião voltado para cima, a uma profundidade de 2cm, aproximadamente.

Após oito dias da emergência, foi coletada uma folha de todas as plantas de cada linha F_3 e formado um *bulk* para representar a planta F_2 de origem. O DNA para a análise molecular foi extraído desse *bulk*. Logo após a coleta das folhas, foi aplicada adubação de cobertura na proporção de 120kg/ha de uréia. Aos 22 dias da emergência das plantas foi realizada a inundação, a qual foi mantida por quatro dias, com lâmina de 1cm de água acima do nível dos copos. Depois deste período de inundação, foi drenado o excesso de água das caixas e as plantas foram mantidas com uma lâmina de 1cm de água por sete dias, sendo, após, colhido o experimento. A parte aérea e a raiz de cada planta foram colhidas separadamente, sendo em seguida colocadas em estufa a 60°C por cinco dias para a avaliação do peso seco. Os caracteres avaliados no experimento foram matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSP). Os dados de MSP e MSR foram submetidos à análise de variância, utilizando o modelo de efeitos aleatórios, o qual permitiu a estimativa de variâncias e da herdabilidade (Paterniani & Miranda Filho, 1980). A variância entre progênies F_3 é dada por: $\sigma_A^2 + (1/4 \sigma_D^2) + \epsilon$ onde ϵ é o erro experimental (Hallauer & Miranda, 1988).

A análise com microssatélites foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia/ UFRGS. A escolha dos *primers* foi realizada a partir da base de dados de milho (*Maize DB*), sendo testados 44 pares. A seleção dos *primers* obedeceu ao critério de amostrar todos os cromossomos, com preferência

aos que estivessem ligados a genes pertencentes a rotas metabólicas envolvidas com a glicólise e a fermentação (Tabela 1).

A análise genotípica foi realizada em 74 linhas F_3 selecionadas entre as mais contrastantes em relação às variáveis MSP e MSR. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Edwards et al. (1991). As reações de PCR foram preparadas para um volume de 25ml. Cada mistura de reação continha: 60ng de DNA genômico; Tampão 10X (Gibco BRL); 1,5mM de $MgCl_2$ (Gibco BRL); 0,2mM de dNTP (Gibco BRL); 1U de Taq-DNA Polimerase (Gibco BRL); 0,2ml de cada oligonucleotídeos iniciadores. As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC-100, MJ Research, Inc.). O programa utilizado para a amplificação do DNA genômico foi do tipo *touchdown* que consistiu de 18 ciclos de 94°C por 1 minuto seguido de um decréscimo de 1°C a cada 2 ciclos (64°C a 55°C) e 72°C por 1 minuto e mais 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C também por 1 minuto. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 3% e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada com brometo de etídio em transiluminador. As imagens dos géis foram capturadas com o programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

Os fragmentos amplificados nas progênies F_3 foram identificados conforme a similaridade com os genitores, sendo consideradas homocigotos iguais ao genitor R2, homocigotos iguais ao genitor S5 ou heterocigotos.

Tabela 1. *Primers* de microssatélites utilizados na análise molecular de linhas de milho visando à identificação de QTL para tolerância ao encharcamento do solo. UFRGS, 2003.

