



PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA

**HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium verticillioides*
E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA
AO COMPLEXO TAR SPOT EM MILHO**

LAVRAS –MG

2019

PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA

**HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium verticillioides*
E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA
AO COMPLEXO TAR SPOT EM MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração Genética e Melhoramento de plantas, para a obtenção do título de Doutora.

LAVRAS –MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Vieira, Paula Mikaely Henrique.

Herança genética da resistência a *Fusarium verticillioides* e
estudo de associação genômica para resistência ao Complexo Tar
Spot em milho / Paula Mikaely Henrique Vieira. - 2019.

109 p. : il.

Orientador(a): João Cândido de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia

1. Resistência a doenças. 2. Melhoramento de plantas. 3. Zea
mays. I. de Souza, João Cândido. II. Título.

PAULA MIKAELY HENRIQUE VIEIRA

HERANÇA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium verticillioides* E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA RESISTÊNCIA AO COMPLEXO TAR SPOT EM MILHO

GENETIC INHERITANCE OF RESISTANCE TO *Fusarium verticillioides* AND STUDY OF GENOMIC ASSOCIATION FOR RESISTANCE TO TAR SPOT COMPLEX IN MAIZE

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de Agosto de 2019

Dra. Marcela Andrade Carvalho	CIMMYT
Dr. Vander Fillipe de Souza	UFLA
Dra. Heloisa Oliveira dos Santos	UFLA
Dr. Welison Andrade Pereira	UFLA

Prof. Dr. João Cândido de Souza
Orientador

LAVRAS –MG

2019

*A Deus e a Nossa Senhora Aparecida,
pela vida, saúde e perseverança.*

OFEREÇO

*A minha mãe Regina, minha avó Luzia e minha irmã Diocélia,
pelo amor, incentivo e apoio incondicional*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Aos órgãos financiadores de pesquisa, CNPq, CAPES e FAPEMG. Ao professor João Cândido pela orientação e confiança.

Ao Professor Welison Andrade Pereira e ao professor Flávio Medeiros, pelo apoio, auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa e disponibilidade sempre prestadas. À professora Heloísa Santos, por contribuir com este trabalho e por sempre se mostrar paciente e disponível em ajudar. Ao professor Chalfun por disponibilizar o laboratório de Fisiologia Molecular de plantas. À Rafaela Guimarães por toda ajuda, ensinamento, paciência, dedicação e competência. Ao André por sempre contribuir com seu conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho e ao professor Júlio Bueno pela disponibilidade, paciência, pelo conhecimento passado e pela imensa colaboração.

Ao pesquisado Terry Molnar, que me acolheu com grande carinho e dedicação, se mostrando disposto a ensinar, e à Marcela Carvalho Andrade, pelos ensinamentos, pelo exemplo de perseverança e força, e principalmente, pela amizade que levarei por toda minha vida. Muito obrigada pelo exemplo que são para mim! À todos os pesquisadores do CIMMYT que contribuíram com este trabalho e para meu crescimento pessoal.

Ao Pedro, Andrea, Meriam, Lila e a todos os amigos do México. Obrigada por me ajudarem a crescer como pessoa. Levarei vocês para sempre comigo. Aos amigos do laboratório Carol, Luciana, Fernanda, Antônio, Mara e Lamartine, por toda a ajuda no decorrer dos experimentos e pela alegria e amizade. Muito obrigada Carol e Antônio, pelo grande apoio e contribuição para este trabalho.

À minha querida amiga Heloísa pelo companheirismo, pelos momentos de diversão e estudos, e pela amizade. À Brena e aos amigos do grupo do milho e Gen pela alegria e grande apoio.

À minha família, pelo amor, pelos princípios ensinados, pelo incentivo, compreensão e valores transmitidos, sem vocês nada seria possível. Ao Renato pelo apoio em todas as etapas dos experimentos e por todos os ensinamentos. Obrigada pelo companheirismo, amor, alegria, amizade e pelo exemplo de pessoa e profissional que é pra mim. Aos meus amigos Mariana Milião, Luciano Portugal e Tiago Marçal, que sempre estiveram comigo apesar da distância. MUITO OBRIGADA!!

“Todo lo demás puede esperar, la agricultura no.”

Dr. Norman E. Borlaug

RESUMO

O fungo *Fusarium verticillioides* e os que compõem o complexo tar spot, *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* e *Coniothyrium phyllachorae*, têm causado grandes prejuízos às lavouras de milho. Em virtude da resistência a esses patógenos ser um caráter quantitativo e apresentar alta influência ambiental, a obtenção de cultivares altamente resistentes é um grande desafio para o melhoramento genético. Nesse contexto, os objetivos deste estudo foram: i) Estudar a herança genética da resistência a *Fusarium verticillioides*, e a variabilidade genética disponível na população segregante; ii) Identificar progênies da população segregante para a resistência a *F. verticillioides*, com bom desempenho para produtividade; iii) Identificar, entre dois acessos com potencial para resistência a tar spot, oriundos do banco de germoplasma do CIMMYT, o que melhor contribuirá para a introgressão de genes de resistência em materiais elite e; iv) Identificar os genes associados a resistência, presentes nesses acessos via GWAS. Para o estudo da resistência a *F. verticillioides* foram utilizadas duas linhagens previamente identificadas como contrastantes. A partir dessas foram obtidas as gerações F₁, F_{2:3}, RC₁₁ e RC₁₂. Estas gerações foram semeadas na safra 2017/2018 utilizando-se o delineamento em blocos casualizados com três repetições. No período de florescimento das plantas foi feita a inoculação artificial do patógeno. Utilizou-se o *blotter test* para a fenotipagem da incidência e severidade da doença. Para fins de genotipagem, foram testados 11 *primers* associados à resistência e foi realizada a análise de expressão pelo método de RT-qPCR. Na safra de 2017/2018 as progênies F_{2:3} foram amostradas para a avaliação da produtividade. No experimento para a identificação de acessos com resistência para TSC dois acessos foram cruzados com quatro linhagens elite do programa de melhoramento de milho do CIMMYT (CMLs). Foi obtida a geração F₁ e esta foi retrocruzada com os parentais recorrentes, as CMLs. Ao final foram geradas oito populações que foram avaliadas em dois locais, El Portillo, México e Petén, Guatemala. As fenotipagens foram realizadas duas semanas, três e quatro semanas após a primeira avaliação. Foi obtido um *bulk* das progênies BC₁S₁ e BC₁S₂ de cada população e estas foram genotipadas utilizando a plataforma DArT-Seq. Um total de 8.401 SNPs foram usados para o GWAS. Para ambos os experimentos a análise fenotípica foi realizada utilizando escala de notas, e foram calculadas as variâncias genéticas e fenotípicas, a herdabilidade e a acurácia. No estudo de herança da resistência a *F. verticillioides* ficou evidenciado que os parentais não eram totalmente contrastantes. Observou-se que existe variabilidade para a população segregante e que esta pode ser utilizada no melhoramento. O ganho com a seleção foi de -0,70. As progênies 61 e 69 obtiveram melhor desempenho tanto para resistência quanto para produtividade. No segundo experimento foi observado que o acesso GUAT153 apresentou melhor desempenho fenotípico, e foi considerado o melhor doador de alelos para a resistência, à TSC. Verificou-se que os acessos OAXA280 e GUAT153 apresentaram diferentes alelos não encontrados nas CMLs. Foram identificados 11 SNPs de pequeno efeito envolvidos na à TSC. O acesso GUAT153 será útil na introgressão de alelos de resistência em genótipo elite, e contribuirá para o *background* da resistência, permitindo uma resistência duradoura dos genótipos melhorados.

Palavras-chave: *Zea mays*. Resistência a doenças. Melhoramento de plantas.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides fungi and the tar spot complex caused by the interaction of the fungi, *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* and *Coniothyrium phyllachorae*, have caused great damage to maize crops. The resistance to these pathogens is a quantitative trait and has a high environmental influence where obtain highly resistant cultivars is a major challenge for genetic improvement. In this context, the aim of this study were: i) Study the genetic inheritance of resistance to *Fusarium verticillioides* and the genetic variability available in the segregating population; ii) Identify progenies of the segregating population for resistance to *F. verticillioides* which present the best performance for productivity; iii) Identify, between two accessions with potential tar spot resistance, coming from the CIMMYT germplasm bank, which will best contribute to the introgression of resistance genes in elite materials, and identify the resistance-associated genes present in these accessions via GWAS. For the study of resistance to *F. verticillioides*, it was used two lines previously identified as contrasting for resistance. From these were obtained the generations F₁, F_{2:3}, RC₁₁ and RC₁₂, they were sown in the 2017/2018 crop season applying the complete randomized block design with three replications. The artificial inoculation of the pathogen was made in the flowering period. The *blotter test* was used to phenotype the incidence and severity of the disease. For genotyping purposes, 11 previously obtained primers associated with resistance to *F. verticillioides* were tested. In the experiment for identification of resistant accessions to TSC, two accessions were crossed with four elite maize lines (CMLs) from the maize breeding program at CIMMYT. The F₁ generation was obtained and was backcrossed with the recurrent parents, the CMLs. At the end, eight populations were generated. These were evaluated at two sites with high pathogen pressure, El Portillo, Mexico and Petén, Guatemala. The first phenotyping was performed two weeks after flowering, and then disease progression was assessed at two periods, 7 and 14 days after the first phenotyping. A bulk sample from the semi-inbred lines BC1S1 and BC1S2 for each population was obtained. The genotyping was performed using the DArT-Seq platform. A total of 8,401 SNPs were used for GWAS. For both experiments the phenotypic analysis was performed using a grade scale. The genetic and environmental variances, heritability and accuracy were calculated. The inheritance study of resistance to *F. verticillioides* shown that the parents were not totally contrasting. It was observed that there is variability for the segregating population and that it can be used for breeding. The gain with the selection was -0.70. The progenies 61 and 69 had better performance for both resistance and productivity. In the second experiment we observed that the GUAT153 accession presented better phenotypic performance, and that GUAT153 and OAXA280 presented different genes, not observed in the CMLs. Eleven small-effect SNPs involved in the resistance response to TSC were identified. The accessions carrying these alleles will be useful in the introgression of resistance alleles in elite germoplasm, and will contribute to the resistance background, allowing a lasting resistance of the improved genotypes.

Keywords: *Zea mays*. Disease resistance. Plant Breeding.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 A cultura do milho.....	13
2.2 Doenças do milho	17
2.2.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	18
2.2.2 Complexo tar spot.....	20
2.3 Mecanismos de resistência em plantas	22
2.4. Estratégias de melhoramento para resistência.....	23
2.4.1 Controle Genético.....	25
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
ARTIGO 1 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA A <i>Fusarium verticillioides</i> EM MILHO E SELEÇÃO DE PROGÊNIES SUPERIORES	37
RESUMO	38
1 Introdução.....	40
2 Material e Métodos	42
3 Resultados	53
4 Discussão.....	65
5 Referências Bibliográficas	72
ARTIGO 2 - GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR RESISTANT ALLELES INTROGRESSION TO THE TAR SPOT COMPLEX IN MAIZE.....	79
ABSTRACT	80
1 Introduction	82
2 Material and Methods	84
3 Results	88
4 Discussion	100
5 References	104

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL

A resistência a doenças é um dos principais caracteres trabalhados em programas de melhoramento genético de plantas. O estresse biótico limita a produção, afeta a economia e ameaça a segurança alimentar global (JAMANN et al., 2013). O uso de genótipos resistentes é uma maneira rentável e ambientalmente correta de assegurar a produtividade e a qualidade do grão, e pode facilmente ser adotada por pequenos e grandes agricultores (GURURANI et al., 2012).

Dos patógenos do milho destaca-se *Fusarium verticillioides*, fungo causador da podridão rosada da espiga (SCHOEMAN et al., 2018). Este patógeno apresenta fácil disseminação e uma grande adaptabilidade às diferentes regiões sazonais, isso contribui com sua dispersão em muitas regiões do mundo e têm afetado inúmeros produtores (MUNKVOLD, 2003; DEEPA et al., 2017).

A principal característica de *F. verticillioides* é seu potencial na produção de fumonisinas, um grupo de micotoxina cancerígenas e altamente danosas à saúde humana e animal (SCHOEMAN, 2018). A alta concentração de fumonisinas nos produtos derivados do milho tem gerado grande preocupação aos órgãos reguladores, como a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil (MUNHOZ et al., 2015).

Em outro cenário, os fungos causadores do complexo tar spot (Tarspot Complex - TSC) têm causado grandes prejuízos aos agricultores da América latina nos últimos 30 anos. Este complexo é altamente danoso às plantações, e pode causar a morte total da planta 14 dias após a infecção. Atualmente o TSC está se disseminando por regiões da América Central e América do Norte (MAHUKU et al., 2016).

TSC é formado pela interação sinérgica entre os fungos *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* e *Coniothyrium phyllachorae* (HOCK et al. 1995). TSC afeta a capacidade fotossintética, o enchimento dos grãos e sobrevivência da planta. No México foram registradas perdas de até 70% da produção devido a este complexo (DIÉGUEZ, 2014).

Nos programas de melhoramento genético para resistência o primeiro passo é a identificação de fontes de resistência. Esta é uma etapa crítica, pois a disponibilidade das fontes de resistência determina o futuro do programa e como este será conduzido. Em um cenário ideal, a variação genética para resistência está presente em populações de melhoramento, ou em linhagens já desenvolvidas e

adaptadas pelo programa. Neste caso as fontes de resistência necessitam apenas de serem avaliadas para os demais caracteres agrônômicos, tais como produtividade, tolerância a seca, acamamento, entre outros (JAMANN et al., 2013; PIXLEY et al., 2018).

Entretanto, em muitos casos, não existe uma fonte de resistência já adaptada. Com isso é necessário que se busque a fonte de resistência em bancos de germoplasma. O uso de material exótico não é uma estratégia popular entre os melhoristas, devido ao fato de ser necessário um longo período de adaptação do material. Esse processo de adaptação tem por objetivo final a obtenção de um genótipo que apresente os genes de resistência e que, quando cruzado com uma linhagem elite, contribua com os alelos favoráveis para a resistência, sem contudo, causar um decréscimo no valor genético do indivíduo (JAMANN et al., 2013).

A resistência a *F. verticillioides* é quantitativa, governada por um grande número de genes de pequeno efeito, com controle genético do tipo aditivo e dominante (MASCHIETTO et al., 2016). A identificação de fontes de resistência para doenças de caráter quantitativo é um trabalho que requer um grande número de avaliações fenotípicas para a identificação das diferentes classes de resistência e, além disso, devido ao fato de muitos genes estarem envolvidos, o efeito ambiental apresenta grande influência sobre a resposta do genótipo (LIMA et al., 2012). Uma estratégia para os programas de melhoramento é a identificação de variabilidade genética para o caráter e a realização de cruzamentos entre materiais resistentes para o acúmulo de alelos favoráveis.

A resistência ao TSC é quantitativa e seu controle genético é do tipo aditivo e dominante (MAHUKU, et al., 2016). Mahuku (2016) relata a presença de um QTL de grande efeito, responsável por 14% da variação genotípica encontrada para a resistência. Entretanto, muitos genes de pequeno efeito estão envolvidos na resistência, em conjunto eles contribuem para que a ela seja duradoura. Para TSC já foram identificadas algumas fontes de resistência em materiais crioulos e linhagens do Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), no entanto, é necessário que outras fontes sejam utilizadas, visando complementar a resistência.

Este trabalho tem por objetivo: estudar a herança genética da resistência a *Fusarium verticillioides*, e identificar a variabilidade genética disponível na população segregante F_{2:3}; Identificar na geração F_{2:3} progênes que apresentam resistência a *F. verticillioides* e bom desempenho para produtividade; Identificar em progênes oriundas de dois acessos do banco de germoplasma do CIMMYT, aquelas que apresentem alelos para a resistência diferentes dos já encontrados em linhagens

elite, de modo a incrementar a resistência e identificar os genes candidatos à resistência, presentes nesses acessos via estudo de associação genômica ampla (*Genome-wide Association Studies*) .

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) está entre os cereais mais cultivados no mundo, cobrindo uma área total de 191,05 milhões de hectares na safra de 2018 (USDA, 2018). Devido sua adaptabilidade às diferentes regiões sazonais e facilidade de cultivo, a cultura tem desempenhando um importante papel para a segurança alimentar global, sobretudo para regiões subdesenvolvidas como as da África, Mesoamérica e Ásia (ZHANG et al., 2016; YANG et al., 2017; THOMPSON et al., 2018). A partir de 1990, o crescimento da produção e consumo de milho na África Sub-Sariana (ASS) tornou-o base da dieta alimentar desses países, o que têm contribuindo substancialmente para redução da subnutrição (FAO, 2018; MASUKA et al., 2016). Estima-se que na ASS 50% das terras cultiváveis sejam ocupadas pelo milho, sendo 95% da produção total destinada ao consumo interno. Para o ano de 2027, as projeções da *Food and Agriculture Organization* (FAO) indicam que a demanda global do cereal terá um aumento de 27%.

Apesar da importância do milho para a alimentação humana, a maior parte do cereal cultivado é destinada à produção de ração animal, em acréscimo também são produzidos biomassa, óleos vegetais, biocombustíveis e produtos industriais, o que aumenta substancialmente a contribuição deste para a economia (SCOTT et al., 2016; FAO, 2018).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Para o ano de 2019 o Brasil teve um aumento de 6,9% da área semeada na segunda safra (safrinha), comparada com a mesma temporada do ano passado. Associado a isso, a antecipação da colheita da soja contribuiu para o aproveitamento integral da janela climática em muitas lavouras. Devido a esses fatores, têm-se uma expectativa de que, considerando a primeira e a segunda safra, a safra de 2019 seja a segunda maior do Brasil, com um aumento de 20,2% em relação à última temporada, batendo recordes nacionais. Estes dados surgem em um cenário propício para o mercado brasileiro, visto que o *United States Department of Agriculture* (USDA) prevê uma queda na produtividade do milho devido a chuvas atípicas na maior região produtora de milho dos EUA. Tais condições têm impedido a semeadura do milho na janela ideal e resultarão em produtividades inferiores às esperadas. Além disso, a demanda por insumos advinda do mercado de carnes suína e avícola

tranquiliza o mercado brasileiro quanto ao incremento na safra 2018/19, diminuindo a pressão sobre o alto volume previsto de milho em estoque (GUTH, 2019).

O milho é membro da ordem Gramineae, família Poaceae, tribo Maydeae. É uma planta monocotiledônea, dióica, que possui como modo de reprodução a alogamia. O milho teve sua origem a 55-70 milhões de anos na região do México e América Central. Estima-se que o processo de domesticação tenha ocorrido na região do Rio Balsas, no México Ocidental, e teve início há aproximadamente 10.000 anos, quando o milho se divergiu do seu parental teosinte (HOSSAIN et al., 2016; BEDOYA et al., 2017).

As condições climáticas da América Central e México, considerados os principais centros de origem e diversidade da cultura, propiciaram a expansão do milho pelos países do continente americano, essa expansão ganhou maiores proporções com a chegada dos europeus e com o movimento migratório (HALLAUER et al., 2010).

Por ser uma planta C4, o milho é fisiologicamente capaz de se adaptar com eficiência às regiões tropicais, subtropicais e temperadas, e em latitudes de 0 a 3.800 metros, esse é um dos principais motivos de sua difusão por diferentes regiões geográficas (BONAVIAN, 2008).

A reprodução por fecundação cruzada e o processo migratório resulta num intercâmbio de genes entre populações, dando origem a “pools” de diversidade genética. Além disso, a domesticação por diferentes povos, que imprime diferentes pressões de seleção à população e a seleção natural são importantes fatores na criação de diversidade do germoplasma (HALLAUER et al., 2010).

Uma das primeiras classificações do germoplasma do milho foi feita por Sturtevant em 1899. Essa classificação baseou-se na composição do endosperma e dividiu o germoplasma em seis grandes grupos: Flint – caracterizado pela alta porcentagem de endosperma duro e distribuído em todo o hemisfério ocidental; Dentado – apresenta o grão preenchido com amido e endosperma duro nas laterais e na base da semente. Quando o grão está seco a parte macia se contrai, apresentando o formato de dente. Este tipo é semeado predominantemente no *Corn Belt*, nos Estados Unidos e em algumas regiões do México; Pipoca – contém alta proporção do endosperma duro. Esse tipo é menos semeado e é utilizado especialmente para o consumo como pipoca; Milho doce – originado por mutações que interrompem a conversão do açúcar em amido. O grão possui alto teor de açúcar e é colhido 10 a 20 dias após a polinização; Milho Waxy – Os grãos contém amilopectina como amido, este tipo está

restrito principalmente ao leste da Ásia. E o Flourey – com endosperma composto por amido macio, e é restrito às regiões Andinas (HALLAUER et al., 2010).

O sistema de classificação de Sturtevant não era completamente eficiente e satisfatório, pois não abordava muitas das características de importância da planta. Devido a isso, os pesquisadores Anderson e Curter (1942) propõem um sistema de classificação baseado nas raças, as quais eram caracterizadas por diferenças de um grupo de caracteres quantitativos. Dentre as raças mais conhecidas estão: Tusxpeño, Serrano, Olotón, Canilla, Argentino, Turson, Salpor, Quicheno, Criollo, San Marceno, Comiteco, Avatí, Colorado, Cateto, Cristal, Hickory King, Morotí, Entrelaçado, Lenha, Moroti, dentre muitas outras (BRIEGER et al., 1958).