Primer	Gene ligado ao marcador	Cromos- somo	Bin*
phi037	umc 128	1	1,08
umc1726	adh1 - álcool desidrogenase1	1	1,10
umc1064	fdx3 - ferredoxina 3	1	1,11
umc1622	crr1 - regulador resposta a Citocinina	2	2,0-2,01
umc1185	ole1 - oleosina1	2	2,03
phi029	tpi4 - triosefosfato isomerase 4	3	3,04
phi046	npi 257 ^a	3	3,08
umc1010	plt2 - proteína fosfolopídio transferase homól-	3	3,09
nc004	adh2 - álcool desidrogenase2	4	4,03
phi021	adh2 - álcool desidrogenase2	4	4,03
umc1550	pdi1 - proteína dissulfito isomerase1	4	4,03
phi074	zp22.1 - zeína 22.1	4	4,04
nc005	gpc1 - gliceraldeído3 fosfato desidrogenase1	4	4,05
phi026	gpc1 - gliceraldeído3 fosfato desidrogenase1	4	4,05
phi079	gpc1 - gliceraldeído3 fosfato desidrogenase1	4	4,05
umc1466	pdh1 - piruvato desidrogenase1	4	4,08
umc1173	rpd3 - histona diacetilase homóloga	4	4,09
phi006	cat3 - catalase3	4	4,11
umc1197	cat3 - catalase3	4	4,11
umc1610	cpn10 - chaperonina10	4	4,11
umc1056	px13 - peroxidase13	5	5,03
phi008	rab15 - resposta ao ácido abscísico	5	5,03
umc1564	rps15 - proteína ribossomal15	5	5,03
phi085	gln4 - glutamina sintetase4	5	5,06
umc1023	fdx2 - ferredoxina2	6	6,00
umc1018	gpc2 - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase2	6	6,01
nc012	pdk1 - piruvato ortoquinase diquinase1	6	6,05
phi081	pdk1 - piruvato ortoquinase diquinase1	6	6,05
umc1341	roa2 - origem de replicação ativador2	6	6,06
umc 1546	hsp3 - proteína tolerância choque de calor3	7	7,00
umc1627	oec23 - complexo 23 envolvimento o2	8	8,03
umc1741	rps28 - proteína ribossomal	8	8,03

Continuação.... Tabela 1.

Primer	Gene ligado ao marcador	Cromos- somo	Bin*
umc1172	pdh1 - piruvato	8	8,04
phi060	rip1 - inativador da proteína1 do ribossomo	8	8,04
umc1202	rip1 - inativador da proteína1 do ribossomo	8	8,04
phi015	gst1 - glutathione s-transferase1	8	8,08
phi065	pep1 - fosfoenolpiruvato	9	9,03
phi016	sus1 - sacarose sintetase1	9	9,04
phi032	sus1 - sacarose sintetase1	9	9,04
umc1094	sod9 - superóxido dismutase9	9	9,05
umc1733	hb1 - haemoglobina1	9	9,06
umc1576	Gdcp1 - glicina descarboxilase1	10	10,02
phi071	hsp90 - proteína de choque de calor 90 kda	10	10,04
umc1344	crr2 - regulador2 de resposta a citocinina	10	10,07

* Bin: medida de localização do marcador dentro de cada cromossomo no mapa do milho. O bin está designado no lado direito, parte decimal, e o cromossomo à esquerda, parte inteira.

A identificação de QTL foi através da análise por ponto, a qual consiste no estabelecimento de uma relação estatística entre cada marcador e o fenótipo dos indivíduos. Os dados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \mu_i$, onde Y_i = valor fenotípico da i ésima linha F_3 para os caracteres MSP ou MSR, X_i = valor genotípico da i ésima linha F_3 , β_0 , β_1 = parâmetros da análise e μ_i = erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. Sempre que a estimativa do parâmetro β_1 foi significativa pelo teste de F a 5% de probabilidade, o marcador em questão foi considerado como associado à herança do caráter.

Resultados e Discussão

Os resultados indicaram a existência de variabilidade genética entre as famílias F_3 testadas para os caracteres MSP e MSR (Tabela 2). A linhagem R2, classificada como tolerante ao encharcamento, não diferiu significativamente dos híbridos testemunha para a variável MSP, mas diferiu da linhagem S5, sensível ao encharcamento, e da média da população F_3 . Para a variável MSR, a linhagem S5 foi a que produziu menos, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Esses resultados confirmam o comportamento contrastante entre os genitores e apóiam o uso deste cruzamento para o mapeamento genético. Em relação ao comportamento das linhagens e dos híbridos comerciais, Fausey & McDonald (1985) indicaram que linhagens eram mais tolerantes ao encharcamento do que variedades híbridas. Por outro lado, Lemke-Keyes & Sachs (1989) observaram que a resposta de linhagens e híbridos parentais para tolerância ao estresse anaeróbico era similar, quando avaliada na fase de pré-emergência das plântulas. Em trabalho anterior, Silva et al. (2001) demonstraram a ocorrência de acentuada heterose e efeito materno para a tolerância ao encharcamento em híbridos F_1 , discordando das afirmações daqueles autores. Provavelmente, as combinações avaliadas e o genótipo empregado como genitor feminino foram decisivos na manifestação da heterose.