A coleta, classificação, armazenamento e identificação do germoplasma são as principais medidas para a segurança e preservação da variabilidade genética. Dentre os principais centros de armazenamento e preservação das coleções estão o Banco de Germoplasma do Centro Internacional de Mejoramiento de Maize y Trigo (CIMMYT), no México; o Centro de Armazenamento de Semillas em Medellín, na Colômbia; e o Banco Brasileiro de Germoplasma, localizado no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPMS-EMBRAPA), na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais. Estes centros possuem importante papel não apenas para o armazenamento, mas também por desenvolverem projetos para a manutenção e uso do germoplasma. A conservação *ex-situ* permite a preservação das populações por meio das duplicações e reprodução das coleções, e minimizam os efeitos ocasionados pelos fenômenos da migração, deriva genética, seleção e mutação. (HALLAUER et al., 2010).

Apesar da diversidade de germoplasma que o milho possui apenas 5% é utilizado em programas de melhoramento em todo o mundo, e menos de 1% é utilizado nos EUA, principal país produtor (WU et al., 2019). A introdução de germoplasma exótico em programas de melhoramento é muitas vezes questionada e evitada por melhoristas. Genótipos não adaptados apresentam muitos genes selvagens que foram excluídos ao longo do processo de domesticação (PIXLEY et al., 2018). A inserção de germoplasma exótico em um programa de melhoramento é um processo lento, que requer um longo período de adaptação e seleção, para que este material possa ser utilizado em cruzamentos sem depreciar o valor genético de um material elite (HALLAUER, 2010).

O projeto MasAgro, desenvolvido no CIMMYT pelo Departamento de Recursos Genéticos, promove o uso de germoplasma crioulo em programas de melhoramento genético. As sementes de

milho melhoradas são disponibilizadas para melhoristas e empresas que tenham interesse, com o objetivo de serem incorporada nos programas de melhoramento. Os programas de melhoramento do CIMMYT desenvolvem e distribuem para parceiros em todo o mundo linhagens e híbridos de milho, melhoradas para as mais diversas finalidades como por exemplo: seca, deficiência em vitaminas, palatabilidade, aspecto da espiga, conteúdo de proteínas, resistência à pragas e doenças e etc. Este trabalho contribui para a segurança alimentar, a renda e a subsistência de milhões de pequenos agricultores e suas famílias em países da África, Ásia e América Latina.

A importância econômica e nutricional do milho faz dele um dos vegetais mais estudados no mundo. Os conhecimentos sobre a genética do milho tiveram início no ano de 1929, quando Barbara McClintock, estudando a mitose em grãos de pólen, caracterizou os 10 cromossomos da espécie ($x = 10$, $2n = 20$) (AGUIAR-PERECIN et al., 2000). Apesar de comportar-se geneticamente como um diplóide, o milho é uma planta aloploiplóide, que passou por processos de duplicação do genoma e extensivos rearranjos cromossômicos (BLANC et al., 2004; SCHNABLE et al., 2015). Estudos citogenéticos mostraram que os cromossomos do milho são estruturalmente diversos, e que durante sua evolução a composição da cromatina passou por uma série de alterações.

A grande quantidade de estudos sobre a origem, evolução, genética, e fisiologia do milho tornou-o um dos organismos modelos mais conhecido e utilizados em estudos de herança genética, mapeamento cromossômico, mecanismos que atuam no *crossing over* e recombinação, silenciamento epigenético dentre outros. No ano de 2009 o genoma do milho foi sequenciado por um grupo de pesquisadores do centro do genoma da Washington University e colaboradores (SCHNABLE et al., 2009), onde foi verificado que o tamanho total do genoma é de 2,3 gigabases, compreendendo mais de 32.000 genes. A grande quantidade de informações sobre a espécie têm impulsionado muitos estudos das áreas de genômica, proteômica e metabolômica. Estas informações permitem avanços na compreensão de importantes fenômenos como a heterose, a epistasia, pleiotropia e muitos outros mecanismos envolvidos no controle genético de caracteres agrônômicos de interesse.

Os conhecimentos gerados para a cultura do milho possibilitam compreender como se deu o processo de domesticação e ampliação da variabilidade genética. Os centros de pesquisas empenhados na conservação do germoplasma têm desempenhado um importante papel na preservação da diversidade da espécie e na compreensão dos aspectos genéticos, fisiológicos e moleculares do milho.

Tais conhecimentos contribuem para a garantia da segurança alimentar, melhor qualidade de vida, e abastecimento da indústria mundial.

2.2 Doenças do milho

As doenças que afetam o milho estão entre os principais responsáveis pelas quedas na produção e qualidade do grão (YANG et al., 2017). Aproximadamente 10% das perdas globais da produtividade são devido a estresses bióticos, causados por fungos, nematóides, vírus e bactérias (GONG et al., 2014). Nos Estados Unidos, por exemplo, as perdas anuais devido a enfermidades variaram de 2 a 15%.

A infecção e a agressividade dos patógenos dependem das condições ambientais e climáticas, localização, hospedeiro, estágio de crescimento da planta, histórico prévio da doença e práticas de cultivo (YANG, 2017).

As doenças que afetam o milho podem ser divididas em doenças foliares, doenças do caule e radicular, e doenças da espiga. Dentre as doenças foliares mais comuns estão a Mancha de antracnose (*Colletotrichum graminicola* (Ces)), Mancha-branca (*Pantoea ananatis*), Helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), Cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*), Mancha de macróspora (*Diplodia (Stenocarpella) macrospora* Earle), Ferrugem-comum do milho (*Puccinia sorghi* (Schw.)), Ferrugem polissora (*Puccinia polysora*). As principais doenças do caule e raiz são a Antracnose (*Colletotrichum graminicola*), a Fusariose (*Fusarium verticillioides*), e Giberela (*Fusarium graminearum*) e, dentre as doenças causadoras da podridão da espiga estão a Podridão branca da espiga (*Diplodia macrospora* (Earle)) e a podridão rosada da espiga (*Fusarium verticillioides* (Saccardo)) e Giberella (*Fusarium graminearum*) (EMBRAPA, 2009).

As doenças ocasionadas por fungos estão entre as principais causas das quedas na produção do milho. A disseminação dos patógenos tem sido favorecida pela prática de monocultivo, expansão das fronteiras agrícolas, falta de rotação de culturas, e uso de materiais genéticos suscetíveis (MENDES et al., 2012). Dentre os fungos de maior importância no Brasil e no mundo *Fusarium verticillioides* tem se destacado por sua longa prevalência e prejuízos à saúde humana e animal. Em outro cenário destaca-se o complexo tar spot, formado pelos fungos *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* e *Coniothyrium phyllachorae* (HOCK et al., 1995). Este complexo está presente em muitos países da América Latina e América Central a mais de 30 anos, e atualmente têm se tornado uma ameaça para

importantes estados produtores dos Estados Unidos, devido ao fato de alguns dos fungos do complexo já terem sido identificados (MOTTALEB, et al., 2019). Em ambos os casos, os fungos têm em comum o fato de atuarem de forma sinérgica com outros fungos, e apresentarem uma herança complexa e ainda pouco conhecida.

2.2.1 *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides (Saccardo) é um dos patógenos de maior importância para a cultura do milho. O fungo é distribuído em muitas regiões do mundo e causa a doença conhecida como podridão rosada da espiga (MUNKVOLD et al., 2003; DEEPA et al., 2017). *F. verticillioides* é um fungo endofítico e sistêmico, o que o permite colonizar diferentes partes da planta como as sementes, raízes, colmo, folhas e espiga (SCHOEMAN et al., 2018). A transmissão do fungo pode ocorrer pelo solo, devido sua capacidade de sobreviver em restos de cultura na forma de micélio, pelo vento ou via vetores, ou por sementes contaminadas (WALKER et al., 2016).

F. verticillioides é patogênico em todos os estágios de desenvolvimento da planta, o que compreende a germinação da semente até o momento da colheita. Além disso, possui ampla capacidade de deterioração do grão na pós-colheita. A infecção das espigas ocorre após o florescimento e se dá principalmente pela dispersão dos conídios pelo vento. Ao alcançarem o estilo-estigma os conídios penetram e chegam aos grãos em desenvolvimento (DEEPA et al., 2017). No período de florescimento o tecido vegetal dos órgãos reprodutivos ainda está imaturo, o que configura a condição ideal para o crescimento do fungo.

O clima quente e seco durante a floração, comuns em algumas regiões tropicais, são favoráveis ao desenvolvimento de *F. verticillioides*. No entanto, imediatamente após a infecção as condições úmidas e secas são relatadas como as mais propícias para o desenvolvimento da doença. Estima-se que a temperatura ótima para o crescimento do fungo seja de 25 °C e máximas entre 30 e 35 °C, e o potencial osmótico de 1Mpa (SAMAPUNDO et al., 2005; DEEPA et al., 2017).

A podridão da espiga é caracterizada pela formação de grãos com coloração avermelhada/rosada nas espigas, podendo estar distribuídos uniformemente ou isolados na espiga. Com o desenvolvimento da doença os grãos infectados são cobertos por um micélio cotonoso de coloração

rosada. Além disso, a ação do fungo no pericarpo resulta na formação de estrias na semente (PINTO, 2005).

Os grãos ardidos, por sua vez, são causados pela associação de *F. verticillioides* com um grupo de fungos (*Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *Gibberella zeae* ou *F. graminearum*), e resultam na descoloração de no mínimo um quarto de sua superfície. Sua coloração pode variar de marrom-claro a roxo, ou vermelho claro a vermelho intenso, dependendo do patógeno presente (PINTO, 2005).

A porcentagem de grãos ardidos permite classificar o milho quanto a sua qualidade, sendo que, segundo o MAPA, portaria nº4 de 6 de janeiro de 2010, o milho tipo 1 apresenta 1% de grãos ardidos, o tipo 2 até 2%, e o tipo 3 até 3% de grãos ardidos. Produções que contenham mais de 6% de grãos ardidos são consideradas inviáveis para o comércio (ANVISA, 2017).

As incidências dos fungos causadores da podridão da espiga causam danos físicos como descoloração dos grãos, redução na concentração de proteínas, carboidratos e açúcares (PINTO, 2005), o que resulta na redução da produtividade (MENDES et al., 2012).

Apesar da relevância de *F. verticillioides* para a produção de grãos ardidos, este se destaca principalmente pela sua alta capacidade de produção de fumonisinas. As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas pelo metabolismo secundário de muitas espécies do gênero *Fusarium*, e se caracterizam por serem danosas à saúde humana e animal (SHIRIMA et al., 2013). Os análogos das fumonisinas podem ser separados em quatro grandes grupos: A, B, C e P. As fumonisinas do Grupo B (FB), que compreendem as classes FB1, FB2, FB3 e FB4, são as mais comumente produzidas por *F. verticillioides*, sobretudo FB1, e são caracterizadas por serem altamente produzidas e pelo seu alto potencial toxicológico (RHEEDER et al., 2002; BLACUTT et al., 2017).

As fumonisinas estão associadas a ocorrência de leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos, câncer no esôfago, retardo mental e doenças no fígado em humanos (SHIRIMA et al., 2013). Por estas razões a contaminação por micotoxinas tornou-se uma grande preocupação para a segurança alimentar global (SCHOEMAN et al., 2018). Medidas de fiscalização são adotadas em diversos países visando controlar as concentrações de fumonisinas presentes nos grãos, e cumprir os limites estabelecidos por órgãos internacionais como o FDA (*Food and Drug Administration*) nos EUA e a União Europeia (MUNHOZ et al., 2015). No Brasil a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) estabelece para o milho destinado ao processamento um limite máximo de 5.000 µg/kg ou

5 ppm. Para farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha, como o consumo é direto, esse limite é de 1.500 µg/kg. O limite para amido de milho e demais produtos à base de milho é de 1.000 µg/kg (ANVISA, 2017).

F. verticillioides pode ocorrer de forma assintomática em muitos lotes de sementes. Este fato impede a detecção do fungo e a suspeita da presença de fumonisina. Bolduan et al. (2009) relatam para o Estado da Carolina do Norte, altas correlações entre a incidência do fungo e a contaminação por fumonisina ($r^2 = 0,87$), o mesmo foi observado no Brasil, onde a correlação entre a severidade da doença e a incidência de fumonisina foram positivas (MONHOZ et al., 2015).

A produção de fumonisina por *F. verticillioides* é alterada por condições ambientais, seca, injúrias nas espigas, incidência de outros patógenos e pelo genótipo utilizado (GUIMARÃES, 2018). O clima quente no período de florescimento tem importante influência sobre a produção de toxinas. No estágio de maturidade da planta as altas precipitações contribuem significativamente para o acúmulo de tóxicas (CZEMBOR et al., 2019). Além disso, as condições de armazenamento inapropriadas como presença de insetos trazidos do campo e assepsia inadequada do local, podem contribuir com o acúmulo de fumonisinas nas sementes.

As principais medidas para evitar podridões de sementes são o uso de defensivos agrícolas e o tratamento das sementes sadias com fungicidas. No entanto, o método de controle mais eficiente e sustentável à infecção por *F. verticillioides* e a redução na contaminação por fumonisina é o uso de cultivares resistentes (MUNKVOLD et al., 2003; ZILA et al., 2014; CHEN et al., 2016). Em associação, deve-se praticar a rotação de culturas, utilizando espécies não suscetíveis ao patógeno, realizar o controle eficiente das plantas daninhas hospedeira dos fungos, evitar altas densidades de plantio e o atraso da colheita. Associadas, estas medidas contribuem para a interrupção do ciclo de vida do fungo, e permitem reduções na produção e acúmulo de fumonisinas nos lotes (PINTO, 2005).

2.2.2 Complexo tar spot

O complexo tar spot (TSC), conhecido como mancha do asfalto, é uma das doenças do milho mais comum em países da América Latina (MOTTALEB et al., 2019; CAO et al., 2017). O TSC foi reportado pela primeira vez no México em 1904, posteriormente foi registrado na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, El Salvador, Guatemala, Haiti, Panamá, Peru, Porto Rico

e Venezuela (MAUBLANC, 1904; BAJET et al., 1994). O complexo tem por característica ser prevalente em regiões montanhosas de clima frio, com temperaturas variando entre 16–23 °C, e de alta umidade (CAO et al., 2017). Dos países da América Latina apenas Brasil, Chile e Argentina ainda não relataram a presença da doença.

O TSC é formado pela interação sinérgica entre os fungos, *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* e *Coniothyrium phyllachorae* (HOCK et al., 1995). A dispersão destes fungos ocorre pelo vento e os primeiros sintomas aparecem após a infecção pelo fungo *P. Maydis*, o que ocorre entre os estágios vegetativos v8 a v10.

P. maydis é caracterizado como parasita obrigatório, encontrado principalmente na cultura do milho, e seus ascósporos possuem a capacidade de sobreviver no solo por um período de aproximadamente três meses. Este fungo produz pequenas lesões de formato oval ou circular (2,0 a 5,0 mm de diâmetro) distribuídas aleatoriamente na superfície foliar. *M. maydis* é o segundo a fazer parte do complexo, ele caracteriza-se por ser um fungo saprófito benéfico, comum em superfícies foliares. *M. maydis* forma um halo necrótico elíptico de coloração marrom em torno de cada lesão ocasionada por *P. Maydis* (HOCK et al., 1989; RÍOS-HERRERA, 2016; MOTTALEB et al., 2018), juntos, estas lesões formam o aspecto característico de olho de peixe (*fish-eye*). *Coniothyrium phyllachorae* é o terceiro fungo a integrar-se ao complexo. Sua função ainda não está completamente elucidada, mas sua presença frequente nas injúrias é um indicativo que de este possui papel na infecção (HOCK et al., 1995).

M. maydes é o responsável pelo dano mais significativo da planta, a necrose produzida por este fungo se espalha por quase toda a folha, podendo ser observadas até 4.000 lesões por folha. Em contrapartida, as lesões de *P. maydis* são mantidas abaixo de 1% da área da área foliar (HOCK et al., 1995). Na ausência de *P. maydis*, o fungo *M. maydis* não causa lesões de efeito nocivo à planta, podendo sobreviver como endófito ou de forma epífita na superfície do tecido (MOSTER et al., 2000).

Entre 7 a 14 dias após os primeiros sinais da infecção as lesões maiores começam a coalescer abrangendo toda a folha em estágios mais avançados. A doença tem início nas folhas mais baixas da planta, e com o tempo se espalha para as folhas superiores progressivamente, até chegar à espiga.

O TSC compromete drasticamente a capacidade fotossintética da planta, e conseqüentemente o enchimento de grãos e sobrevivência da planta. As perdas em produtividades podem ser agravadas pelo

período em que a infecção ocorre, infecções registradas antes do florescimento das plantas podem resultar em perdas maiores de 50% da produtividade (BAJET et al., 1994).

O TSC tem causado grandes prejuízos aos agricultores latinos, perdas de até 50% da produção foram observadas entre os anos de 1985 e 1988 nos principais estados produtores de milho do México, como Jalisco, Michoacán, Nayarit, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca e Chiapas (HOCK, 1989). Em Oaxaca, no ano de 2012, 6.000 ha de milho foram afetados pela doença, resultando em perdas de até 70%. Em regiões ao norte da Guatemala as maiores perdas foram registradas no ano de 2009, onde 75% da produção foi perdida (RÍOS-HERRERA, 2016).

O TSC é favorecido pela utilização de híbridos suscetíveis, monocultivo, uso consecutivo de plantas hospedeiras, altos teores de adubação nitrogenada e baixa luminosidade (PEREYDA et al., 2009; RÍOS-HERRERA, 2016). Os métodos de controle químicos de tratamento das sementes e uso de fungicidas, especialmente antes da floração, apresentam bons resultados no combate ao complexo. Entretanto, os custos para o uso dessas medidas de controle tornam-as inviáveis para os agricultores . Neste sentido, o método mais seguro, econômico e ambientalmente adequado é o uso de cultivares resistentes.

2.3 Mecanismos de resistência em plantas

A resistência em plantas pode ser do tipo vertical (resistência completa ou raça específica), ou horizontal (resistência parcial). Na resistência vertical, a defesa mediada por genes R é conhecida como imunidade disparada por efetores ou ETI (*Effectors Triggered Immunity*). As proteínas codificadas a partir dos genes de resistência possuem em comum domínios conservados, como por exemplo, os domínios NBS (*Nucleotide Binding Site*) e LRR (*Leucine Rich Repeat*). Os domínios são úteis no reconhecimento dos patógenos, na fosforilação, na ativação de respostas de defesa, na sinalização, na interação proteína-proteína, além de muitas outras atividades (DE RONDE, 2014). A ETI resulta em uma resposta de defesa local, que se caracteriza por um rápido influxo de cálcio e de potássio, com ativação de vias MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), a formação de EROs (Espécies reativas de oxigênio), resposta de hipersensibilidade e a morte celular programada (JONES, 2006).

Na resistência quantitativa o sistema imune basal das plantas reconhece padrões moleculares associados a patógenos ou microorganismos (PAMPS/MAMPS) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – *Pattern Recognized Receptors*). Esse sistema de defesa é a

imunidade disparada por PAMPS (PTI). As partículas de PAMPS/MAMPS são moléculas protéicas derivadas de fungos, bactérias e outros microorganismos (KAZAN, 2014). Estas partículas são características de grupos de microorganismos de composição altamente conservada (KAZAN, 2014). As PAMPs são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), estes estão localizados na membrana plasmática das células das plantas e são constituídos por regiões ricas em leucina (LRR). A interação entre receptores e elicitores acionam um sistema de sinalização intracelular que se dá mediante mensageiros secundários e cascatas proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (JONES, 2011). A ativação dos fatores de transcrição WRKY (Domínio triptofano-arginina-lisina-tirosina), decorrente da sinalização, resulta na expressão de genes relacionados à defesa (RP), na formação de EROs e uma série de outros processos são desencadeados (FALEIRO, 2011).

2.4. Estratégias de melhoramento para resistência

A resistência a doenças em plantas pode ser do tipo vertical ou horizontal. A resistência vertical é geralmente governada por um ou poucos genes de resistência, conhecidos como genes R (KUMAR et al., 2015). Os genes R são específicos a um tipo de patógeno e fornecem altos níveis de resistência. Devido a essas características, o estudo desse tipo de resistência e seu uso em programas de melhoramento aplicado é relativamente fácil, embora exista uma alta probabilidade de quebra da resistência pelo patógeno ao longo do tempo (POLAND et al., 2009).

Dentre as estratégias de melhoramento utilizadas na incorporação da resistência vertical está a rotação de genes de resistência no tempo, o uso das multilinhas (estratégias que têm maior aplicação em plantas autógamas), e a piramidação de genes de resistência. O último método utiliza vários ciclos de retrocruzamento, o que requer mais tempo e recursos. Um dos principais inconvenientes da resistência vertical é sua curta durabilidade em alguns sistemas, fator dependente do potencial evolutivo do patógeno.

O tipo de resistência a muitas doenças de importância econômica é horizontal, esta é governada por um grande número de genes, cada um conferindo um pequeno efeito para a resistência (KUMAR; NABI, 2015). Neste sistema ocorre uma redução da taxa do desenvolvimento da doença, sem, contudo evitar a infecção completamente. Devido a um grande número de estruturas físicas e compostos químicos que atuam reduzindo o progresso do patógeno, a resistência quantitativa é mais durável. Assim, para que o hospedeiro vença essa resistência são necessárias várias alterações na população do

patógeno, o que não ocorre em uma escala microevolutiva da vida de uma cultivar (BERGAMIN FILHO, 1995).

Devido a maior durabilidade da resistência horizontal esta é vista como uma estratégia de melhoramento a médio e longo prazo. O efeito do ambiente sobre o grande número de genes envolvidos na resistência leva a uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro, característico de traços quantitativos.

Uma grande dificuldade no estudo e uso da resistência horizontal em programas de melhoramento está no processo de fenotipagem. Detectar os diferentes níveis de resistência requer uma grande quantidade de avaliações da severidade da doença e, além disso, a influência ambiental sobre os genótipos pode interferir nas respostas à infecção, o que dificulta a identificação dos melhores indivíduos (LIMA et al., 2012).

Nos programas de melhoramento genético para resistência, um dos primeiros estágios é a identificação das fontes de resistência, estas podem ser de *pools* secundários, materiais exóticos, crioulos, genótipos oriundos do banco de germoplasma, ou variedades de plantas já conhecidas e cultivares comerciais com valor agrônômico já agregado. A escolha da fonte de resistência é dependente da disponibilidade e facilidade de se utilizar estas nos programas de melhoramento. O uso de germoplasma exótico não é muito popular entre os melhoristas, devido ao fato de ser um processo lento e dispendioso. Para os casos em que as fontes sejam materiais já melhorados, seu uso é preferido.

Como estratégia de melhoramento, em geral, um genótipo resistente é cruzado com um suscetível que possua caracteres agrônômicos desejáveis. Com isso é gerada uma população segregante, onde é realizada a avaliação e seleção. O uso de retrocruzamentos é muito comum no melhoramento para resistência, neste método a F_1 , obtida do cruzamento entre os parentais contrastantes, é cruzada com o parental doador, visando aumentar a frequência de alelos favoráveis na população. Os métodos de Bulk e pedigree são amplamente empregados no melhoramento para resistência. Várias abordagens podem ser aplicadas para potencializar a estratégia, como o uso da seleção assistida por marcadores (SAM), esta estratégia permite agilizar esse processo, e tem sido aplicada com sucesso para muitas culturas.

No caso especial do melhoramento genético para resistência, os genótipos devem ser submetidos à pressão do patógeno. Em regiões onde a pressão do patógeno é auto não é necessário a inoculação artificial, porém, para regiões onde a incidência é heterogênia esta se faz necessária. O modo

de inoculação dependerá de como ocorre a infecção do patógeno. Espécies como *Fusarium verticillioides*, que possui o vento como principal modo de transmissão, podem ser inoculadas no estilo-estigma utilizando uma suspensão de conídios. Para o caso de doenças transmitidas por sementes, podem ser realizadas a imersão das sementes em suspensão do inóculo, por exemplo (KUMAR, 2015).

Como mencionado por Kumar (2015), além da resistência ao patógeno em específico, os melhoristas procuram também que o genótipo melhorado apresente características agrônômicas favoráveis, que garantam a produtividade e qualidade dos grãos, para isso, outras características devem ser consideradas ao longo do programa.

2.4.1 Controle Genético

A natureza e a magnitude dos efeitos gênicos envolvidos no controle de determinado caráter são fundamentais para estudos da genética quantitativa e para o melhoramento genético. Estas informações auxiliam o melhorista na tomada de decisões e na escolha dos métodos de melhoramento a serem utilizados, permitindo obter no final do processo maior ganho com a seleção.

A resistência a *F. verticillioides* é um caráter quantitativo, governado por um grande número de genes, e altamente influenciado pelo ambiente (CLEMENTS et al., 2000). Boling e Grogan (1965) utilizando duas linhagens contrastantes reportaram que o caráter apresenta efeitos aditivos em maior magnitude, efeito dominante, aditivo x dominante e epistáticos. Em outro trabalho, Perez-Brito (2001), utilizando duas populações distintas, relata a identificação de efeito aditivo e dominante no controle da resistência. Chen et al. (2012) utilizando 210 famílias F_{2:3} obtidas a partir do cruzamento entre os parentais contrastantes, linhagem BT-1(resistente), e a linhagem Xi502 (suscetível), mostrou que o controle genético do caráter é governado por genes de efeito aditivo e dominante.

O uso da seleção fenotípica, SAM e identificação de *Quantitative trait loci* (QTLs) tem sido amplamente aplicada em programas de melhoramento genético para a resistência.

A prospecção de QTLs associados à resistência é uma importante metodologia para o melhoramento, pois possibilita identificar e localizar alelos favoráveis em genótipos resistentes e utiliza-los em cruzamento com cultivares elite. Vários QTLs foram identificados contribuindo com a resposta de resistência a *F. verticillioides* (PÉREZ- BRITO et al., 2001; ROBERTSON-HOYT et al., 2006; CHEN et al., 2012; LANUBILLE et al., 2013). Em diferentes estudos, utilizando diferentes populações, já foram identificados QTLs distribuídos em quase todos os cromossomos da espécie.

Entretanto, muitos estudos têm mostrado que os QTLs identificados para a resistência a *F. verticillioides* apresentam, em geral, pequeno efeito, e, além disso, são inconsistentes entre populações (PEREZ-BRITO et al., 2001) Como abordados por Zila (2013), a natureza complexa da resistência a *F. verticillioides*, tem se tornado um empecilho na incorporação de genes de resistência, dificultando o trabalho do melhorista, o que faz com que a maioria dos híbridos comerciais apresentem uma resistência inferior à desejada.

Os estudos de associação genômica ampla (*Genome Wide Association Study* - GWAS) têm permitido a identificação de importantes genes associados a caracteres específicos. Por este método um grande número de indivíduos de uma população são testados para variantes alélicas específicas, com isso é possível detectar associações entre alelos e um fenótipo específico (TAM et al., 2019; ZILA, 2013)

Realizando estudos de GWAS, Zila et al., (2015) identificaram sete SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) altamente relacionados à resposta de resistência a *F. verticillioides*. Todavia, estes SNPs associados à resistência apresentam pequenos efeitos e são diferentes aos identificados em estudos anteriores pelo mesmo autor (ZILA et al., 2013). Estes resultados, associados a obtidos por outros autores, mostram a complexidade da resistência a *F. verticillioides*.

De Jong et al. (2018) utilizando diferentes abordagens estatísticas, avaliou 238 linhagens de milho e identificou 11 SNPs associados a genes de resistência. Stagnat (2019) em seus estudos identificou 25 genes relacionados à resistência, apresentando um alto desequilíbrio de ligação com os SNPs significativos obtidos. O uso da associação genômica têm trazido muitos resultados para os estudos com resistência, no entanto é importante aplicar estes conhecimentos em programas de melhoramento, utilizando tais marcas para a seleção de genótipos superiores.

O primeiro estudo visando elucidar a herança da resistência ao TSC foi realizado por Ceballos e Deustsch (1992). Neste trabalho foram realizadas análises de segregação e dialelo utilizando parentais contrastantes para a resistência ao TSC. Foi verificado que o caráter é controlado por poucos genes, apresentando efeito dominante. Posteriormente Hernández-Ramos (2015) avaliou 18 linhagens endogâmicas, e observou que tanto a CGC (Capacidade Geral de Combinação) quanto a CEC (Capacidade Específica de Combinação) foram significativos, indicando que os efeitos gênicos aditivos e dominantes são os mais importantes para o caráter, e que diferentes genes podem estar envolvidos na

resistência ao TSC. Atualmente têm sido aplicadas as abordagens de mapeamento de QTLs e GWAS para o estudo da resistência ao TSC (MAHUKU, et al., 2016; CAO et al., 2017).

Mahuku (2016) utilizando uma população composta por 890 linhagens identificou por meio de um estudo de mapeamento associativo a presença de um QTL de grande efeito no cromossomo 8 (*qRtsc8-1*). Esse QTL, responsável por 13% da variação fenotípica foi também identificado por Cao et al. (2017). Em seu estudo, Cao et al. (2017), utilizando três populações duplo-haploídes, identificaram cinco QTLs nos cromossomos 2, 3, 7, e 8. Sendo observado no cromossomo 8 o QTL *qRtsc8*, já mencionado por Mahuku (2016).

Estes estudos contribuem para a compreensão da arquitetura genética da resistência aos patógenos, e são importantes ferramentas para os programas de melhoramento genético, por permitirem identificar genótipos superiores e a melhor estratégia a ser utilizada.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. De; FLUMINHAN, A.; DECICO, M. J. U. Heterochromatin of maize chromosomes : structure and genetic effects. *Genetics and Molecular Biology*v. 1019, p. 1015–1019, 2000.

ANDERSON, E.; CUTLER, H.C. Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 29, p 69–89, 1942.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 138, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017.pdf/b36e60b0-12-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0. Acesso em: 24 de maio de 2018.

BAJET, N.B; RENFRO B.L.; CARRASCO, J.M.V. Control of tar spot of maize and its effect on yield. *International Journal of Pest Management*, v.40, p. 121-125, 1994.

BEDOYA, C.A. et al. Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin

America and the Caribbean. *PlosOne*, n.4, v.12. p. 1–21, 2017.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: *Ceres*. Cap.4, p. 470-491, 1995.

BLACUTT, A.A. et al. E. *Fusarium verticillioides* : Advancements in Understanding the Toxicity , Virulence , and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, v. 108, p. 312–326, 2018.

BLANC, G.; WOLFE, K.H. Widespread Paleopolyploidy in Model Plant Species Inferred from Age Distributions of Duplicate Genes. *The plant cell*, v. 16, p. 1667–1678, 2004.

BOLDUAN, C.; MIEDANER, T.; SCHIPPRACK, W.; et al. Genetic variation for resistance to ear rots and mycotoxins contamination in early European maize inbred lines. *Crop Science*, v. 49, n. 6, p. 2019–2028, 2009.

BONAVIAN, D. Maize, culture, domestication and its role in the development of culture. Cambridge University press. 2008.

BOLING, M. B.; GROGAN, C. O. Gene action affecting host resistance to *Fusarium* ear rot of maize. *Crop Sci*, v.5, p.305-307,1965.

BRIEGER, F. G. Races of maize in Brazil and other eastern South American countries. vol. 593. National Academies, Washington, DC. 1958.

CAO, S.; LOLADZE, A.; YUAN, Y. et al. Genome-Wide Analysis of Tar Spot Complex Resistance in Maize Using Genotyping-by-Sequencing SNPs and Whole-Genome Prediction. *The Plant Genome*, v.10, p1-14, 2017.

CEBALLOS, H.; J.A. DEUTSCH, J. A. Inheritance of resistance to tar spot complex in maize. *Phytopathology*, v.82, p. 505–512, 1992.

CHEN, J.; SHRESTHA, R.; DING, J. Reveal Genomic Loci Associated with Fusarium Ear Rot Resistance in Tropical Maize Germplasm. *Genetics*, v. 6, p.3803-3815, 2016.

CHEN, S.; WYK, M. V.; ROUX, J. et al. Taxonomy and pathogenicity of *Ceratocystis* species on Eucalyptus trees in South China, including *C. chinaeucensis* sp. nov. *Fungal Diversity*, v.58, p. 267–279. 2013.

CLEMENTS, M.J.; MARAGOS, C.M.; PATAKY, J.K.; WHITE, D. G. Sources of Resistance to Fumonisin Accumulation in Grain and Fusarium Ear and Kernel Rot of Corn. *Genetics and Resistance*, v. 94, n. 3, p. 251–260, 2004.

CZEMBOR, E.; WASKIEWICZ, A.; PIECHOTA, U.; PUCHTA, M.; CZEMBOR, J.H.; STEPIEN, L. Differences in Ear Rot Resistance and *Fusarium verticillioides* -Produced Fumonisin Contamination Between Polish Currently and Historically Used Maize Inbred Lines. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1–14, 2019.

DEEPA, N.; SREENIVASA, M.Y. Fusarium verticillioides, a Globally Important Pathogen of Agriculture and Livestock : A Review. *Jurnal of Veterinary Medicine and Research*, v. 4, n. 4, p. 1–8, 2017.

DEEPAK, S.A. et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, v. 8, p. 234–251, 2007.

DE JONG, G., et al. Genome-wide association study of ear rot resistance caused by Fusarium verticillioides in maize. *Genomics*, v. 110, p291-301, 2018.

DE RONDE, D.; BUTTERBACH, P.; KORMELINK, R.. Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in plant science*, v. 5, p. 307, 2014.

DIÉGUEZ, D. O. G. Revisión: Identificación de QTL's asociados con la resistencia al complejo mancha de asfalto en accesiones de maíz. Universidad Autónoma Chapingo - Departamento de Fitotecnia - Instituto de Horticultura. México. p.1-18 2014.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Cultivo do Milho- Doenças. 2009. Disponível em: <
http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm> Acesso em 18 jul. 2017.

FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R. M.; REIS F.B. Biotecnologia, estado da arte e aplicações na agropecuária. *Embrapa Cerrados*. Planaltina, DF. 1 Ed. p. 365 -376. 2011.

FAO. OECD-FAO AGRICULTURAL OUTLOOK 2018-2027. Overview. p.1-50. 2018.

GONG, F.; WANG, W. ““ Omics ”” of Maize Stress Response for Sustainable Food Production. *OMICs*.n.18, v.12, p.714-732, 2014.

GUIMARÃES, R. A. HOW biological and chemical fungicides impact the maize microbiome , fusarium verticillioides populations and fumonisins content.100p. 2018. Tese (Doutorado em fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C.P. et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 78, p. 51-65, 2012.

GUTH, T. L. F. Conjunturas da agropecuária. **Conab**, n. 61, p. 2019–2020, 2019.

HALLAUER, A.R.; CARENA, M. J.; FILHO, J.B.M. Quantitative genetics in maize breeding. Springer. v.6. 680p.2010.

- HERNÁNDEZ-RAMOS, L. et al. Genetics of resistance to tar spot complex in 18 tropical maize genotypes. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, v.1, p. 39 - 47, 2015
- HOCK, J.; KRANZ, J.; RENFRO, B. El complejo “mancha de asfalto” de maíz: Su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. v. 7, p. 129–135, 1989.
- HOCK, J.; KRANZ, J.; RENFRO, B. Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology*, v. 44, p. 490–502, 1995.
- HOSSAIN, F. et al. Maize. *Broadening the Genetic Base of Grain Cereals*, p. 67–88, 2016.
- JAMANN, T.; NELSON, R.; BALINT-KURTI, P. The Genetic Basis of Disease Resistance in Maize. *Translational Genomics for Crop Breeding*, v. I, p. 31–43, 2013.
- JONES J. D.; DANGL J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323–329, 2006.
- KUMAR, D. Breeding for Disease Resistance. *Agrobios News Letter*, v. 14, p. 83-84, 2015.
- PEREYDA-HERNANDEZ, J. et al. Etiology and management of tar spot (*Phyllachora maydis* maubl.) of maize in Guerrero State, México. *Agrociencia*, v. 43, p. 511-519, 2009.
- PIXLEY, K.V. et al. CIMMYT’s Seeds of Discovery Initiative: Harnessing Biodiversity for Food Security and Sustainable Development. *Indian J. Plant Genet. Resour.* v. 31, p.1-10, 2018.
- KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, v. 26, p. 2285-2309, 2014.
- LIMA, W. F.; PRETE, C.; RIBEIRO, A. et al. Metodologias para obtenção de resistência e/ou tolerância da soja à ferrugem-asiática. *Summa Phytopathologica*. v. 38, n. 1, p. 67-72, 2012.
- LANUBILLE, A.; LOGRIECO, A.; BATTILANI, P.; PROCTOR, R. H.; MAROCCO, A. Plant

Science Transcriptional changes in developing maize kernels in response to fumonisin-producing and nonproducing strains of *Fusarium verticillioides*. *Plant Science*, v. 210, p. 183–192, 2013.

MAHUKU, G.; CHEN J.; SHRESTHA, R. et al. Combined linkage and association mapping identifies a major QTL (qRtsc8-1) conferring tar spot complex resistance in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 129, p. 1217–1229, 2016.

MASCHIETTO, V.; COLOMBI, C.; PIRONA, R. et al. QTL mapping and candidate genes for resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination in maize. *BMC Plant Biology*. n.17, v.2, p.21. 2017.

MASUKA, B.; GARY, N.; ATLIN, M. O. et al. Gains in Maize Genetic Improvement in Eastern and Southern Africa : I. CIMMYT Hybrid Breeding Pipeline. *Crop Science*, v. 57, n. february, p. 168–179, 2017.

MARUTA M., TRUSOV, N., PAREKH, U. Membrane-Localized Extra-Large G Proteins and Gbg of the Heterotrimeric G Proteins Form Functional Complexes Engaged in Plant Immunity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.167, p1004–1016, 2015.

MAUBLANC, A. Espèces nouvelles de champignons inférieurs. Bulletin Société Mycologie. France. 20:72, 1904.

MCCOY, A. et al. First Report of Tar Spot on Corn (*Zea mays*) Caused by *Phyllachora maydis* in Florida, Iowa, Michigan and Wisconsin. *Plant Disease*. p.1-5, 2018. DOI: 10.1094/PDIS-02-18-0271-PDN.

MENDES, M.C. et al. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. Behavior of Corn Hybrids Inoculated with kernel-rotting Fungi and Association to Chemical and Biochemical. *Ambiência*, v. 8, p. 275-292, 2012.

MOSTERT, L.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia*, v.52, p.46-58, 2000.

MOTTALEB, K. A.; LOLADZE, A.; SONDER, K.; KRUSEMAN, G.; VICENTE, F.S. Threats of Tar Spot Complex disease of maize in the United States of America and its global consequences. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v. 24, p. 281–300, 2019.

MUNHOZ A.T.; CARVALHO, R.V. D.; QUERALES, P. J. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho a podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocados por *Fusarium verticillioides*. *Summa Phytopathologica*, v.41, p.144-148, 2015.

MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, v. 109, p. 705–713, 2003.

PÉREZ-BRITO D. et al., Cartografía de QTL de la resistencia a la pudrición de la mazorca (*fusarium moniliforme*) en maíz de valles altos, México. *Agrociencia*, v. 35, p. 181-196, 2001.

PINTO, N. F. J. de A. Grãos Ardidos em Milho: Circular Técnica. 2005.

POLAND, J. A.; BALINT-KURTI, P. J.; WISSER, R. J.; PRATT, R. C.; NELSON, R. J. Shades of gray : the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.*, p. 21–29, 2008.

R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F. O.; VISMER, H. F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 5, p. 2101–2105, 2002.

RÍOS-HERRERA, E. N. et al. First Report on the Presence of *Phyllachora* sp . in Corn Crops at Toluca , Estado de Mexico. *American Journal of Plant Sciences*, v. 7, p. 733–739, 2016.

ROBERTSON-HOYT, L.A.; JINES, M.P.; BALINT-KURTI, P.J. QTL mapping for Fusarium ear rot and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Science*. v.46, p.1734–1743. 2006.

SAMAPUNDO, S.; DEVLIGHERE, F.; DE MULENAER, B.; DEBEVERE, J. et al. Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 1054-1059, 2005.

SCHNABLE, J. C. Genome Evolution in Maize : From Genomes Back to Genes. *Annual Review in Plant Biology*, v. 66, p. 329–343, 2015.

SCHNABLE, P. S. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, v. 326, n. 1112, 2009.

SCHOEMAN, A.; FLETT, B. C.; RENSBURG, B. J. Van; NCUBE, E.; VILJOEN, A. Pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium verticillioides* isolates collected from maize roots , stems and ears in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, p. 1–13, 2018.

SCOTT, M. P.; EMERY, M. **Maize : overview**. 2. ed. Elsevier Ltd., 2016.

SHIRIMA, C. P.; KIMANYA, M. E.; KINABO, J. L. et al. Dietary exposure to aflatoxin and fumonisin among Tanzanian children as determined using biomarkers of exposure. *Molecular Nutrition & Food Research*., v. 57, n. 10, p. 1874–1881, 2013.

STAGNATI, L. Genome Wide Association Study Reveals Markers and Genes Associated with Resistance to *Fusarium verticillioides* Infection of Seedlings in a Maize Diversity Panel. *Genes genome genetics*, v.9, p571-579, 2019.

TAM, V. et al. Benefits and limitations of genome- wide association studies. *Nature Reviews*, p.1-18. 2019.

THOMPSON, M. E. H.; RAIZADA, M. N. Fungal Pathogens of Maize Gaining Free Passage Along the Silk Road. *Pathogens*, v.7, p.1-16, 2018.

USDA. World agricultural production. United States Department of Agriculture.Ed. Estados Unidos: National Plants data team. Circular Series: WAP 6-19, 31p, 2019.

WALKER, C. et al. S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de. *Ciência Florestal*, v. 26, n. 2, p. 463–473, 2016.

WU, H. X. Benefits and risks of using clones in forestry—a review. *Scandinavian Journal of Forest Research*, v. 34, n. 5, p. 352–359, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1487579>>.

YANG, Q.; BALINT-KURTI, P.; XU, M. Quantitative Disease Resistance : Dissection and Adoption in Maize. *Molecular Plant*, v. 10, n. 3, p. 402–413, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.02.004>>.

YANG, X., PAN, Y., SINGH P.K. et al. Investigation and genome-wide association study for Fusarium crown rot resistance in Chinese common wheat. *BMC Plant Biology*, v.19, p.1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1758-2>.

ZHANG, X., et al. Characterizing the population structure and genetic diversity of maize breeding germplasm in Southwest China using genome-wide SNP markers. *BMC Genomics*, v. 17, n. 697, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-3041-3>>.

ZILA, C.T.; OGUT, F.; ROMAY, M.C. et al. Genome-wide association study of Fusarium ear rot disease in the U . S . A . maize inbred line collection. *BMC plant biology*, v. 14, n. 372, p. 1–15,

2014.