Com base na análise de variância, utilizando o quadrado médio entre famílias, foram estimadas as variâncias fenotípicas e genéticas, bem como o valor de herdabilidade para as características MSP e MSR. A herdabilidade estimada para MSP foi de 0,95 e para MSR foi de 0,93 (Tabela 3). Esses valores indicam uma reduzida influência do ambiente na manifestação de ambos os caracteres; no entanto, é importante considerar que a interação genótipo x ambiente não foi avaliada, sendo que os valores estimados podem estar inflacionados por essa interação.

Tabela 2. Média e desvio padrão de matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR), para genitores, população F₃ e testemunhas (híbridos comerciais). Embrapa Clima Temperado, 2002. UFRGS, 2003.

Genótipo	MSP (mg)		MSR (mg)	
	Média ¹	Desvio padrão	Média ¹	Desvio padrão
R2	338,12 ab	0,884	251,25 a	1,768
S5	207,27 c	0,598	97,67 b	2,203
F ₃	232,17 c	54,951	160,47 ab	48,740
AG 5011	423,00 a	0,661	224,15 a	0,874
BRS 3060	286,98 bc	18,470	218,52 a	4,018

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Estimativas de variância fenotípica (σ^2_p), variância genética (σ^2_G) e herdabilidade (h^2) para matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) das famílias F₃. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2002. UFRGS, 2003.

Parâmetro	MSP	MSR
σ^2_p	0,408	0,177
σ^2_G	0,389	0,166
h^2	0,95	0,93

O polimorfismo entre os genitores R2 e S5 para os 44 marcadores testados foi de 72,7%. Este nível de polimorfismo era esperado, uma vez que a escolha dos marcadores foi direcionada para marcadores ligados a genes envolvidos na glicólise e fermentação. No entanto, diversos marcadores associados a genes de importância para essas rotas metabólicas foram monomórficos entre os genitores analisados. Como exemplo, é possível citar o marcador umc1726, ligado ao gene *adh1*, o qual é muito importante na fermentação alcoólica, o phi006 e o umc1197, ligados aos genes *cat3*, que codificam para a enzima catalase 3, o phi065, ligado ao gene *pep1*, que codifica para enzima fosfoenolpiruvato, sendo ambas as enzimas envolvidas na glicólise, e o phi016 e o phi032, ligados ao gene *sus1*, que codifica para a enzima sacarose sintetase 1. Este

comportamento monomórfico não significa que estes genes apresentem o mesmo produto final em cada genitor, uma vez que sua regulação pode ser diferente em cada um, resultando em produtos finais distintos. Da mesma forma, o gene, mesmo presente, pode não estar ativo ou estar parcialmente ativado. De qualquer forma, esses marcadores não foram considerados importantes na análise realizada, pois não segregaram no cruzamento estudado.

Neste estudo foram identificados três QTL para MSP e dois para MSR (Tabela 4). Para MSP, o QTL de maior efeito foi localizado no cromossomo 5 próximo ao marcador phi085, o qual exibiu efeito gênico de dominância. Por outro lado, este marcador não foi significativo para a variável MSR, sugerindo que este loco é específico para parte aérea. O segundo maior QTL para MSP foi localizado próximo ao marcador phi074. Este QTL foi também significativo para MSR, sendo que, para as duas variáveis, o acúmulo de matéria seca estava ligado ao genótipo do genitor tolerante. O último QTL identificado também foi significativo para ambos os caracteres, sendo localizado próximo ao marcador phi029. Da mesma forma, para o segundo QTL, o principal efeito gênico envolvido foi o de dominância.

Tabela 4. Localização cromossômica de três marcadores relacionados a QTL para matéria seca da parte aérea (MSP) e para a matéria seca da raiz (MSR), valor genotípico médio do genitor tolerante, híbrido e do genitor sensível, valor da probabilidade e do coeficiente de determinação. UFRGS, 2003.

Cr/Bin	Marcador	Variável	Genitor tolerante	Híbrido	Genitor sensível	Valor P	R ²
3,04	Phi029	MSP	257	210	213	0,01	0,14
		MSR	180	146	138	0,03	0,11
4,04	Phi074	MSP	263	217	212	0,01	0,15
		MSR	184	147	161	0,04	0,11
5,06	Phi085	MSP	228	238	167	0,01	0,16
		MSR	158	161	140	0,60	0,02

R² = proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL.