ZILA, C. T., SAMAYOA, F., SANTIAGO R. et al. A Genome-Wide Association Study Reveals Genes Associated with Fusarium Ear Rot Resistance in a Maize Core Diversity Panel. *Genetics*, v. 3, p. 2095-2104, 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 - HERANÇA DA RESISTÊNCIA A *Fusarium verticillioides* EM MILHO E
SELEÇÃO DE PROGÊNIES SUPERIORES**

RESUMO

A podridão rosada da espiga é uma doença comum da cultura do milho, causada pelo fungo *Fusarium verticillioides*, e resulta em quedas na produtividade e redução da qualidade nutricional e fitossanitária dos grãos. A resistência genética a *F. verticillioides* é quantitativa e altamente influenciada pelo ambiente. A identificação de variabilidade genética e de fontes de resistência é um dos primeiros passos para a obtenção de genótipos resistentes em programas de melhoramento genético. Objetivou-se estudar a herança genética da resistência a *F. verticillioides* e inferir sobre a variabilidade genética presente na população segregante; identificar as progênies de maior produtividade e resistência; identificar regiões genômicas associadas a resistência, e estudar a expressão dos genes *LOX8* e *LOX9* sob diferentes condições. A partir do cruzamento entre as linhagens L75 e L43 foram obtidas as gerações F₁, F_{2:3}, RC₁₁ e RC₁₂. Quinze dias após o florescimento foi feita a inoculação artificial. A fenotipagem foi realizada mediante *blotter test*, onde utilizou-se uma escala de notas para a avaliação da incidência e severidade da doença. Na safra 2017/2018 as progênies F_{2:3} foram amostradas para a análise de produtividade. Onze marcadores localizados em QTLs associados à resistência foram utilizados para a genotipagem das gerações. Calculou-se a incidência e a severidade para cada uma das gerações. As análises estatísticas foram realizadas aplicando-se o *cumulative probit models*. Foram realizadas análises de variância para peso de 100 grãos e para os dados de produtividade de espigas despalhadas. Estimou-se a herdabilidade no sentido amplo e o ganho com a seleção para cada um dos caracteres. Não houve diferença significativa entre gerações, entretanto a variância genética dentro de gerações foi significativa, indicando a presença de variabilidade genética dentro das gerações segregantes. A herdabilidade para a resistência a *F. verticillioides* foi de: 40% e o ganho com a seleção de: -0,70. As análises de correlação e PCA mostram que não existe correlação entre incidência de *F. verticillioides* e peso de grãos ardidos. Cinco dos *primers* utilizados para a genotipagem mostraram ampliações diferenciais entre genótipos resistentes e suscetíveis, para os demais não houve diferenças de amplificação. Esses resultados apoiam a hipótese de existência de diferentes blocos gênicos associados à resistência em ambos os parentais. A progênie 83 e o genótipo DKB390 mostraram diferentes respostas para a expressão do gene *LOX9*. Não houve diferença significativa entre as progênies para produtividade de espigas despalhadas. Sob uma intensidade de seleção de 15% as progênies 61 e 69 e 110 da geração F_{2:3}, apresentaram os melhores desempenhos para resistência e produtividade simultaneamente. A variabilidade genética encontrada pode ser útil para a implementação dos programas de melhoramento.

Palavras-chave: Podridão rosada da espiga. Estresse biótico. *Zea mays*.

ABSTRACT

Fusarium ear rot is a common disease in maize crop that affects yield and reduced nutritional and phytosanitary quality of the grains. Genetic resistance to fungus *Fusarium verticillioides* is quantitative and highly influenced by the environment. Identifying genetic variability and sources of resistance is one of the first steps towards obtaining resistant genotypes in breeding programs. This study aimed to study the genetic inheritance of resistance to *Fusarium verticillioides* and to understand the genetic variability present in the segregating population; identify progenies of higher productivity and resistance; identify genomic regions associated with resistance, as well as study the expression of LOX8 and LOX9 genes under different conditions. From the crossing between the lines L75 and L43 were obtained the generations F₁, F_{2:3}, RC₁₁ and RC₁₂. The artificial inoculation was performed fifteen days after flowering. Phenotyping was performed using a *blotter test*, where a grade scale was used to evaluate the incidence and severity of the disease. In the 2017/2018 crop the F_{2:3} progenies were planted for yield analysis. Eleven primers located in resistance-associated QTLs were used to genotype the generations. Incidence and severity were calculated for each generation. Statistical analyzes were performed by applying the cumulative probit models. Variance analysis was performed for weight of 100 grains and for the data of peeled ear yield. Heritability in the broad sense and gain with selection for each trait were estimated. There was no significant difference between generations, however the genetic variance within generations was significant which indicates the presence of genetic variability within the segregating generations. Heritability for resistance to *F. verticillioides* was: 40% and selection gain: -0.70. Correlation and PCA analyzes show that there is no correlation between incidence of *F. verticillioides* and weight of burnt grains. Five of the markers used for genotyping showed differences in the amplification between resistant and susceptible genotypes. For the other there were no amplification differences. These results support the hypothesis of different gene blocks associated with resistance in both parents. The “83” progeny and the DKB390 genotype showed different responses for LOX9 gene expression. There was no significant difference between the progenies for yield of unshelled ears. Under a selection intensity of 15%, progenies 61, 69 and 110 of the generation F_{2:3}, presented the best performances for resistance and productivity simultaneously. Resistance to *F. verticillioides* is complex and highly influenced by the environment. The genetic variability found may be useful for the implementation of breeding programs.

Keywords: Fusarium ear rot. Biotic stress. *Zea mays*.

1 Introdução

As doenças do milho estão entre os principais fatores responsáveis pelas quedas na produtividade da cultura (SUBEDI, 2015; YANG et al., 2017). Dentre os patógenos de maior impacto destaca-se *Fusarium verticillioides*, um fungo endófito causador da podridão rosada da espiga. Esta doença é endêmica de áreas com alta umidade e clima quente, e causa a redução da qualidade nutricional dos grãos, contaminação por fumonisina e quedas na produtividade (PINTO, 2005; THOMPSON et al., 2018; SEPTIANI et al., 2019). A incidência de fumonisinas é o fator mais preponderante na infecção por *F. verticillioides*, pois a presença desta toxina compromete a qualidade fitossanitária dos grãos e ameaça a segurança alimentar global (CHARMLEY et al., 1994; MINAMI et al., 2015).

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas pelo metabolismo secundário do patógeno. Em humanos estão associadas ao câncer esofágico e hepático, e são classificadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no grupo de toxinas potencialmente carcinogênicas para humanos (ALBERTS et al., 2017). Na saúde animal estas micotoxinas estão associadas à ocorrência de leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos e doenças no fígado em aves (SHIRIMA et al., 2013).

O método de controle mais eficiente e sustentável à infecção por *F. verticillioides* e à redução na contaminação por fumonisina é o uso de genótipos resistentes (ZILA et al., 2015; CHEN et al., 2016). Entretanto, atualmente os híbridos comerciais mais utilizados não são resistentes, ou apresentam nível de resistência inferior ao desejado (ZILA et al., 2014; EMBRAPA, 2017). Apesar da existência de variação genética para linhagens e híbridos, não existem evidências de resistência completa a este fungo ou à contaminação por fumonisinas (CLEMENTS et al., 2004; ROBERTSON et al., 2006; ZILA, 2013; EMBRAPA, 2017).

A resistência a *F. verticillioides* é um caráter poligênico, governado em geral por genes de pequeno efeito, e de baixa herdabilidade, sendo altamente influenciado pelo ambiente (MASCHIETTO, et al., 2017; ZILA, et al., 2015). O controle genético da resistência a *F. verticillioides* caracteriza-se por ser do tipo aditivo e dominante, sendo o efeito aditivo predominante (PEREZ-BRITO et al., 2001; CHEN et al., 2012).

Em programas de melhoramento genético o uso de populações segregantes, obtidas do cruzamento entre parentais contrastantes, é uma metodologia que permite a compreensão da herança

do caráter de interesse e a quantificação da magnitude e natureza da variabilidade genética disponível na população segregante, permitindo a caracterização do germoplasma estudado e auxiliando na tomada de decisões sobre a escolha de métodos adequados de melhoramento. Tal estratégia é amplamente empregada em programas voltados para a resistência genética em plantas (HALLAUER et al., 2010; CRUZ et al., 2010).

Sob uma abordagem molecular, os estudos de identificação de *Quantitative Trait Loci* (QTL) têm gerado uma grande quantidade de informações a respeito das regiões envolvidas na resistência a *F. verticillioides* (ZHANG et al., 2006; LI et al., 2011). Maschietto (2017), utilizando uma população F_{2:3} identificou 15 QTLs associados à resistência distribuídos nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9. Em associação, estudos de expressão diferencial, que utilizam técnicas como RT-qPCR (*Real Time Quantitative PCR*) ou RNA-seq (*RNA-sequencing*), tem contribuído para a validação de genes de efeito significativo para a resistência, e para a compreensão das bases fisiológicas e moleculares dos mecanismos de defesa (DEEPAK et al., 2007). Estas estratégias contribuem com a caracterização do germoplasma estudado e permitem a identificação de importantes regiões genômicas associadas à resistência, sendo úteis para o melhoramento assistido por marcadores moleculares.

Além da identificação de genótipos resistentes, a obtenção concomitante de genótipos com alto potencial produtivo é um dos objetivos dos programas de melhoramento. Para que isso ocorra é importante uma avaliação paralela para a produtividade, caso contrário, o genótipo terá seu sucesso comprometido. Este estudo está dividido em duas seções. Na primeira é realizada a análise fenotípica e genotípica de gerações para o caráter resistência a *F. verticillioides*, com o objetivo de: inferir sobre a variabilidade genética disponível na população segregante; elucidar a herança genética da resistência ao fungo; identificar progênies F_{2:3} com altos níveis de resistência; e verificar o nível de expressão dos genes *LOX8* e *LOX9* em diferentes tempos e genótipos após a inoculação. A segunda seção compreende a análise de produtividade da geração F_{2:3}, que tem por objetivo ranquear as progênies de maior potencial produtivo. Pretendendo-se ao final, identificar genótipos resistentes e com bom potencial produtivo, o que é o objetivo dos programas de melhoramento genético para resistência.

2 Material e Métodos

2.1 Desenvolvimento da população biparental

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária pertencente à Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, Minas Gerais, localizado a 918,84 metros de altitude, 21°12' latitude sul e 45°59' longitude oeste. O clima predominante é o mesotérmico.

Populações segregantes foram obtidas a partir do cruzamento intraespecífico entre as linhagens L75 x L43, provenientes do Programa de Melhoramento de Milho da UFLA. A L75 foi caracterizada previamente por apresentar resistência a *F. verticillioides*, enquanto L43 mostrou-se suscetível (BOTELHO, 2015, dados não publicados). As linhagens parentais L75 e L43 foram cruzadas na safra de 2015/2016 para a obtenção da geração F₁. Na safra seguinte, as plantas F₁ foram autofecundadas para a obtenção da geração F₂ e retrocruzadas com ambos os pais (L75 e L43) para a obtenção das gerações de retrocruzamento, RC₁₁ e RC₁₂ respectivamente. Na safra 2017/2018 as plantas F₂ foram autofecundadas para a obtenção da geração F_{2:3}. Um total de 35 progênies F_{2:3} foram amostradas para a avaliação de produtividade realizada na segunda safra de 2018/2019.

2.2 Delineamento e condução experimental

Para a obtenção das gerações F₁, F₂, RC₁₁ e RC₁₂ as sementes foram semeadas em viveiros, onde foram realizadas polinizações controladas. Na safra 2017/2018 todas as gerações foram semeadas em campo experimental. O experimento foi conduzido seguindo um delineamento em blocos casualizados (DBC) utilizando três repetições, cada uma com 64 parcelas experimentais contendo todas as gerações: L75 (2 parcelas), L43 (2 parcelas), F₁ (2 parcelas), F_{2:3} (42 parcelas), RC₁₁ (8 parcelas), RC₁₂ (8 parcelas) em cada bloco. As parcelas experimentais foram constituídas por uma linha de três metros e espaçamento entre linhas de 0,6 metro, com densidade de quatro plantas por metro linear.

Para o ensaio de produtividade foi utilizado um delineamento em blocos casualizados com três repetições, cada bloco foi constituído pelas 35 progênies F_{2:3} e pelos híbridos DKB390 e 30F53,

utilizados como testemunha. As parcelas experimentais foram constituídas por duas linhas de dois metros, com espaçamento entre linhas de 0,6 metros.

A área experimental foi submetida à dessecação dez dias antes da semeadura, utilizando o herbicida Roundup®. No momento da semeadura foi realizada uma adubação de 350 kg/ha da fórmula 8-28-16 (NPK). No estágio V4 realizou-se a adubação de cobertura, onde foram utilizados 450 kg.ha⁻¹ da fórmula 30-00-20 (NPK). Para o controle da lagarta do cartucho foram feitas as aplicações de inseticida nas épocas adequadas após o plantio.

2.3 Preparo e Infecção com inóculo

Um isolado de *F. verticillioides* oriundo da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos (CMMF) da Embrapa Milho e Sorgo com código F425 (LANZA et al., 2014) foi usado como fonte de inóculo. Este isolado foi reativado em meio de cultura de Malte-Ágar (MA) em placas de Petri e incubado em temperatura ambiente até que fossem confirmadas as características morfológicas específicas da espécie. Em seguida o isolado foi repicado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) para produção massal de conídios. As placas foram incubadas em BOD (27°C/ 12 horas de fotoperíodo) até o crescimento máximo das colônias.

Para o preparo do inóculo foram removidos todo o micélio contido em cada placa de Petri utilizando água destilada autoclavada com auxílio de um pincel estéril. O volume obtido foi coado com o objetivo de separar hifas e conídios. Para a contagem dos conídios uma alíquota de 10 a 20 µl foi aplicada na base da canaleta da câmara de Neubauer ou hemocitômetro e realizada a contagem em microscópio ótico com aumento de 40x. Foi obtida a média entre os quadrantes da câmara superior e inferior. A concentração e volume necessário para inoculação foram ajustados usando a equação abaixo:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Onde:

C_i: Concentração inicial – média do número de conídios contados;

V_i: Volume inicial – volume do inóculo obtido para diluição;

C_f: Concentração final – concentração do inóculo a ser aplicada;

Vf: Volume final – quantidade de inóculo a ser utilizada;

Na safra de 2017/2018 todas as gerações foram inoculadas 15 dias após o início do período de florescimento feminino, marcado pela exposição do estilo-estigma. Uma suspensão na concentração de 10^5 conídios/mL foi inoculada no base do estilo-estigma, como descrito por Robertson et al. (2006). Em cada parcela cinco plantas foram identificadas e inoculadas.

Os dados de temperatura média, precipitação e umidade relativa do ar, do período de plantio à colheita foram obtidos do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia (BDMEP-INMET) (<http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/inicio.php>).

2.4 Avaliação da incidência e severidade de *F. verticillioides*

Alcançado o ponto de maturidade fisiológica foi realizada a colheita manual da safra 2017/2018. Os grãos das linhagens e das gerações F₁, F₂ RC₁₁ e RC₁₂ foram submetidos ao *blotter test* com congelamento (para morte do embrião), como proposto no Manual de Análise Sanitária de sementes (BRASIL, 2009). Para cada tratamento (parcela) foram amostrados 100 grãos. A princípio, as amostras foram pesadas em balança analítica e obtidos o peso total dos 100 grãos e o peso de grãos ardidos. Em seguida, 25 grãos de cada tratamento foram distribuídos em quatro placas de petri contendo três camadas de papel filtro umedecidos com solução de água destilada e ágar (0.2%). Os grãos foram dispostos de modo que não houvesse contato entre eles. As placas foram encubadas por 24 horas a 20 °C em fotoperíodo de 12 horas no escuro. Visando inibir a germinação as placas foram armazenadas por 24 horas a -20 °C em freezer, e em seguida foram mantidas a 20 °C, fotoperíodo de 24 horas por 10 dias. Os tratamentos foram avaliados quanto a incidência (ocorrência da doença) e severidade da doença (evolução da doença). Após o período de incubação, com o auxílio de um estereoscópio, cada grão de cada uma das placas de Petri foram avaliados. Para esta avaliação de severidade e incidência utilizou-se uma escala diagramática, onde se atribuiu as seguintes notas para os grãos: 0 = 0% de grão colonizado pelo fungo, 1 = 1 a 25% do grão colonizado; 2 = 25 a 50 % do grão coberto pelo fungo; 3 = > 50% do grão contaminado. Em cada placa foram contados o número de grãos contendo cada uma das notas citadas.

2.5 Genotipagem

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O DNA genômico das plantas de todas as gerações foi extraído utilizando o procedimento descrito por Pereira et al. (2007). Para os parentais (L75 e L43) e para a geração F₁ foram amostrados 5 e 8 plantas, respectivamente. Para as populações segregantes foram obtidas amostras de 10 plantas. Para cada amostra, cerca de 2 g de folhas jovens foram trituradas com 10 mL de tampão de extração, e 20 µL de β-mercaptoetanol, em almofariz com nitrogênio líquido. O tampão de extração continha 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de polivinilpirrolidona (PVP). As amostras trituradas foram incubadas por 30 minutos, em banho-maria, a 65 °C e mantidas sob leve agitação. Posteriormente foram adicionados 10 mL da solução clorofórmio:álcool isoamil na proporção 24:1, seguido por centrifugação a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante das amostras foram coletados e precipitados pela adição de 30 mL da mistura de etanol 95%: acetato de amônio 7,5M (6:1) e mantidos em um freezer, a -20 °C *overnight*.

Após a precipitação as amostras foram transferidas para novos microtubos, centrifugadas e secas, posteriormente os ácidos nucléicos foram reidratados em tampão TE (1 mM de TRIS e 0,1 mM de EDTA). Foi realizada uma segunda limpeza utilizando clorofórmio:fenol:álcool isoamílico (24:25:1), em seguida o sobrenadante foi coletado e adicionados três volumes da solução de acetato de sódio 3M: etanol 95%, na proporção de 1:20 para a precipitação do DNA. As amostras foram ressuspendidas em tampão TE. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas utilizando o espectrofotômetro Nanovue® (NanoVue GE Healthcare). Posteriormente, as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho.

Foram selecionados onze marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) descritos na literatura (MASCHIETTO et al., 2017) (Tabela1). Estes foram escolhidos por estarem em grupos de ligação importantes para o caráter e por se localizarem próximos a genes/QTLs associados a resistência a *F. verticillioides*. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo 50 ng de DNA genômico (1 µL/reação), 1 µL de cada *primer* (Forward e Reverse) de concentração 10,0 µM, 100 µM de desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1.0 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas), 5,0 µL de tampão de reação 5x (50 mM tris pH 8,3; 2,0 mM MgCl₂; 20 mM

de KCl; 10 µg de BSA; 0,25% de ficoll 400; 10 mM de tartrazine) e água bidestilada, até totalizar 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Applied Biosystems Simple Amp™. O programa de amplificação utilizado foi composto por: uma etapa de cinco minutos a 94°C, para a desnaturação inicial, seguido de uma etapa de 30 ciclos, cada um contendo: uma fase de 30 segundos para desnaturação a 94 °C; 45 segundos para anelamento à temperatura de 56 °C e 45 segundos para extensão a 72 °C. Posteriormente uma etapa de 8 ciclos, a 94 °C por 30 segundos, seguida de 53 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos. Finalizando com uma etapa de oito minutos, a 72 °C, para extensão final. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados por meio de luz ultravioleta (UV). Para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para genotipagem das gerações e seus respectivos QTLs.

Primer	Sequência	QTL
bnlg1909	F: CCTGACCCTGTTCTGAAAA R: GTGTGTCTGGAGCTGTTTCA	qFER-2.4
bnlg1164	F: AAACAGGGTGTGACAGGTCC R: GAACGGGCAGACGCATAAG	qFER-7
bnlg2086	F: CGGAACCTGCTGCAGTTAAT R: GAGATGCAGGAATGGGAAAA	qFER-1
bnlg1337	F: TCTAGAGACGGGAAAACACAAG R: AAAGCCGGTGGATAAGAAAA	qFER-4
bnlg1270	F: TAGTTAACATGAGCAAATTAACAAGA R: TAGAAATGCAGAACCAGGGC	qFER-9.2
dupssr1	F: TGTTCTCAACAACCACCG R: CGTTTAGCGATATCATTTTCC	qFER-5
umc2025	TF: CTAGAGACGGGAAAACACAAG R: AAAGCCGGTGGATAAGAAAA	qFER-1
umc1017	F: TAGTTAACATGAGCAAATTAACAAGA R: TAGAAATGCAGAACCAGGGC	qFB1-4.1
umc1083	F: TGGTCTTCTTCGCCGATTAT R: ATAAGCTCGTTGATCTCCTCCTCC	qFER-6
umc1867	F: TTGTCTGTAGTGAGGCCGTACTIONT R: TGCTCTCCATACAGCAAGAGTACG	qFB1-9.1
phi96100	F: AGGAGGACCCCAACTCCTG R: AAAGCCGGTGGATAAGAAAA	qFER-2.1

F: *Forward*. R: *Reverse*. Maschietto et al., (2017).

2.6 Análises da expressão relativa de transcritos por meio da PCR em tempo real

Dentre os genes citados na literatura com efeito significativo para a resistência a *F. verticillioides* estão: *LOX8* (Enzima Linolenato lipoxigenase), *LOX9* (Lipoxigenase 9), *HMA* (Heavy Metal-associated) e *GATease* (Glutamina amidotransferase 1)(PANIAGO, 2017; MASCHIETTO, et al., 2017). Os *primers* para a amplificação foram cedidos pelo laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Lavras, obtidos em estudos prévios realizados por Paniago (2017).

Foram utilizados grãos da progênie F_{2:3} 83, identificada previamente por apresentar bons resultados para a resistência em campo, e do híbrido DKB390, considerado suscetível. Amostras do material genético foram semeadas na safra 2017/2018 e inoculadas 15 dias após o florescimento. A coleta foi realizada 72 e 96 horas após a inoculação, como descrito por Lanubille (2017). No total foram obtidos oito tratamentos, a considerar: “dois genótipos (83 e DKB390)” x “inoculado e não inoculado” x “Tempos de coleta: 72h e 96h”.