O QTL identificado através do marcador phi029, localizado no cromossomo 3, explicou 14% da variação para matéria seca da parte aérea (MSP) e 11% da matéria seca da raiz (MSR). Este marcador está ligado ao gene da triose fosfato isomerase 4, enzima que catalisa a isomerização do gliceraldeído fosfato à di-hidroxiacetona fosfato, para a formação de triose fosfato no ciclo de Calvin. Sua atuação está localizada no cloroplasto e no citosol tendo importância na glicólise (Heldt, 1997). O segundo QTL, encontrado com o marcador phi074, está ligado ao gene zp22.1 e explicou 15% da variação total para MSP e 11% da variação para MSR. Este QTL, localizado no cromossomo 4, é ligado com um grupo de genes de alfa-zeínas e está a 2,5cM do loco do gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase 1, que é um gene estrutural envolvido na resposta ao estresse anaeróbico em milho (Subbaiah & Sachs, 2003). O último QTL identificado, phi085, explicou 16% da variação para MSP e apenas 2% para MSR (Tabela 4). Este marcador está ligado ao gene gln4, também estrutural, sendo considerado um gene que pode influenciar no rendimento de grãos e, conseqüentemente, no tamanho da semente, que tem grande importância na eficiência da germinação. O gln4 é expresso constitutivamente durante a germinação da semente e em tecidos vegetativos (Sakakibara et al., 1992). Um QTL localizado na mesma região foi identificado para peso de mil grãos, refletindo no desempenho agrônômico de híbridos de milho (Limani et al., 2002).

Por outro lado, marcadores que foram polimórficos, ligados a genes importantes na glicólise e fermentação alcoólica, não foram significativos na análise de QTL; entre esses podem ser citados: umc1622-*crr1*, phi021-*adh2*, umc1466-*pdh1*, umc1056-*px13*, umc1546-*hsp3*, umc1627-*oec23*, umc1172-*pdh1*, umc1094-*sod9*, umc1733-*hb1*, phi071-*hsp90* e umc1344-*crr2*. Esse comportamento também pode estar associado à regulação destes genes ou a erro de amostragem que reduz a precisão estatística.

Marcadores moleculares de DNA não sofrem a influência do ambiente; portanto, o R^2 do modelo da regressão múltipla pode ser considerado como a proporção da variação genética explicada em relação ao total da variação fenotípica observada. Por outro lado, Anderson et al. (1993) usaram uma estimativa da proporção da variação genética explicada em relação ao total da variação genética presente, obtida da herdabilidade (R^2/h^2). Essa estatística é importante, do ponto de vista do melhoramento de plantas, porque indica a confiança do modelo de locos múltiplos para seleção genotípica. Segundo Barbosa Neto et al. (2001), modelos eficientes de locos múltiplos para seleção assistida por marcadores deveriam ter altos valores para a R^2/h^2 . Neste trabalho, o R^2 para a regressão múltipla foi de 31,7% para MSP e 18,6% para MSR. A partir destes valores, foi estimado quanto da variância genética era explicada pelos três QTL identificados, que constou de 33,3% para MSP e 19,9% para MSR. Portanto, como as herdabilidades são altas, a proporção da variação genética explicada pelos QTL foi relativamente baixa, principalmente, para a MSR. Isto indica que outros QTL de menor valor podem também estar envolvidos na determinação destes caracteres.

Conclusões

A análise de QTL demonstrou a participação de três locos, os quais explicaram conjuntamente 33,3% da variação para MSP e 19,9% para MSR. Esses resultados indicam que outros genes de menor efeito estão segregando nos genitores e estão de acordo com as análises quantitativas também realizadas. Os resultados sugerem que a seleção fenotípica em plantas jovens pode ser uma alternativa eficiente para a seleção de genótipos tolerantes ao encharcamento do solo em milho, devido à elevada herdabilidade estimada. No entanto, a seleção assistida por marcadores moleculares necessita de um maior número de QTL identificados, uma vez que a percentagem de explicação de variação genética, obtida com os locos encontrados é insuficiente para justificar os custos de laboratório.

Referências Bibliográficas

AJMONE, M.P.; MONFREDINI, G.; LUDWIG, W. et al. In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation for grain yield. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p. 415-424, 1995.