O RNA Total foi extraído utilizando o Reagente Concert™ Plant RNA (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. A quantidade e pureza do RNA foi analisada por espectrofotômetro (NanoVuePlus™) e sua integridade verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com NaCl e clorofórmio, com o objetivo de aumentar a qualidade do RNA. Subsequentemente foi realizado o tratamento com DNase utilizando um kit Turbo DNA-free™ (Ambion) para eliminar resíduos de DNA. A integridade do RNA foi novamente verificada em gel de agarose a 1% e as amostras foram quantificadas utilizando NanoVue v2.0.4 4282. Após a verificação da integridade e pureza das amostras, estas foram utilizadas para a síntese de cDNA utilizando o Kit high Capacit de Transcrição Reversa de cDNA (Applied Biosystems). Em seguida as amostras de trabalho foram armazenadas a -20 ° C.

2.6.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e RT-qPCR

Inicialmente, quatro pares de *primers* (*LOX8*, *LOX9*, *HMA*, e *GATase*) foram testados em ensaios de PCR convencional. Este passo foi utilizado para a validação e seleção dos *primers* que seriam utilizados nos ensaios quantitativos da expressão gênica por RT-qPCR.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 µL, utilizando 5 µL de 5X Green Go Taq® Flexi Buffer, 0,75 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL do mix de dNTP's (10 mM), 0,6 µL de *primer* Forward e 0,6 µL de *primer* Reverse (10 µM), 0,15 µL de Go Taq® DNA Polymerase (5 u/µL) e 1,5 µL de cDNA (10 ng/µL) e o volume foi completado com água. As reações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems Simple Amp™, nas seguintes condições: 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C a 30 segundos, finalizando a reação com uma etapa a 72 °C por 7 minutos e posterior manutenção das amostras a 4 °C. Em seguida, os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1%.

Tabela 2- *Primers* alvo testados em PCR convencional e RT-qPCR

Identificação	Sequência 5'- 3'	Sigla
GRMZM5G822137	TTCTTCTCAGCGATCCGTCT ATCCTTGGCAGTGAATCGAC	Heavy-metal-associated HMA ¹
GRMZM2G171383	CGAGCGTGATGTGGAAAAC CGGTGGATGGATTACCAGTC	GATase1 ²
GRMZM2G104843*	GTGTCCTCCTCGAGCTCATC CCGTCTTGACGTCCTTCTTC	Linolinato lipox. - <i>LOX8</i> ³
GRMZM2G106748*	GCTAGCACCTTCCTTCCTC ATGGCGATGTGGTTCTCAG	9-lipoxigenase ⁴
GRMZM2G33334**	ATCTCGTTGGGGATGTCTTG AGCACCGTTCAAATGTCTCC	FPGS - Folipoliglutamato sintase ⁵

Referências: ¹Bull PC Cox DW (1994), ²Reiners, 2012; ³ Acosta, 2009; ⁴ Schnable et al. 2009; ⁵ MANOLI et al.,2012. *Gene alvo para RT-qPCR. **Gene de referência.

As análises quantitativas da expressão gênica, foram realizadas via qPCRs em termociclador modelo Rotor Gene-Q (Qiagen), utilizando-se o sistema de detecção SYBR-green e o método de quantificação relativa $\Delta\Delta CT$, de acordo com Pfaffl (2001). Foram utilizadas três repetições biológicas em duas replicatas técnicas de cada tratamento para cada gene em estudo. As reações foram realizadas

com um volume final de 15 μ L, composto por 7,5 μ L de SYBR Green, 3 μ L de *primers* (1,5 μ L *forward* + 1,5 μ L *reverse*), 1,5 μ L de cDNA (10 ng/ μ L) e 3 μ L de H₂O RNase free.

As condições térmicas da reação foram de 5 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 10 segundos a 60 °C. A curva de *melting* para análise da especificidade da reação foi realizada, com o aumento da temperatura de 60 a 95 °C, variando 1 °C a cada 5 segundos. Foram utilizadas curvas de diluição do cDNA (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125) para a verificação das eficiências de amplificação de cada um dos *primers*, utilizando o método do $\Delta\Delta$ CT (PFAFFL, 2001) foram calculadas as diferenças relativas de expressão, com o gene de referencia FPGS (MANOLI et al., 2012), sendo calculada em relação a uma amostra calibradora, que foi selecionada de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes estudados.

2.6 Avaliação da produtividade

Na segunda safra de 2019, as 35 progênies oriundas das plantas F_{2:3} e os híbrido DKB390 e 30F53, utilizados como testemunha, foram colhidos manualmente e foi avaliada a produtividade de espigas despalhadas, estimada por meio da pesagem das espigas de cada parcela. Foram mensurados os dados da porcentagem de umidade, obtidos de 5 tratamentos tomados aleatoriamente dentro de cada bloco.

2.7 Análises estatísticas

2.7.1 Avaliação das gerações para a resistência a *F. verticillioides*

A incidência e a severidade do fungo foram avaliadas pelo *blotter test* atribuindo-se notas aos grãos. A incidência é obtida pelo número de grãos infectados (com a presença do fungo) sobre o número total de grãos. De forma similar é obtida a severidade, entretanto, esta varia de 1 a 3, sendo o numerador o número de grãos que apresenta uma nota específica (1, 2 ou 3). Quanto maior a nota, maior a severidade. Para cada uma das gerações foi calculada a incidência e a severidade da doença.

Por se tratar de dados ordinais este caráter não segue uma distribuição normal, neste caso a distribuição multinomial é uma escolha natural para a modelagem de dados categóricos. Utilizou-se a abordagem modelo linear misto generalizado (MLMG) sob enfoque frequentista, as notas foram ajustadas por um modelo *Threshold*, admitindo distribuição multinomial e função de ligação probit (Modelo probit cumulativo), conforme descrito a seguir:

$$\Phi^{-1}(E[y/g]) = X\beta + Z_1g_1 + Z_2g_2 + Z_3p_1$$

Em que:

$\Phi^{-1}(\cdot)$: Distribuição gamma cumulativa inversa;

$(E[y/g])$: Esperança das notas dado os efeitos aleatórios ($E[y/g] = \mu$);

X : Matriz de incidência dos efeitos fixos;

β : vetor dos efeitos fixos;

Z_1 : matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios para genótipo;

Z_2 : matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios para geração;

Z_3 : matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios para parcela;

g_1 : vetor de efeito aleatório para genótipo;

g_2 : vetor de efeito aleatório para geração;

p_1 : vetor de efeito aleatório para parcela.

Utilizando a função *clmm* do pacote *ordinal* (CHRISTENSEN, 2015), estimou-se a variância genética (σ_g^2), a variância dentro de parcela (σ_p^2), a herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), a acurácia, os BLUPs (*Best Linear Unbiased Prediction*) dos efeitos genotípicos e as variâncias de predição do erro (σ_{BLUP}^2), utilizando os dados de notas. O gráfico *Caterpillar* foi gerado a partir dos BLUPs e erros de predição, utilizando o pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2016). A deviance do modelo foi estimada pelo critério de Akaike (*Akaike Information Criterion* - AIC). Foram estimados o ganho de seleção com base nos BLUPs dos 15% melhores genótipos utilizando a seguinte expressão:

$$h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{1 + \sigma_g^2 + \sigma_p^2}$$

$$GS = ds \cdot h_a^2$$

Em que:

σ_g^2 : variância genotípica;

σ_p^2 : variância dentro de parcela;

ds : Diferencial de seleção, obtido pela média das progênes selecionadas subtraída da média original;

h_a^2 : herdabilidade no sentido amplo.

Com os dados de peso dos 100 grãos, tomados das amostras utilizadas para *blotter test*, foi realizada a ANAVA, pelo pacote *lme4*, software R v.3.5.1. Foi utilizado um modelo misto, considerando genótipo e bloco como efeitos aleatórios e geração como efeito fixo. Foram obtidas a herdabilidade no sentido amplo (h_a^2) e a acurácia. O BLUP e as variâncias de predição do erro (σ_{BLUP}^2) foram calculados.

Foi calculada a correlação entre as variáveis incidência e peso de 100 grãos usando o software R v. 3.5.1. Foram também obtidos a análise de componentes principais e o gráfico biplot utilizando o pacote FactoMineR. Os dados de incidência, severidade, peso de grãos sadios e peso de grãos ardidos foram comparados conjuntamente por PCA (*Principal Component Analysis*) para se ter uma visão global da interação desses fatores.

2.7.2 Avaliação da produtividade das progênes F_{2:3}

Para a análise dos dados de produtividade de espigas despalhadas obtidos considerou-se o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + p_i + r_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} : valor observado na parcela que recebeu o progênie i , dentro da repetição j ;

μ : constante associada às observações;

p_i : efeito aleatório da progênie i ;

r_j : efeito aleatório da repetição j ;

e_{ij} : efeito aleatório do erro experimental, assumindo-se que os erros são independentes e normalmente distribuídos com média zero e variância (σ_e^2).

Considerando as esperanças dos quadrados médios, foram obtidas as estimativas dos componentes de variância. As fórmulas para a obtenção da variância genética e variância fenotípica entre progênes são apresentadas a seguir:

$$\sigma_g^2 = \frac{QMP - QMR}{r}$$

$$\sigma_f^2 = \frac{QMP}{r}$$

Em que:

QMP: quadrado médio da fonte de variação referente às progênes;

QMR: quadrado médio do resíduo;

r: número de repetições.

A partir das estimativas dos componentes de variâncias obtidas, estimou-se a herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), o ganho esperado com a seleção entre progênes e a precisão experimental, esta por sua vez foi estimada pelo coeficiente de variação experimental (CV) e acurácia (*rgg*).

$$h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_f^2}$$

$$CV = \frac{100\sqrt{QMR}}{m}$$

$$rgg = \sqrt{h_a^2} \cdot 10$$

Em que: *m* é a média geral.

3 Resultados

3.1 Análise de incidência e severidade da doença

O período mais propício para a inoculação de *F. verticillioides* é na fase do florescimento das plantas. Neste período, ocorrido no mês de fevereiro de 2018, a temperatura média registrada foi de 24 °C, com precipitações pluviométricas de 85,5 mm e umidade de 74,5%. Os dados de precipitação, temperatura máxima e mínima média e umidade relativa do ar estão apresentados na figura 1.

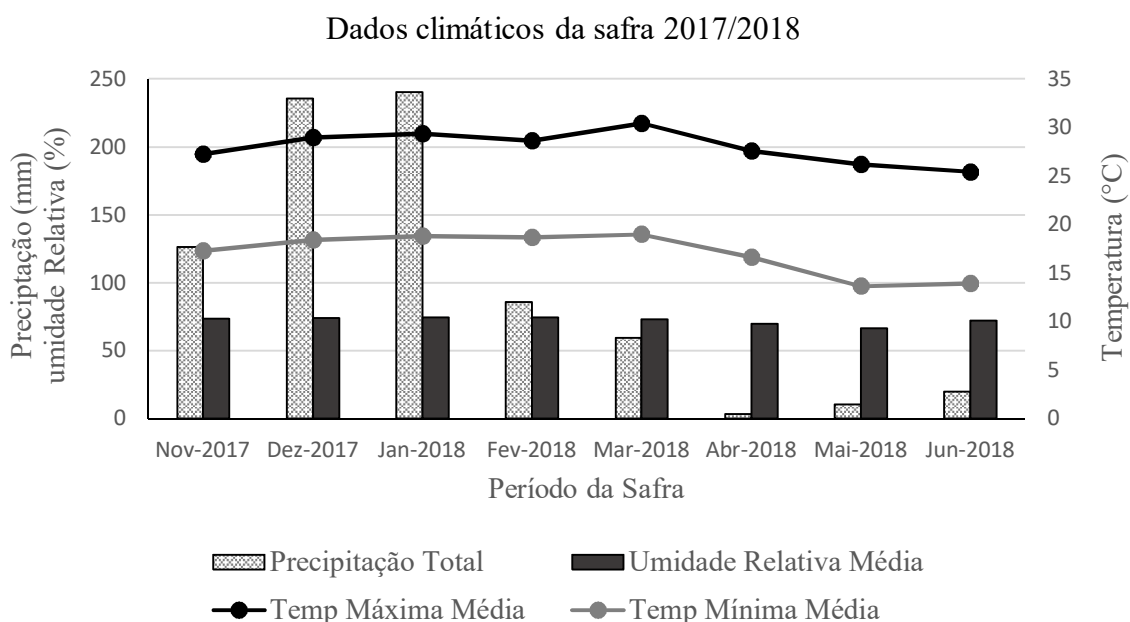


Figura 1 – Dados médios de precipitação, temperatura mínima e máxima média e umidade relativa do ar em Lavras, MG, na safra de 2017/2018. Fonte: <http://www.inmet.gov.br/portal/index>.

A eficiência da inoculação é confirmada pela alta incidência do patógeno, resultado obtido pelo *blotter test* (Figura 2). As frequências das notas de severidade da doença para os parentais e as gerações F₁, F_{2,3}, RC₁₁ e RC₁₂ esta apresentada na figura 2. Tal distribuição é uma simplificação dos resultados obtidos pelo *blotter test* para as gerações, usando a classificação da escala diagramática. A menor

incidência de *F. verticillioides* foi observado para a linhagem L75 (91,62%) (considerada resistente), seguida pelo retrocruzamento RC₁₁ (91,58%). A linhagem L43 (considerada suscetível), mostrou a maior incidência (98,66%). Ao considerar a severidade da infecção por *F. verticillioides*, verifica-se que L75 obteve a maior porcentagem (21,63%) de grãos avaliados com nota mínima de severidade, e menor porcentagem (55,48%) de grãos avaliados com a nota máxima. A severidade foi maior para as plantas da geração F₁, nestas, 83,5% das sementes tiveram nota 3 e apenas 8,6% dos grãos apresentaram nota mínima (1). Apesar das gerações apresentarem diferentes valores de severidade constata-se pela análise de variância que não existe diferença significativa entre gerações.

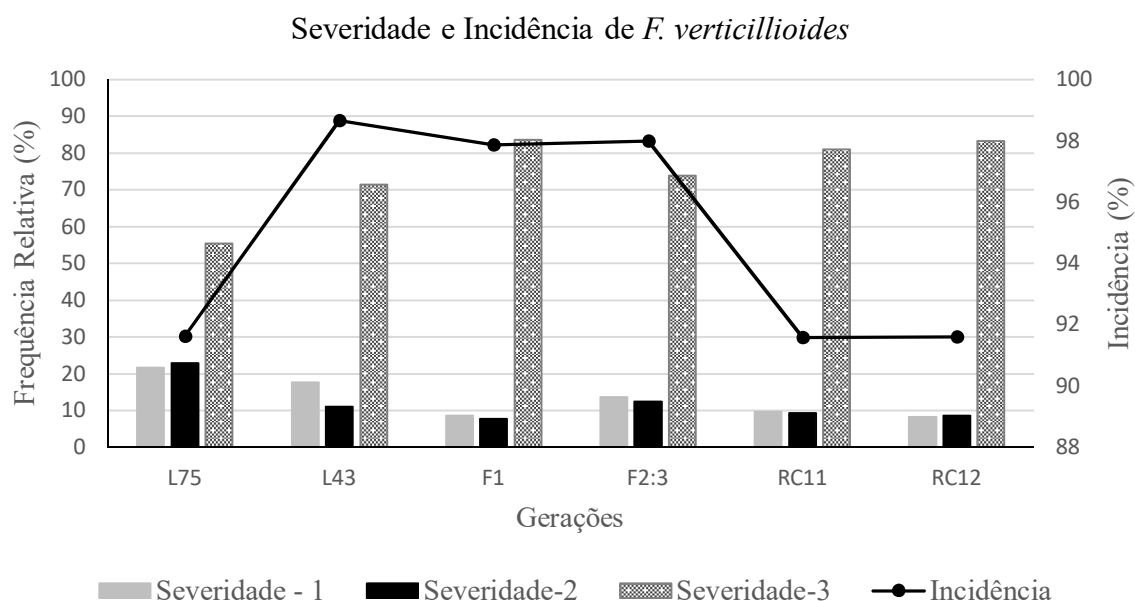


Figura 2 – Frequência relativa da incidência e severidade de *F. verticillioides* para todas as gerações. Severidade1 = nota 1; Severidade 2 = nota 2; Severidade 3= nota 3.

A nota média de severidade do parental L75 foi de 2,0837, do parental L43 foi de 2,4283 e da geração F₁, 2,6909. Para as gerações segregantes F_{2:3}, RC₁₁ e RC₁₂, as notas médias foram de 2,5492, 2,4859 e 2,5192 respectivamente (dados não apresentados). O ajuste de dados categóricos por abordagens MLMG respeita a natureza da variável aleatória e viabiliza melhores previsões do valor genético. A função *logit* estimou os limiares (*thresholds*) para as categorias (Figura 3). A validação do modelo para o conjunto de dados proposto foi verificado pelo critério de Akaik. Comparando os resultados de AIC dos modelos testados, o modelo proposto foi o que melhor se ajustou aos dados, com um valor de AIC de 43571,57.

A variância genética dentro de gerações foi significativa para o caráter resistência, entretanto a variância genética entre gerações foi nula, sugerindo que não existe diferença significativa entre as gerações, portanto, não existe diferenças significativas entre os parentais L75 e L43. A herdabilidade no sentido amplo foi de 40% e a variância entre blocos foi de 0,415. A acurácia de 62% indica boa precisão experimental (Tabela 3).

Tabela 3 - Componentes de variância e herdabilidade para o caráter resistência a *F. verticillioides*

Efeito aleatório	Variância	Erro padrão
Parcela	0,264	0,513
Genótipo	0,829*	0,910
Geração	0,000	0,000
Efeitos fixos	Estimativa	Erro padrão
Bloco	0,415	0,073
h_a^2	0,400	-
Acurácia	0,629	-

Aplicando uma intensidade de seleção de 15% o ganho após um ciclo de seleção foi de -0,7046. Na figura 3 está representado o progresso com a seleção das progênies $F_{2:3}$ baseado em seus valores genotípicos (BLUPs). Na figura 3 observa-se que ocorre um deslocamento da curva para limiares (*Thresholds*) inferiores, este deslocamento refere-se ao ganho com a seleção (-0,7046), portanto, quanto maior o deslocamento da curva para a esquerda, em direção aos limiares inferiores, maior será o progresso com a seleção.

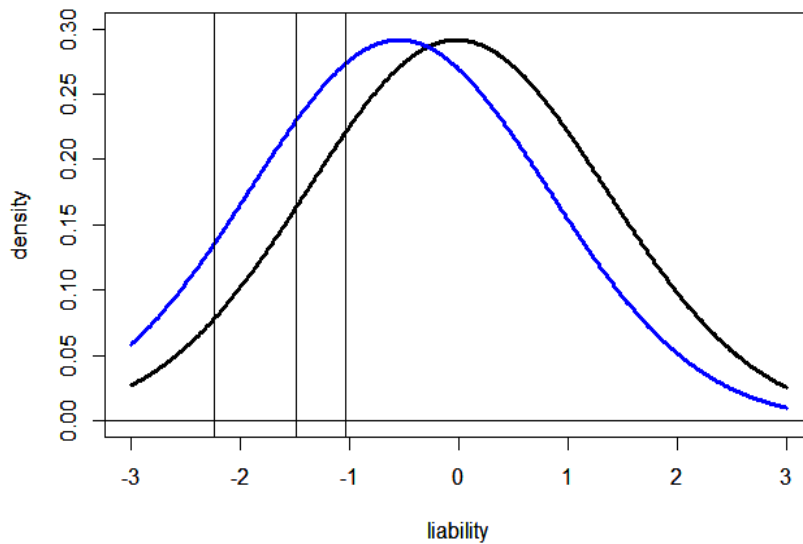


Figura 3 – BLUP da população $F_{2:3}$ após a seleção para o caráter resistência a *F. verticillioides*. Preto: BLUP da população original; Azul: BLUP da população selecionada.

As progênies 97, 69, 4, 16, 110 e 62 foram as que apresentaram melhor desempenho para a resistência sob uma intensidade de seleção de 15%. Baseado nos BLUPs dos valores genotípicos e de seus intervalos de predição foi sintetizado o gráfico *caterpillar* (Figura 4). As dez melhores progênies para o caráter resistência a *F. verticillioides* estão a esquerda da linha vermelha. A seleção destes genótipos permitirá ganhos de seleção na direção desejada

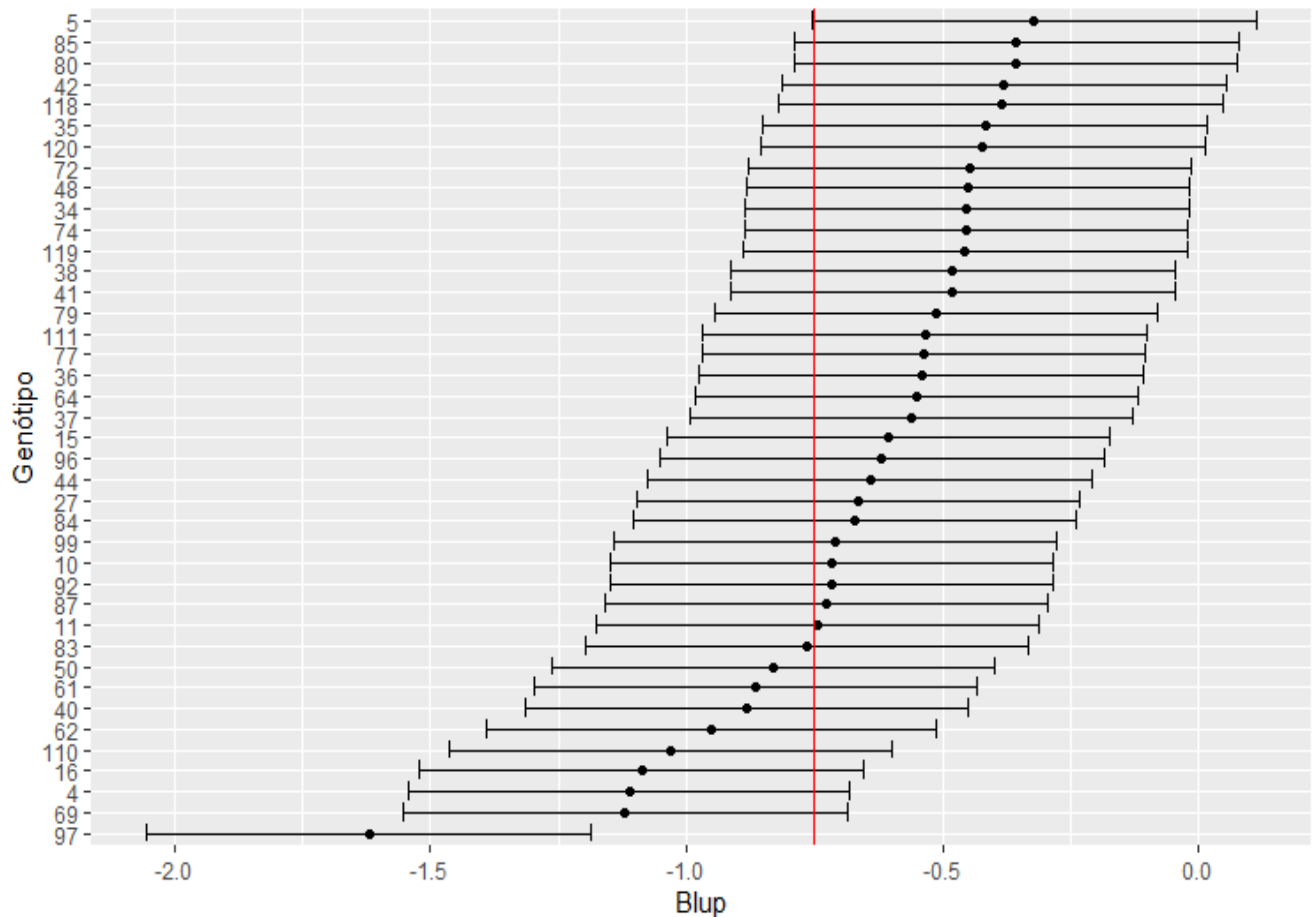


Figura 4 – Gráfico *caterpillar* apresentando os BLUPs das progênies F_{2:3} de melhor desempenho para nota, selecionadas sobre intensidade de seleção de 15%.

3.1.1 Peso de 100 grãos

As médias de peso de 100 grãos para as gerações L43, L75, F₁, F_{2:3}, RC₁₁ e RC₁₂ estão apresentadas na figura 5 e na tabela 4. Na figura 5 é apresentada uma estimativa percentual da incidência de grãos ardidos em amostras de 100 grãos. Observa-se que a incidência de grãos ardidos na linhagem L43 foi superior ao encontrado para a linhagem L75. A geração F₁ mostrou os menores valores para o número de grãos ardidos, seguida pelas gerações RC₁₁ e RC₁₂. A geração F_{2:3} obteve os maiores valores para peso de grãos ardidos.

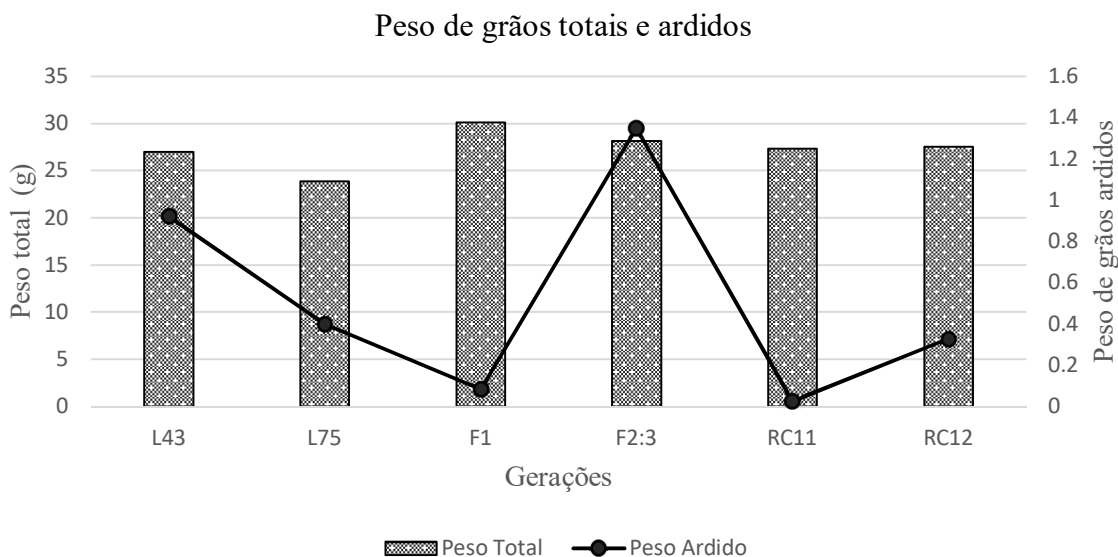


Figura 5– Média do peso de grãos totais e peso de grãos ardidos para todas as gerações.

Tabela 4 – Médias de peso de 100 grãos para as gerações.

Geração	Média	Variância
L75	23,832	4,812
L43	27,014	11,291
F ₁	30,091	6,488
F _{2:3}	28,124	32,515
RC ₁₁	27,351	16,541
RC ₁₂	27,555	21,157

Pela ANAVA observamos que não houve diferença significativa entre gerações para o caráter peso de grãos (Tabela 5). Entretanto, a linhagem L75 obteve desempenho inferior à linhagem L43. A geração F₁ apresentou peso superior ao dos parentais, e a geração F_{2:3} apresentou a maior variação entre as gerações, como esperado. A variância genética entre genótipos dentro de gerações foi significativa, com isso é possível inferir sobre a existência de variabilidade genética para este caráter. A herdabilidade de 68% é considerada alta para o caráter estudado. A acurácia de 82% é um indicativo de boa precisão experimental.

Tabela 5 – Análise de variância para o caráter peso de 100 grãos.

Fonte de Variação	Variância	Erro padrão
Genótipo	18,065*	4,063
Geração	0,000	0,00
Bloco	0,141	0.376
Resíduo	7,182	2,680
h_a^2	0,684	-
Acurácia	0,827	-

Foram obtidos os BLUPs para peso de 100 grãos. Nesta condição, as progênes F_{2:3}: 61, 77, 92, 85, 50, 111 estiveram entre as 15% melhores progênes.

3.1.2 Correlação e PCA

A correlação de Pearson entre a incidência e o peso de grãos ardidos foi não significativa (r : 0,1074; p -valor: 0,087), assim, não é possível concluir que a correlação entre esses caracteres é diferente de zero. A análise de componentes principais mostra que o componente principal 1 (PC1) e o componente principal 2 (PC2) explicam 32,33 e 24,55% da variação, respectivamente. O primeiro componente principal mostra fortes associações entre peso sadio e peso total, e apresenta-se negativo e de baixa intensidade para peso de grãos ardidos, com isso é possível inferir que grãos ardidos e peso total não estão associados. O primeiro componente também apresenta associações para severidade e incidência,. O segundo componente principal (PC2) está positivamente associado a peso de grãos sadios e total, e negativamente associado a peso ardido. Observa-se que as gerações estão bem distribuídas, indicando que não existe uma relação direta entre geração e as variáveis analisadas (Figura 6).

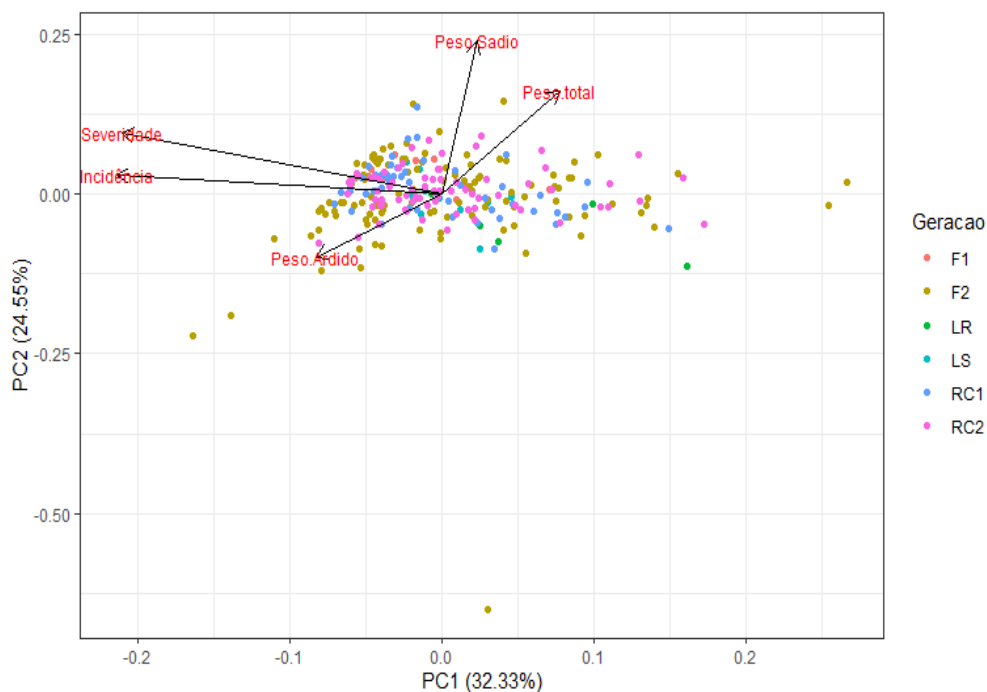


Figura 6 – Gráfico biplot da análise de componentes principais para as variáveis peso de 100 grãos, peso de grãos ardidos, peso total, severidade e incidência de *F. verticillioides*.

3.1.3 Genotipagem e Análise de expressão

Os 11 *primers* testados estavam associados à QTLs nos cromossomos 1, 2, 4, 6, 5, 7 e 9 do genoma do milho (MASCHIETTO et al., 2017). Dos 11 *primers* SSR testados bnlgl1164, umc1017, umc1083, umc1864, umc2025 e phi96100 foram monomórficos para todas as gerações. Os *primers* bnlg2086, bnlg1909, bnlg1337, bnlg 1270 e dupssr1, localizados nos cromossomos 1, 2, 4, 9 e 5 respectivamente apresentaram bons resultados de amplificação e mostraram polimorfismo entre as gerações (Tabela 6). Os *primers* dupssr1 (q-FER), bnlg 2086 (q-FER-5) e bnlg 1909 mostraram claras diferenças entre os genótipos parentais. Observa-se na figura 7 uma distinção entre os produtos de amplificação gerados para parentais L75 e L43 pelo *primer* dupssr1 (q-FER5). Os demais *primers* foram monomórficos para a maioria das bandas amplificadas, não apresentando diferenças entre as gerações. Pelos resultados da genotipagem, apresentados na tabela 6, observa-se que as bandas 150 de *dupssr1* são ausentes no parental L43 (1) e presente no parental L75 (2), o mesmo é observado para a banda de 350 pb do *primer* bnlg 1909, e para a banda de 350 pb do *primer* bnlg2086.

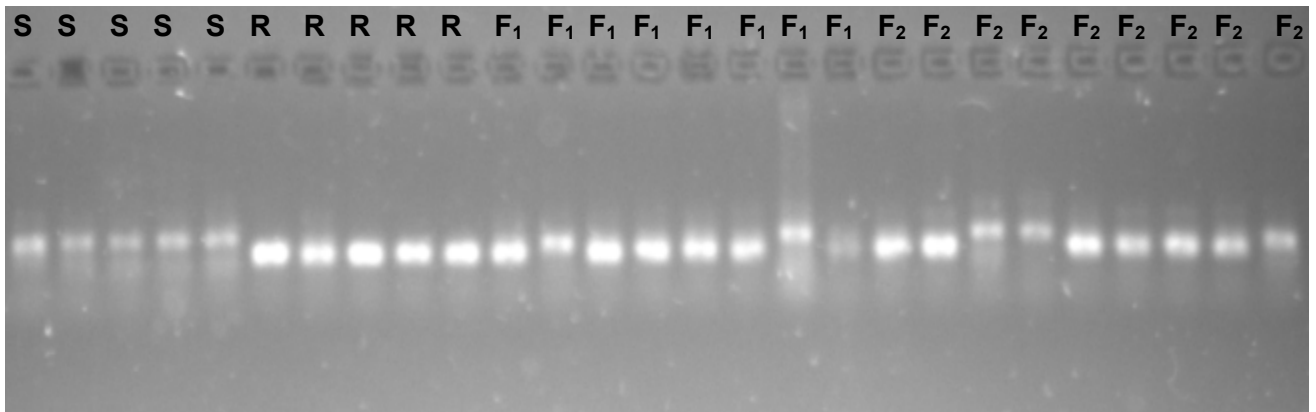


Figura 7 – Resultado de amplificação do *primer dupssr1*, em gel de agarose 1%. S: amostra do genótipo L43; R: amostra do genótipo L75; F₁: geração F₁; F₂: geração F_{2:3}.

3.1.4 PCR (Polymerase Chain Reaction) e RT-qPCR

O uso das reações convencionais de PCR é útil para a validação dos genes alvo, uma vez que os padrões diferenciais de bandas (intensidade de banda) podem, em alguns casos, ser correlacionados com os valores quantitativos de expressão obtidos com a RT-qPCR. Pelo PCR convencional foi verificado que os genes *LOX9* e *LOX8* tiveram repetibilidade dos resultados em diferentes géis, e foram polimórficos entre alguns dos tratamentos, desse modo esses foram selecionados para a análise de expressão em tempo real.

A expressão média dos genes *LOX8* e *LOX9* foi verificada para o genótipo 83 (progênie F_{2:3}) e para o híbrido DKB390, inoculados e não inoculados (controle) e coletados em 72 e 96 horas. A expressão do gene *LOX9* para o tratamento DKB390 não inoculado, colhido no tempo de 72 horas foi inferior ao tratamento inoculado. Da mesma forma o tratamento DKB390 não inoculado em 96 horas foi inferior ao inoculado. Observa-se que os valores de expressão para a 83 foram superiores aos do genótipo DKB390, em geral. A progênie 83 apresenta no tempo de 72 horas com inoculação um incremento da expressão do gene *LOX9*. Isso indica que seu sistema imune é ativado em decorrência da infecção. Às 96 horas após a inoculação esse cenário se reverte, de modo que as amostras inoculadas apresentam menor expressão que as não inoculadas (Figura 8A).

Para o gene *LOX8* observa-se que o híbrido DKB390 apresentou maior expressão em decorrência da inoculação, em ambos os tempos, sendo sua expressão aumentada 96 horas após a inoculação. Em contrapartida a progênie 83 apresentou menor expressão em ambos os tempos, comparado ao genótipo suscetível.

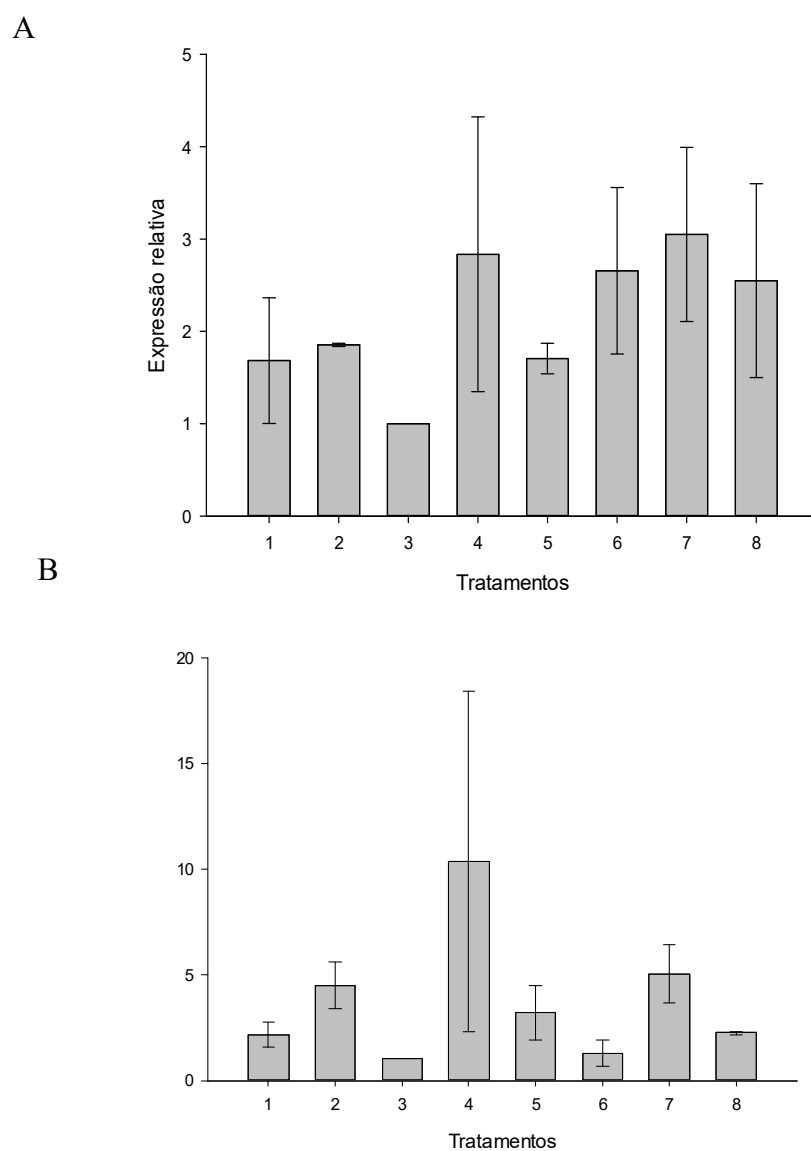


Figura 8 – A: Gene Alvo *LOX9*. B: gene alvo *LOX8*. Tratamento 1 ao tratamento 4 (“suscetível”): 1- DKB390- não inoculado-72h; 2 - DKB390 - inoculado 72h; 3 - DKB390 - não inoculado 96h; 4 - DKB390 - inoculado 96h. Tratamento 5 ao 8 (Progênie): 5 - P83 - não inoculado 72h; 6 - P83 - inoculado 72h; 7 - P83 não inoculado 96h; 8 - P83 inoculado 96h.

3.2 Análise de produtividade

O resumo da análise de variância para produtividade de espigas despalhadas e as estimativas de parâmetros genéticos envolvendo todas as progênes da geração F_{2:3} são apresentados na Tabela 7. Não existe diferença significativa entre as progênes, sugerindo que não existe variabilidade genética dentro desta geração. A interação Progênie x Testemunha foi significativa, o que ocorreu devido a superioridade dos híbridos em relação às progênes F_{2:3}.

Tabela 7 – Análise de variância para o caráter produtividade de espigas despalhadas.

FV	GL	SQ	QM	p-valor
Bloco	2	0,006	0,0032	0,7990
Tratamentos	37	1,357	0,0366	0,0003 *
Progênie	35	0,827	0,0236	0,0825
Testemunha	1	0,002	0,0019	0,7166
Prog x test	1	0,528	0,5283	2.606e-07*
Resíduos	74	0,853	0,0143	
σ_g^2			0,0031	
σ_f^2			0,0047	
h_a^2			0,6226	
Acurácia			0,7886	
CV			17,6872	

Tratamentos: Progênes F_{2:3}, linhagens e DKB390 e 30F53. Progênie: apenas as progênes F_{2:3}.

*Significativo a 5%.

A herdabilidade para o caráter produtividade de espigas despalhadas foi de 62%, este valor é considerado alto para o caráter (AMORIM, 2005). A acurácia foi de 78% e o coeficiente de variação foi de 17,68%, tais valores indicam boa precisão experimental. As progênes 69, 96, 44, 74, 61, 110 e 64 apresentaram os melhores valores para o produtividade. Considerando os resultados obtidos para a resistência e para a produtividade, selecionamos as progênes 69, 61 e 110 como promissoras para ambos os caracteres.

4 Discussão

A temperatura e a umidade são relevantes para a ocorrência e o progresso das doenças. Estes fatores afetam os estágios de desenvolvimento do patógeno (germinação, infecção e colonização) e interferem na expansão da lesão, incidência e na severidade da doença (KUSHALAPPA et al., 1993). No período de florescimento, mês de fevereiro, a temperatura média registrada foi de 24°C e a máxima de 31,8 °C, no mês de março a média foi de 25°C e a máxima de 30,4 °C, estas temperaturas estão de acordo com a ideal para o desenvolvimento do patógeno, que é de 25°C. Galić et al. (2019) relata que a temperatura máxima de 30 °C, registrada em alguns períodos do mês de março, permite um rápido crescimento das colônias e favorece a proliferação do patógeno. Em adição, o clima úmido e chuvoso, como o ocorrido no dia da inoculação, é um importante fator para o desenvolvimento da doença. Desse modo, as condições apresentadas na safra foram adequadas para o desenvolvimento de *F. verticillioides*. O êxito obtido com a inoculação foi claramente observado pelos resultados de incidência obtidos pelo *blotter test* (Figura 2).

A incidência média observada para todas as parcelas foi de 94,72%. Este valor é similar ao relatado por Galić et al. (2019) (94%) em experimento conduzido em regiões com alta incidência de insetos vetores do fungo. Como mencionado por Maschietto et al. (2017), Clements et al. (2003), Galić et al. (2019) e Balconi et al. (2014), a inoculação artificial permite uma avaliação consistente da doença, em especial em áreas onde a incidência do patógeno não é homogênea. Como discutido por Reid e Zhu (2005), a inoculação possibilita boas estimativas dos componentes genéticos de variância, e, por consequência, a obtenção de estimativas fidedignas da herdabilidade, com isso aumenta-se o poder de seleção para o caráter.