ANDERSON, J.A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to pre-harvesting sprouting in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 33, p.453-459, 1993.

ANDREWS, D.L.; COBB, B.G.; JOHNSON, J.R.; DREWS, M.C. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 407-414, 1993.

BARBOSA NETO, J.F.; SIRIPOONWIWAT, W.; O'DONOUGHUE, L.S. et al. Chromosomal regions associated with barley yellow dwarf virus resistance in oat. **Euphytica**, Wageningen, v. 114, p. 67-76, 2001.

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 141-145, 1991.

BUCHER, M.; KUHLEMEIER, C. Long term anoxia tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 441-448, 1993.

CRAWFORD, R.M.M. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. **Advances in Ecological Research**, London, v. 23, p. 93-185, 1992.

EDWARDS, K.; JOHSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, p. 1349, 1991.

FAUSEY, N.R.; MCDONALD, M.D. Jr. Emergence of inbred and hybrid corn following flooding. **Agronomy Journal**, Madison, v. 77, p. 51-56, 1985.

- FREELING, M. Isozyme systems to study gene regulation during development: a lecture. In: TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983, p. 61-84.
- GOLDMAN, I.L.; ROCHEFORD, T.R.; DUDLEY, J.W. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois Long Term Selection maize strains. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, p. 217-224, 1993.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2.ed. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468 p.
- HELDT, H.W. **Plant biochemistry & molecular biology**. New York: Oxford University Press, 1997. 522 p.
- HUQ, E.; HODGES, S.C. An anaerobically inducible early (*ai1*) gene family from rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, p. 591-601, 2000.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 1-6, 1992.
- KOESTER, R.; SISCO, P.; STUBER, C. Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenic lines of maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 1209-1216, 1993.
- LAZLO, A.; LAWRENCE, P.S. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 192, p. 110-117, 1983.
- LEMKE-KEYES, C.A.; SACHS, M.M. Genetic variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germoplasm. **Maydica**, Bergamo, v. 34, p. 329-337, 1989.
- LIMANI, A.M.; ROUILLON, C.; GLEVAREC, G. et al. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1860-1870, 2002.
- LUBBERSTEDT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A.E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, n. 5, p. 447-450, 1998.

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J.B. Melhoramento de populações. In PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 217-274.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M. et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1248-1255, 1998.

RIBAUT, J.; HOISINGTON, D.; DEUTSCH, J. et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 905-914, 1996.

SACHS, M. M. Molecular genetics basis of metabolic adaptation to anoxia in maize and its possible utility for improving tolerance of crops to soil water logging. In: JACKSON, M.M.B.; BLACK, C.R. (Eds.) **Interacting stress on plants in a changing environment**. Berlin: Springer Verlag, 1993. p. 375-393. (NATO ASI, 16)

SACHS, M.M. Gene expression in maize during anoxia. In: BASRA, A.S. (Ed.) **Stress induced gene expression in plants**. Switzerland: Harwood, 1994. p. 87-102.

SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v.161, p.111-115, 1978.

SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, Cambridge, v. 20, p. 761-767, 1980.

SACHS, M.M.; SUBBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 294, p. 1-15, 1996.

SAKAKIBARA, H.; KAWABATA, S.; TAKAHASHI, H. et al., Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent

glutamate synthetase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 33, p. 49-58, 1992.

SILVA, S.D.A.; BARBOSA NETO, J.F.; SILVA, C.F.L e et al. Herança do caráter tolerância ao encharcamento do solo em milho. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 46; REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO SORGO; 29; 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: FEPAGRO/EMATER, 2001. 1 CD-ROM.

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H. et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparisons with data from RFLPS end pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 163-173, 1997.

STUBER, C.W.; LINCOLN, S.E.; WOLFF, D.W. et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Maryland, v. 132, p. 823-839, 1992.

SUBBAIAH, C.C.; SACHS, M.M. Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 119-127, 2003.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Ottawa, v.3 9, n. 2, p. 277-287, 1996.

VELDBOOM, L.E.; LEE, M. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. II. Determination of QTLs for gain yield and yield components. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 451-458, 1994.

VELDBOOM, L.E.; LEE, M.; WOODMAN, W. Molecular marker-facilitated studies in an elite maize population. I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 7-16, 1994.