Entretanto, o uso de alta pressão de inóculo pode causar certo confundimento nos resultados das análises para resistência. Tanto para as linhagens quanto para as populações segregantes observa-se alta incidência e alta porcentagem de grãos apresentando o nível máximo de severidade (nota 3). Essa homogeneidade entre as estimativas desses parâmetros para as diferentes gerações pode ser explicada pela alta pressão de inóculo (1×10^5) e pelas condições ambientais, que favoreceram o desenvolvimento do fungo. Além disso, sugere-se que a pressão do inóculo artificial possa ter sido incrementada pela pressão de inóculo natural da área experimental. Esses fatores dificultam a avaliação e a discriminação dos genótipos quanto a resistência, e pode ter sido uma das causas que

contribuíram para a não identificação de diferenças significativas entre as gerações, resultado apresentado pela análise de variância (Tabela 2).

A falta de contraste entre os parentais é um fator limitante na estimação de parâmetros genéticos (variância aditiva, desvio de dominância e epistasias) por métodos tradicionais. No entanto, não limita o estudo da variabilidade da população (CRUZ, 2010).

Apesar da não significância entre as gerações, os resultados de média e as frequências relativas de severidade mostram uma superioridade da linhagem L75 em relação à linhagem L43, o que sugere a existência predominante de alelos associados a resistência nesse parental.

A geração F_1 apresentou maiores estimativas para média e severidade da doença (Figura 2). Isso sugere que nessa geração os alelos de suscetibilidade apresentam efeito dominante, e que parte considerável dos alelos associados à resistência sejam recessivos. Assim, a resistência se manifesta na linhagem resistente pois esta apresenta os alelos favoráveis em homozigose. A geração RC_{11} , oriunda do cruzamento entre o parental L75 (resistente) e a geração F_1 (L75 x L43), mostrou-se discretamente superior ao RC_{12} , isso ocorre por que após uma geração de cruzamento aumenta-se a contribuição (dose) do parental L75, e a frequência de alelos associados a resistência em homozigose é aumentada.

Na geração segregante $F_{2:3}$ observa-se uma maior porcentagem de notas 3 (máxima para severidade), e média superior ao parental L43 (suscetível). Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Robertson (2006) e Maschietto (2017). Estes autores obtiveram duas populações biparentais oriundas do cruzamento entre linhagens contrastantes para a resistência, e observaram a superioridade de alguns genótipos das populações segregantes em relação aos parentais, característico da segregação transgressiva.

Nesse fenômeno, indivíduos de populações segregantes podem apresentar reações ao patógeno superiores ou inferiores aos parentais resistentes ou suscetíveis, respectivamente. Isso ocorre em casos em que os pais não possuem as combinações genótípicas extremas, ou seja, o parental resistente não inclui todos os alelos para a resistência e o parental suscetível não possui todos os alelos para a suscetibilidade.

Assim, infere-se que a linhagem L43 (suscetível) apresente para alguns *loci*, alelo(s) de resistência, podendo contribuir com a resistência, e a linhagem L75 (resistente) possua em alguns *loci*, alelos que resultem em suscetibilidade. Com isso, é sugerido que os parentais não sejam

totalmente contrastantes. Os resultados da genotipagem contribuem com estas afirmativas. Dos cinco marcadores avaliados, apenas três mostraram diferenças entre os parentais. Os demais *primers* não mostraram polimorfismos. Esse fator pode ser explicado devido à inconsistência das marcas entre os genótipos utilizados no trabalho de Maschietto et al. (2017) e os avaliados neste estudo, devido ao fato de os parentais não estarem fixados para esta marca e, pode ser explicado também, pela presença de alelos associados a resistência em genótipos suscetíveis ou alelos associados à suscetibilidade em genótipos resistentes.

Maschietto et al. (2017) mostra que o QTL qFER-2.4, associado à marca bnlgl1909, explica 11,6% da variação fenotípica para o caráter resistência a *F. verticillioides*. Essa marca foi diferencialmente expressa entre os parentais nesse trabalho, indicando que possa estar associada à resposta de resistência da L75. Neste mesmo QTL foram identificados por este autor importantes genes candidatos, tais como: o gene de defesa Barley *mlo*, o gene da Lipoxigenase 8 (Enzima linolenato lipoxigenase), o gene que codifica para a proteína de choque térmico (class IV) e os genes da Tiorredoxina e Serina-treonina-proteína quinase. Destes, os três primeiros genes são moduladores, ou seja, apresentam expressão modificada pela presença do patógeno.

Os genes da lipoxigenase são importantes para a resistência. O gene *LOX9*, associado a resistência para algumas espécies como milho e tabaco, atua na biossíntese dos ácidos graxos (SCHNABLE et al., 2009). Em estudos com tabaco foi verificado que a atividade da *LOX9* e seus metabólitos de hidroperóxido iniciaram a morte celular programada e a resposta hipersensitiva (HR) induzida pelo patógeno bacteriano *Ralstonia solanacearum* (CACAS et al., 2005), sugerindo que o *LOX9* têm função na resposta de defesa pela síntese de compostos antifúngicos ou atua no processo de sinalização, contribuindo para a defesa das plantas. Nesse estudo a análise de expressão do gene *LOX9* indicou que sua expressão é aumentada sob condição de estresse (inoculação), seja em genótipos resistentes ou suscetíveis. A expressão do gene *LOX9* pode ser aumentada em até 3 vezes, como no caso do híbrido DKB390 avaliado após 96 horas da inoculação. Para este mesmo gene o genótipo 83, caracterizado por apresentar bons desempenhos nas avaliações fenotípicas para resistência, teve sua expressão visivelmente superior à do híbrido DKB390 (Figura 8A). Isso indica que para esta progênie a expressão do gene é superior a observada em genótipos suscetíveis. A redução da expressão do gene no genótipo 83 com 96 horas após a inoculação é um indicativo de que este tem seu pico por volta das 72 horas, no início da infecção do patógeno.

A investigação da expressão do gene *LOX8* mostrou que para o híbrido DKB390 a inoculação com o patógeno induz a expressão do gene, de modo que o tratamento inoculado apresenta uma expressão aproximadamente 10 vezes superior ao não inoculado, quando avaliado 96 horas após a inoculação. O gene da Lipoxigenase 8, em especial, já foi observado por demais autores como relevante para a resistência a *F. verticillioides* (LANUBILLE, 2017; CACAS et al., 2015). As lipoxigenases são isoenzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos polinsaturados. Quando ocorre a degradação dos tecidos das plantas por danos mecânicos ou devido ao ataque de patógenos, uma degradação seqüencial dos lipídios é iniciada. Neste processo, o hidroperóxido-ciclase, produto primário da reação das lipoxigenases, dá origem ao ácido jasmônico. Este atua na resposta de defesa das plantas e é considerado um dos principais fitohormônios diretamente envolvidos na resistência das plantas aos fungos necrotróficos. Quando os níveis de ácido jasmônico estão em alta, aumenta-se também a resposta ao dano causado pelos patógenos, desencadeando a formação de muitos tipos de defesa vegetal, portanto esse hormônio age como um regulador da resposta de resistência. Para este gene vemos que a expressão em genótipos suscetíveis é aumentada quando ocorre a inoculação, o mesmo não ocorre para o genótipo 83. Alguns genes de resistência são mais expressos em genótipos suscetíveis que em resistentes sob condição de estresse, de modo que em genótipos resistentes outros genes, associados a outras rotas podem estar atuando (Comparação entre os tratamentos 1 e 5; 2 e 6 da figura 8B).

Os resultados da análise de expressão foram importantes para a validação dos genes *LOXs* como indicadores da resistência, pois na maioria dos cenários observados sua indução foi superior após a inoculação.

Apesar da utilização da progênie 83, sua superioridade quanto a resistência ainda deve ser avaliada. Para a constatação da resistência, como relatado por Lima et al. (2012), é importante uma maior averiguação da população $F_{2:3}$ e uma análise fenotípica minuciosa realizada em diferentes tempos e ambientes, com isso será possível um maior conhecimento da variabilidade e do potencial das progênies quanto os níveis de resistência.

A variância genética significativa dentro de gerações para a resistência, como o observado neste trabalho, é crucial para a condução e o avanço da população, pois com isso é possível obter genótipos com valores genotípicos superiores, que permitirão maiores ganhos de seleção nos próximos ciclos. Como relatado por Maschietto et al. (2017), a resposta à seleção para resistência a

F. verticillioides pode ser aumentada em função da variabilidade genética dos genótipos e do diferencial de seleção.

A herança da resistência a *F. verticillioides* é controlada por muitos *loci*, cada um contribuindo com uma pequeno efeito aditivo, sendo, portanto, muito afetado pelo ambiente (CLEMENTS, et al., 2000). Assim, para a obtenção de um híbrido promissor, é importante que ambas as linhagens parentais possuam em seus genótipos alelos favoráveis à resistência (HALLAUER et al., 2010). Portanto, no processo de melhoramento, é importante identificar na população segregante progênies que possuam boas médias para o caráter resistência e variabilidade. A variância genética significativa (Tabela 3) é um indicativo de que pode-se explorar a população F_{2:3}, obtida neste trabalho, para a identificação de genótipos com boas performances, que contribuam como linhagens doadoras de alelos de resistência.

Por permitir prever o sucesso com a seleção, a herdabilidade é um dos parâmetros genéticos mais utilizados pelos melhoristas. Para o caráter resistência a *F. verticillioides*, têm sido encontrada herdabilidades de baixa a moderada magnitude. Neste trabalho a herdabilidade no sentido amplo foi de 0,40, valores similares foram obtidas por Galić (2019) de (0,41), Pérez-Brito (2001) (0,26-0,42) e Robertson (2006) (0,47-0,80).

As estimativas da acurácia foram superiores a 62%, podendo ser consideradas de média a alta magnitude, evidenciando que houve boa precisão experimental. Como reportado por Zila et al., (2013), a seleção baseada na média fenotípica têm sido favoráveis para a redução da infecção do patógeno e de diminuição dos níveis de fumonisinas .

A seleção baseada no valor genotípico do indivíduo permitiu um ganho com a seleção de - 0,7046. A seleção baseada em estimadores do tipo *shrinkage* tem por característica ser mais acurados e de mínimo erro, propiciando inferências mais corretas, neste sentido, maximiza-se a acurácia e aumenta a precisão experimental. Na figura 4, observa-se o deslocamento da curva gerada pelos valores genotípicos preditos (azul) em relação a curva para as médias da população original (preta), o que representa o ganho de seleção. Desse modo os genótipos selecionados são potenciais para o uso em programas de melhoramento para a resistência.

Diferente do observado para a severidade, a geração F₁ apresentou uma das menores porcentagens para grãos ardidos. Devemos considerar que os grãos ardido são resultado da interação de *F. verticillioides* com um conjunto de fungos. É possível que a F₁ apresente reação positiva,

possivelmente associada a heterose, para estes fungos em geral, e quando analisada individualmente para *F. verticillioides* esta reação não prevaleça, podemos observar que a linhagem L75, a F1 e o RC11 apresentaram baixa porcentagem de grãos ardidos. Isso é um indicativo que diferentes genes possam atuar na defesa contra grãos ardidos.

A escolha das linhagens para este estudo se baseou em resultados de Botelho, 2015 (dados não publicados), que afirma sobre a resistência da linhagem L75 a *F. verticillioides*. Entretanto devemos considerar que a análise realizada por esse autor foi sobre grãos ardidos, e que a resistência avaliada possivelmente foi atribuída ao complexo de fungos responsáveis por essa doença, e não a *F. verticillioides* especificamente. *F. verticillioides* é um fungo endofítico, que diferente da maioria dos fungos responsáveis pelos grãos ardidos, sobrevive no interior das sementes, muitas vezes assintomaticamente. Dessa forma para se avaliar a resistência a *F. verticillioides* necessita-se de uma análise que permita a visualização do fungo, que vive no interior da semente (BLACUTT et al., 2017). Devido a isso é importante a utilização de avaliações como o *blotter test*. Neste teste são dadas condições favoráveis de temperatura, luz e nutrientes, necessárias para a proliferação do fungo de dentro para fora da semente. Dessa maneira, é possível avaliar a severidade e inferir sobre a resistência dos genótipos. Esse é outro fator que explica o contraste não significativo entre as linhagens.

Para os dados de peso de 100 grãos observa-se que a linhagem L43 foi superior à linhagem L75. Este resultado é similar ao obtido por Abreu (2018). Em seu estudo, Abreu (2018) avaliou cinco linhagens quanto à resistência a seca e conclui que a linhagem 75 foi inferior às demais para o caráter peso de grãos.

O sucesso no processo seletivo depende da existência de variância genética dos caracteres. A variância genética significativa para peso de 100 grãos é um indicativo de que existe variabilidade entre as progênies para este caráter. A herdabilidade no sentido amplo foi de 68%, a acurácia do experimento também obteve altos valores (82%), o que indica boa precisão experimental. Altos valores de herdabilidade e acurácia indicam que o que se vê é aquilo que o genótipo de fato representa, isso é crucial para os programas de melhoramento, uma vez que permite a correta seleção dos melhores genótipos.

Na tabela 4 estão apresentadas as estimativas de média para as gerações e a variância destas. É possível observar que as gerações dos genitores L75, L43 e a F₁ apresentaram menores valores de

variância. Isso ocorre pois as variações entre as plantas destas gerações são exclusivamente devido a efeitos ambientais, visto que estas não possuem diferenças genótípicas. Em contrapartida, é observado que as variâncias para a população segregante é visivelmente superior, sendo que na variância estão embutidos tanto os fatores genéticos quanto os ambientais (RAMALHO et al., 2004; PÁDUA, 2012).

Como discutido por Marcondes (2012), apesar da variável peso de grãos ser amplamente utilizada, ela nem sempre pode estar associada à produtividade, em virtude de variações no número de grãos por espiga, número de espigas por planta, etc. Portanto, o maior peso de grãos nem sempre reflete as maiores produtividades,

O gráfico de PCA (Figura 6) indica que não existe uma correlação direta entre peso total e incidência, este fator é suportado também pelo resultado da correlação, indicando que a incidência da doença não está diretamente relacionada com a produção, o que é comentado por Guimarães et al. (2017).

Para as análise de produtividade não houve diferença significativa entre as progênies $F_{2:3}$. O plantio no período da safrinha teve grande influência sobre a produtividade da planta, de modo que a falta de chuva no período de enchimento de grãos comprometeu severamente a produção. Na safrinha, normalmente, as condições climáticas não são tão favoráveis como na safra. Além disso, a alta homozigose, presente nas progênies $F_{2:3}$ reduz a expressão de caracteres que contribuem para um melhor ajustamento às mudanças ambientais, resultando em plantas mais vulneráveis às variações ambientais do que os híbridos, que são altamente heterozigóticos. Portanto, espera-se que o híbrido apresente produtividade superior às progênies $F_{2:3}$. Em virtude das condições ambientais as médias de produção, para todas as progênies foram baixas, até mesmo para as testemunhas. Associado a isso e ao genótipo das progênies, que é altamente influenciado pelo ambiente obteve-se uma variância ambiental de grande magnitude, o que não é desejável. A significância para a interação Progênie x Testemunha mostra que os híbridos foram significativamente superiores quando comparados com as progênies.. Apesar disso o coeficiente de variação foi de moderada magnitude (36%), indicando precisão moderada.

A herdabilidade pode ser considerada de moderada magnitude, o que permite um bom progresso com a seleção. O ganho após um ciclo de seleção foi de 10,25%, em ciclos iniciais de seleção é esperado que os ganhos sejam maiores que em ciclos posteriores, portanto estes valores

são coerentes com a realidade (Ocampos, 2016). Concluímos que as progênies 69 e 61 e 110 tiveram os maiores desempenhos para resistência e no teste de produtividade, podendo ser bons candidatos para a continuação do programa de seleção para a resistência.

Como mencionado em muitos estudos (CEBALLOS et al., 1992; ZILA et al., 2013), o fator ambiental tem grande influência no estudo da resistência a *F. verticillioides* e a classificação dos genótipos quanto aos níveis de resistência requer uma avaliação em diferentes locais e épocas. O fato dos parentais utilizados não serem totalmente contrastantes impossibilitou as estimativas dos componentes genéticos de variância. Concluímos que a existência de variância genética dentro das gerações segregantes indica a presença de variabilidade genética para resistência a *F. verticillioides*, o que é crucial para a obtenção de ganhos. Além disso, a não existência de variância genética entre progênies para o caráter produtividade é um indicativo de que se deve aumentar o número progênies avaliadas para a análise de produtividade. A expressão do gene *LOX9* foi contrastante entre os tratamentos, mostrando sua importância para resistência e eficiência na validação dos genótipos. Em suma, as progênies 61, 69 e 110 tiveram os maiores desempenhos para resistência e no teste de produtividade e devem ser selecionadas para programas de melhoramento para resistência a *F. verticillioides*.

5 Referências Bibliográficas

ABREU, V. M. D. E. ANÁLISE dialélica e estratégias para a seleção de genótipos de milho submetidos ao estresse hídrico nas fases de germinação e emergência de plântulas.2013.96p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

AMORIM, E. P. Produtividade de híbridos de milho, derivados de populações S0, e associação com distância genética baseada em marcadores microssatélites.2005.108p.Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ALBERTS, J. F.; RHEEDER, J. P., GELDERBLUM, W.C.A. B15: Fumonisin and oesophageal cancer: A proteomic and transcriptomic analyses of molecular mechanisms associated with fumonisin

production by *Fusarium verticillioides* MRC 826 in maize. *Cancer research*, 2017. DOI: 10.1158/1538-7445.NEWFROnt17-B15.

BALCONI, C.; BERARDO, N., LOCATELLI, S. et al. Evaluation of ear rot (*Fusarium verticillioides*) resistance and fumonisin accumulation in Italian maize inbred lines. *Phytopathologia Mediterranea*, v.53, p.14–26.2014.

BLACUTT, A.A.; GOLD, S. E.; VOSS, K.A.; GAO, M.; GLENN, A. E. *Fusarium verticillioides* : Advancements in Understanding the Toxicity , Virulence , and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, v. 108, p. 312–326, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200p. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes> [Links]

CACAS, J. L., VAILLEAU, F., DEVOINE, C. et al. The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell Environ.* v..28, p.1367-1378.2005.

CEBALLOS, H.; J.A. DEUTSCH, J.A. Inheritance of resistance to tar spot complex in maize. *Phytopathology*, v. 82, p. 505–512, 1992.

CHARMLEY, L.L.; ROSENBERG, A.; TRENHOLM, H.L. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods, and feedstuff. In *Mycotoxins in Grain: Compounds Other Than Aflatoxin*; MILLER, J. D., TRENHOLM, H. L., Eds.; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 1994; pp 487-540.

CHEN, J. et al. Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to Fusarium ear rot in maize. *Molecular Breeding*, v. 30, n. 4, p. 1649–1656, 2012.

CHEN, J.; ZHANG, X.; HEARNE, S.; MAHUKU, G.; BODDUPALLI, P.; HUESTIS, G. Fine Mapping a Tarspot Complex Resistance QTL in Maize. p. 15, 2016. Acesso em: 15 de julho de 2019. Disponível em: <http://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/18237/58267.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

CHRISTENSEN, R. H. B. Ordinal - Regression Models for Ordinal Data. R package version 2015.6-28, 2015. <http://www.cran.r-project.org/package=ordinal/>.

CLEMENTS, M. J.; MARAGOS, C. M.; PATAKY, J. K.; WHITE, D. G. Sources of Resistance to Fumonisin Accumulation in Grain and Fusarium Ear and Kernel Rot of Corn. *Genetics and Resistance*, v. 94, n. 3, p. 251–260, 2004.

CRUZ, C. D., REGAZZI, A. J., CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 4 Edição. Editora UFV. v 1. p.513. 2012

DEEPAK, S. A.; KOTTAPALLI, K. R.; RAKWAL, R.; OROS, G.; RANGAPPA, K. S.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G. K. Real-Time PCR : Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, v. 8, p. 234–251, 2007.

EMBRAPA. Mercado de Sementes de Milho no Brasil Safra 2016/2017. Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG. p.1-33,2016

GALIC, V.; SMIC, D.; FRANIC, M.; BRKIC, A. Analysis of Fusarium ear rot and fumonisin contamination in testcrosses of a maize biparental population. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, p. 40–46, 2019.

GUIMARÃES, R. A. HOW biological and chemical fungicides impact the maize microbiome ,

fusarium verticillioides populations and fumonisins content. 2018. 100p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; FILHO, J. B. M. Quantitative genetics in maize breeding. 2010.

KUSHALAPPA, A.C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trend in Plant Science*, v. 18, n.9, p. 522-531, 2013.

LANZA, Fabrício Eustáquio et al., Aplicação foliar de fungicidas e incidência de grãos ardidos e fumonisinas totais em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 5, p. 638-646, 2016.

LI ZM, DING JQ, WANG RX, CHEN JF, SUN XD, CHEN W, SONG WB, DONG HF, DAI XD, XIA ZL, et al. A new QTL for resistance to Fusarium ear rot in maize. *J Appl Genetics*, v.524, p.403–406, 2011.

LANUBILE, A. MASCHIETTO, V., BORRELLI V.M. et al. Molecular Basis of Resistance to Fusarium Ear Rot in Maize. *Frontiers in Plant Science*, v.8, p.1-13, 2017.

LIMA, W.F.; PRETE, C.; RIBEIRO, A. et al. Metodologias para obtenção de resistência e/ou tolerância da soja à ferrugem-asiática. *Summa Phytopathologica*, v. 38, n. 1, p. 67-72, 2012.

MANOLI, A.; STURARO, A.; TREVISAN, S.; QUAGGIOTTI, S.; NONIS, A. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology*, v. 169, n. 8, p. 807–815, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.019>>.

MARCONDES, M. M. Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheita. 2012.

MINAMI, L. et al. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. *Ciências Agrárias*. v. 25, n. 3, p. 207-224, 2004.

OCAMPOS, O. Implicações da utilização de diferentes números de progênies e repetições em um programa de seleção recorrente recíproca em milho. 2017. 48p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PANIAGO, B. da C. Avaliação de parâmetros agrônômicos e da expressão de genes associados à resistência de grãos ardidos de híbridos de milho. 108p. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

PEREIRA, H. S. et al. Informações fenotípicas e marcadores microssatélites de QTL na escolha de populações segregantes de feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 5, p. 707–713, 2007.

PÉREZ-BRITO D. et al., Cartografía de qtl de la resistencia a la pudrición de la mazorca (*fusarium moniliforme*) en maíz de valles altos, México. *Agrociencia*, v. 35, p. 181-196, 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT– PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 45, 2001.

PINTO, N. F. J. de A. Grãos Ardidos em Milho: Circular Técnica. 2005.

PÁDUA, J. M. V. Controle genético da incidência de fumonisin em milho tropical. 2015. 76p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

RAMALHO M. A. P., ABREU A. F. B., SANTOS J. B., NUNES J. A. Aplicações da Genética quantitativa no melhoramento de plantas. Ed. UFLA, Lavras- MG. 2012.

REID, L. M., ZHU, X. Screening Corn for resistance to common diseases in Canada. *Agriculture and Agri-Food Canada*, Ontario Technical Bulletin. 2005.

ROBERTSON-HOYT, L.A.; JINES, M.P.; BALINT-KURTI, P.J. et al. QTL mapping for Fusarium ear rot and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Science*, v.46, p.1734–1743. 2006.

SCHNABLE, P.S. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, v. 326, n. 1112, 2009.

SEPTIANI, P.; LANUBILE, A.; STAGNATI, L.; BUSCONI, M.; NELISSEN, H.; PÈ, M. E.; ACQUA, M. D.; MAROCCO, A. Unravelling the genetic basis of Fusarium seedling rot resistance in the MAGIC maize population : novel targets for breeding. n. March 2018, p. 4–13, 2019.

SHIRIMA, C. P. et al. Dietary exposure to aflatoxin and fumonisin among Tanzanian children as determined using biomarkers of exposure. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 57, n. 10, p. 1874–1881, 2013.

SUBEDI, S. A review on important maize diseases and their management in Nepal. *Journal of Maize Research and Development*, v. 28, p. 28–52, 2015.

THOMPSON, M. E. H.; RAIZADA, M. N. Fungal Pathogens of Maize Gaining Free Passage Along the Silk Road. 2018.

USDA. World agricultural production. USDA ed. Estados Unidos: National Plants data team, 2019.

YANG, Q.; BALINT-KURTI, P.; XU, M. Quantitative Disease Resistance : Dissection and Adoption in Maize. *Molecular Plant*, v. 10, n. 3, p. 402–413, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2017.02.004>>.

ZHANG F, WAN XQ, PAN GT. QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in maize. 1. Map construction with microsatellite and AFLP markers. *Journal of Applied Genetics*, v. 47, p.9–15, 2006.

ZILA, C. T. et al. Genome-wide association study of *Fusarium* ear rot disease in the U . S . A . maize inbred line collection. *BMC plant biology*, v. 14, n. 372, p. 1–15, 2014.

ZILA, C. T., F. SAMAYOA, SANTIAGO R. et al. A Genome-Wide Association Study Reveals Genes Associated with *Fusarium* Ear Rot Resistance in a Maize Core Diversity Panel. *Genetics*, v. 3, p. 2095-2104, 2013.

WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.

**ARTIGO 2 - GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR RESISTANT ALLELES
INTROGRESSION TO THE TAR SPOT COMPLEX IN MAIZE**

ABSTRACT

Tar spot complex (TSC) is a highly destructive disease of maize, native from Latin America countries. This complex causes significant grain yield losses and threatens the global food security. The use of resistant cultivars is the most appropriate strategy to mitigate the negative effect caused by the disease. In order to obtain resistant cultivars, it is crucial to identify sources of resistance. The goal of this study was to identify potential new sources of TSC resistance present in accessions from germplasm bank. It was evaluated eight bi-parental populations, obtained from crosses between: two accessions (GUAT153 and OAXA280) and four CIMMYT Maize Lines (CMLs). The experiments were sown in two environments that show high incidence of TSC, in years 2014 and 2015. In the first generation it was evaluated 815 semi-inbred lines from eight families obtained through backcrosses. After a cycle of selection, 264 semi-inbred lines were evaluated in El Portillo. Plant phenotyping was performed 14, 21 and 28 days after flowering, using a diagrammatic scale. The BLUPs of each semi-inbred line were obtained. It was performed a genome wide association analysis (GWAS) using the DArT-Seq platform to generate genomic profiles from population. The product of amplifications was sequenced by Illumina HiSeq2500. A total of 8,401 SNPs was utilized. The population originated from the accession GUAT153 had the best performance to phenotypic analysis. The heritability and selection gain was 0.62 and -0.903. Eleven significant SNPs of small effect were identified. The families originate between the crosses with CMLs and accession GUAT153 show the major frequency of favorable alleles for resistance in the total population. The characterization of this accession is important to identify potential materials to be used for the introgression of resistance alleles. The introgression of small effect alleles plays a crucial role in the resistance background and contributes to the obtaining of genotypes with lasting resistance.

Key-words: Disease resistance. Germplasm bank. *Zea mays*.

RESUMO

O complexo tar spot (Tar Spot Complex - TSC) é uma doença altamente destrutiva para a cultura do milho, nativa dos países da América Latina. Esse complexo causa perdas significativas no rendimento de grãos e ameaça a segurança alimentar global. O uso de cultivares resistentes é a estratégia mais adequada para mitigar o efeito negativo causado pela doença. Para obter cultivares resistentes é crucial identificar fontes de resistência. O objetivo deste estudo foi identificar potenciais fontes de resistência ao TSC presentes em acessos do banco de germoplasma do CIMMYT. Foram avaliadas oito populações bi-parentais, obtidas de cruzamentos entre: dois acessos (GUAT153 e OAXA280) e quatro CIMMYT Maize Lines (CMLs). Os experimentos foram semeados em dois ambientes que apresentam alta incidência de TSC, nos anos de 2014 e 2015. Na primeira geração, foram avaliadas 815 linhagens semi-endogâmicas de oito famílias obtidas por meio de retrocruzamentos. Após um ciclo de seleção, 264 linhagens semi-endogâmicas foram avaliadas em El Portillo. A fenotipagem das plantas foi realizada 14, 21 e 28 dias após o florescimento, utilizando uma escala diagramática. Os BLUPs de cada linha semi-endogâmica foram obtidos. Foi realizada uma análise de associação genômica ampla (GWAS) utilizando a plataforma DArT-Seq para gerar perfis genômicos da população. O produto das amplificações foi sequenciado pela Illumina HiSeq2500. Um total de 8.401 SNPs foram utilizados. A população oriunda do acesso GUAT153 teve o melhor desempenho para análise fenotípica. A herdabilidade e ganho de seleção foi de 0,62 e -0,903 respectivamente. Onze SNPs significativos de pequeno efeito foram identificados. As famílias que se originaram do cruzamento das CMLs com o acesso GUAT153 mostraram maior frequência de alelos favoráveis para a resistência. A caracterização destes acessos é importante para identificar potenciais materiais a serem utilizados para a introgressão de alelos de resistência. A introgressão de alelos de pequeno efeito desempenha um papel crucial no contexto de resistência e contribui para a obtenção de genótipos com resistência duradoura.

Palavras-chave: Resistência a doenças; Banco de germoplasma. *Zea mays*.

1 Introduction

Tar Spot complex (TSC) is one of the most important foliar diseases in maize (CAO et al., 2017). This disease was first reported in México at the beginning of last century and has spread to the tropical and subtropical regions of the south and central America. Currently, TSC was reported in the United States of America (RUHL et al., 2015; McCOY et al., 2018; MOTTALEB et al., 2019).

The complex is formed from the interaction of at least three fungal species: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* and *Coniothyrium phyllachorae* (HOCK et al. 1992). *Phyllachora maydis* always is the first to appear, it causes black spots of circular format of approximately 1-2 mm of diameter (HOCK et al., 1995). Subsequently appears *Monographella maydis*, this is a common benign saprophyte, but, in the presence of *P. maydes*, *M. maydes* become highly virulent and pathogenic, causing a brown elliptic necrotic halo (MAHUKU et al., 2016). *Coniothyrium phyllachorae* function in this complex is not completely known, however is found with high frequency in the injuries. The combination of the symptoms of the main pathogens gives rise to the known “fish-eye”, originating from the elliptical form containing a black spot in the center. (HOCK et al. 1995).

In susceptible genotypes under favorable environmental conditions, the complex can destroy 80% or more of the leaf area in a period of 08-14 days (BAJET et al., 1994; CEBALLOS; DEUTSCH, 1992), and can cause a reduction in ears weight and loose kernels. There are reports of yield losses of up to 70% in the mexican state of Oaxaca, besides other states with histories of devastation superior to 40% such as Jalisco, Michoacan, Hidalgo, Veracruz, Chiapas, and Guerreiro (HOCK et al., 1989). In Guatemala, the losses were of 75% in the crop year 2008/2009. In 2015, injuries occasioned by *P. maydis* was detected in Illinois and Indiana, and in 2016 in Florida, USA (RUHL et al., 2016). In 2017, fields in Michigan had up to 90% infected plants with up to 80% disease damage on individual leaves (McCOY et al., 2018).

The best way to control this disease is developing resistant maize varieties and hybrids, this is the most cost-effective and environmentally friendly way to ensure the productivity and grain quality, and can easily be adopted by smallholder farmers (CEBALLOS; DEUTSCH, 1992; MAHUKU et al., 2016).

However, there is no currently improved genotype resistant to TSC, therefore it is necessary to resort to germplasm banks. The use of genotypes from germplasm banks is not a very popular alternative among plant breeders. One of the inconvenience of this process is the difficulty in identifying genetic resources that contain the alleles for the genes of interest, which requires the evaluation of a big number of genotypes and molecular analysis. In addition, the genotype with the interesting allele is normally a landrace material which carries many wild genes, that were excluded in the long process of domestication, and the insertion of “crioulo” materials in a program may delay the progress to obtain genotypes with good agronomic traits such as high yield (PIXLEY et al., 2018).

The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) has worked in the maize germplasm improvement for approximately 30 years. CIMMYT has the largest maize germplasm bank in the world and is currently the only institution developing research for TSC resistance. Several maize populations with increased resistance to TSC have been selected in highlands and downlands areas where there is high disease pressure for TSC (CIMMYT, 2016).

The breeding strategy consisted of identifying resistant genotypes to TSC in the CIMMYT germplasm bank collection. The accessions selected were crossed with elite CIMMYT Maize Lines (CMLs). The breeding strategy is either to develop inbred lines from the F₁s or from backcross populations using the elite lines as the recurrent parent. Then proceeded with selection for the primary trait and for general agronomic performance which included the selection for combining abilities by evaluating testcross hybrids of the experimental lines crossed to the elite testers. The goal is to facilitate the effective use of genetic resources to accelerate the development of improved varieties resistant to TSC (PIXLEY et al., 2018).

Knowing the genetic basis of TSC resistance is very important for the conduction of breeding programs. Two important studies of genetic control were carried out to elucidate the genetic mechanism behind the resistance. Ceballos and Deustsch (1992), affirm that the trait have a dominant effect, controlled by a dominant gene. However, studies carried out by Hernández-Ramos (2015) showed that both GCA (general combining ability) and SCA (specific combining ability) were significant, indicating the presence of additive and dominant effects determining the resistance to TSC.

The efficacy of selection and introgression of TSC resistant genes into elite germplasm can be enhanced with the use of molecular approaches. The genome-wide association study (GWAS) is a promisor method to detect associations between allele or genotype frequency with high resolution (TAM et al., 2019). This approach explores the variations in the collections of study aiming to identify genetic loci responsible for the trait of interest, therefore GWAS permits an analysis of genetic architecture of complex traits (YAN et al., 2011) such as disease resistance, maturity and flowering.

In light of the above, this study aimed: identify between two accessions which has the greatest potential for introgression of resistance alleles in CIMMYT elite materials; identify resistance-associated candidate genes different from those present in the CLNW247 elite line, in order to complement the resistance to TSC; and understand the role of the candidate genes in the resistance, in order to elucidate the resistance architecture.

2 Material and Methods

2.1 Population development

The accessions OAXA280 and GUAT153 and the CIMMYT Maize lines: CML9, CML264, CML503, CLWN247, all deposited in the germplasm bank from CIMMYT, was crossed to develop eight families (“CML9 x OAXA280”, “CML9 x GUAT153”, “CML264 x OAXA280”, “CML264 x GUAT153”, “CML503 x OAXA280”, “CML503 x GUAT153”, “CLWN247 x OAXA280” and “CLWN247 x GUAT153”). In a previously study performed at CIMMYT several accessions from CIMMYT Germoplasm Bank were evaluated to TSC resistance. The accessions OAXA280 and GUAT153 was selected as resistant to the disease and considered potential new sources of resistance to be used in breeding programs (CIMMYT internal information). The parent CLWN247 is a known TSC tolerance source (CIMMYT, 2016). The F₁ plants obtained from these crosses were backcrossed with the recurrent parents (CML's), giving rise to the BC₁, and later auto pollinated. Considering all the families, 815 BC₁S₁ semi-inbred lines were obtained. The next generation

(BC₁S₂) was formed with 264 semi-inbred lines, selected from BC₁S₁. The lines CML494, CML550 and CML576 were used as checks in the second generation.

2.2 Tar spot evaluation and experimental field design

Experiments were conducted in two sites: El Portillo, in Chiapas state, México, and Petén, Guatemala at 16.59° N, 93.44° W, and 16.9° N, 90.90° W, respectively. These regions are known to have high and natural TSC disease incidence. Disease severity was evaluated three times, the first evaluation was conducted approximately two weeks after flowering, then second and third evaluations were conducted at an approximately 7 day intervals. The reaction score and severity was evaluated using a scale ranging between 0 and 5, where: 0= highly resistant (HR) - no visible disease symptoms identifiable 1 = Very resistant (Some lesions on the leaves below the cob; 2 to 10% of the affected leaf area); 2 = resistant (R) - moderate lesions, disease symptoms covering approximately 30 % of the leaf area; 3 = moderately susceptible (MS) - 50 % of the leaf surface have disease symptoms; 4 = susceptible (S) - many or severe lesions, leaves which may have a few lesions, this coalesced and blighted or 70 % of leaf surface has disease symptoms; 5 = highly susceptible (HS) - all leaves are dead or disease symptoms on >80 % of the leaf surface (CEBALLOS; DEUTSCH et al., 1992).

The generations BC₁S₁ was evaluated in the 2015 crop season in El Portillo and Petén, and in 2016 the generation BC₁S₂ was evaluated only in El Portillo. This experiment was design to be evaluated using a spatial analysis method. This is a posteriori analytical method that improves the performance of a field experiment (BURGUENO et al., 2010). The number of plots in the row and column to each environment was 15 x 60, this enables a good estimation of the autocorrelation parameters. The raw data for TSC incidence were corrected for plot-to-plot variability using an autoregressive model fitted using the direction of the rows and the columns of the spatial coordinates (GILMOUR et al., 2009). The R statistical software was used to all statistical analysis (R CORE TEAM, 2015). The incidence was calculated based on the number of individuals who scored above

0 on the total of individual. The severity was calculated based on the number of individuals presenting grades 1 to 5. The higher the score, greater the severity.

2.3 Phenotypic data analysis

The incidence of TSC on the plants were measured based on ordinal scales, therefore this variable follows a multinomial distribution. The ordinal data were analyzed using a generalized linear model with log link function. The models were fitted using the R library MCMCglmm (HADFIELD et al., 2011), which uses a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) technique. The model was run for 1.6 million iterations with a burn-in of 150.000, a thinning interval of 100 and priors. The traits male flowering days (MFD) and female flowering days (FFD) were considered in the model. These traits are closely related to the infection incidence. In the model, the factor score was fitted as fixed effects and the genotypes, range and row as random effects. Heritability on an entry-mean was estimated from the variance components as the ratio of post mean from entry and units, row and column. The best linear unbiased prediction (BLUP) of each entry was calculated per and across environments and for the generations BC₁S₁ and BC₁S₂. Analyses were performed using the package MCMCglmm in the R software (R CORE TEAM, 2015).

2.4 Genotyping and Quality control

The DArT-Seq (SANSALONI et al., 2011) platform, developed by Diversity Arrays Technology (DArT P/L), was used to generate genomic profiles of the parents (CMLs) and the semi-inbred lines from BC₁S₁ and BC₁S₂. It was carried out in the Genetic Analysis Service for Agriculture (SAGA) facility at CIMMYT, Mexico. DNA samples were extracted from a bulk of 30 plants for each individual semi-inbred lines from BC₁S₁ and BC₁S₂. The samples were submitted to restriction enzymes to obtain the DArT-Seq markers. The enzymes utilized were the *Pst*I (CTGCAG) and *Nsp*I (CATG). Barcode adaptors to *Pst*I and *Nsp*I, which allows multiplexing 96 samples, were linked to the restriction fragments. The resulting products amplified with high quality were

sequenced using the sequencer Illumina HiSeq2500 (www.illumina.com) (Illumina Inc., San Diego, CA).

It was utilized a DArT P/L analytical pipeline to generate allele calls for SNP (<http://www.diversityarrays.com/software.html#dartsoft>). A set of filters was applied to the SNPs results to ensure a high-quality selection. To identify the markers position on the chromosomes, the sequences of the DNA fragments were BLASTed against the *Zea mays* L. reference genome (B73 RefGen_v4). The genotypic analysis performed for the two populations generated 23,153 DArT markers distributed across ten chromosomes. A new step of quality control was performed, the markers with minor allele frequency (MAF) < 5% were excluded and a call rate of 95% used. The imputation of missing data was performed by the Wright method carried out using the R package *snpReady* (GRANATO; FRITSCHÉ-NETO, 2018) by the function *raw data*, and it resulted in a profile of 8,401 SNPs.

2.5 Genome-Wide Association analysis

For BC1S1 generation the GWAS analyses were run for each individual environment (El Portillo and Petén) and a joint analysis. For the BC1S2 generation the GWAS was run only for El Portillo environment. BLUPs calculated across populations and environments were used. After the whole filtering process a total of 8,401 SNPs were used for GWAS. The GWAS was performed using the Fixed and Random Model Circulating Probability Unification (FarmCPU) (LIU, 2013) method in R v.3.5.1 (R CORE TEAM, 2015). The mixed linear model (MLM) fitted was: $y = X\beta + Zu + e$, where y is the vector of adjusted observation (BLUPs); β is the vector of the fixed effects of intercept, single markers, and the first principal components used for population structure control; u is the vector of random additive effects; e is the vector of residuals; the X is the incidence matrix of fixed effects; Z is the genotype incidence matrix constructed by VanRaden's genomic relationship matrix.

Traditional genetic evaluations based on the pedigree do not identify individual alleles. Based on this, VanRaden et. al, (2008) suggested that using a large number of tags covering the wide genome could calculate genetic similarity more accurately than a pedigree-based relationship matrix,

this is because genetic covariance would be calculated based on the actual proportion of alleles of the genome that are identical by descent. The estimation of genomic relationship matrix was created using the function of the `snpReady` package, with the VanRaden method. Principal component analysis (PCA) was executed using `snpReady` function and, the first three PCs were used to correct the population structure. A bi-dimensional plot of the first two principal components was drawn to visualize the population stratification among semi-inbred lines and the parents. The genome-wide significance thresholds ($0.05/N$) were corrected using the Bonferroni algorithm. The P -value of each marker was calculated, and a Manhattan and quantile-quantile plots were created using the GWAS results from `FarmCPU` package.

2.6 Candidate genes associated with TSC

The significant SNPs were obtained by GWAS. It was performed an analysis for each environment and generation separately. The reference genome B73 RefGen_v3 was used for the identification of candidate genes associated with TSC via Maize GDB genome browser (<https://www.maizegdb.org/>).

3 Results

Phenotyping

The 815 semi-inbred lines from BC₁S₁ and the 264 semi-inbred lines from BC₁S₂ were evaluated for resistance to TSC in the years 2015 and 2016. Estimates of genetic and residual variance as well as heritability in the broad sense across generations and environments were obtained. On the generation BC₁S₁, high value for heritability (62%) was found on the joint analysis showing the predominance of the genetic effect over the trait. The heritability on the individual analysis for El Portillo and Petén was reasonable high with respective values of 31% and 42% (Table

1). For the BC₁S₂ generation it was found a heritability of 42% showing that the genetic effect is being kept through generation due the fact that the BC₁S₂ is a selection of the resistant genotypes from BC₁S₁. According to the 79% accuracy there is an acceptable variance in TSC observed in the experiments for all environments.

Table 1 - Estimation of additive genetic variance (σ_g^2), residual variance (σ_e^2) and broad sense heritability (h^2) for the joint and individual analysis for BC₁S₁ and BC₁S₂, in the different environments.

Generation		σ_g^2	σ_e^2	h^2	Accuracy
BC ₁ S ₁	Joint	33.43	14.920	0.6262	0.7913
	Petén	10.36	0.935	0.4194	0.6476
	El Portillo	2.60	1.297	0.3078	0.5477
BC ₁ S ₂	El Portillo	33.18	4.72	0.4184	0.6468

In figure 1 it is possible to visualize the number of genotypes in relation to the scores attributed to the severity of the disease. Three weeks after flowering, the BC₁S₁ generation sown in El Portillo had 82.31% of the plants with disease incidence where 27.96% of the families were susceptible and highly susceptible, and 17.40% highly resistant. In Petén, 79.58% of plants had disease incidence, with 37.85% presenting susceptibility and high susceptibility, and 27.42% of genotypes were high resistant (percentages calculated based on the histograms - Figure 1). On the BC₁S₂ generation a high percentage (93.56%) of resistant genotypes was found which shows consistence from the BC₁S₁ selection. The BC₁S₂ sown in El Portillo showed 100% incidence.

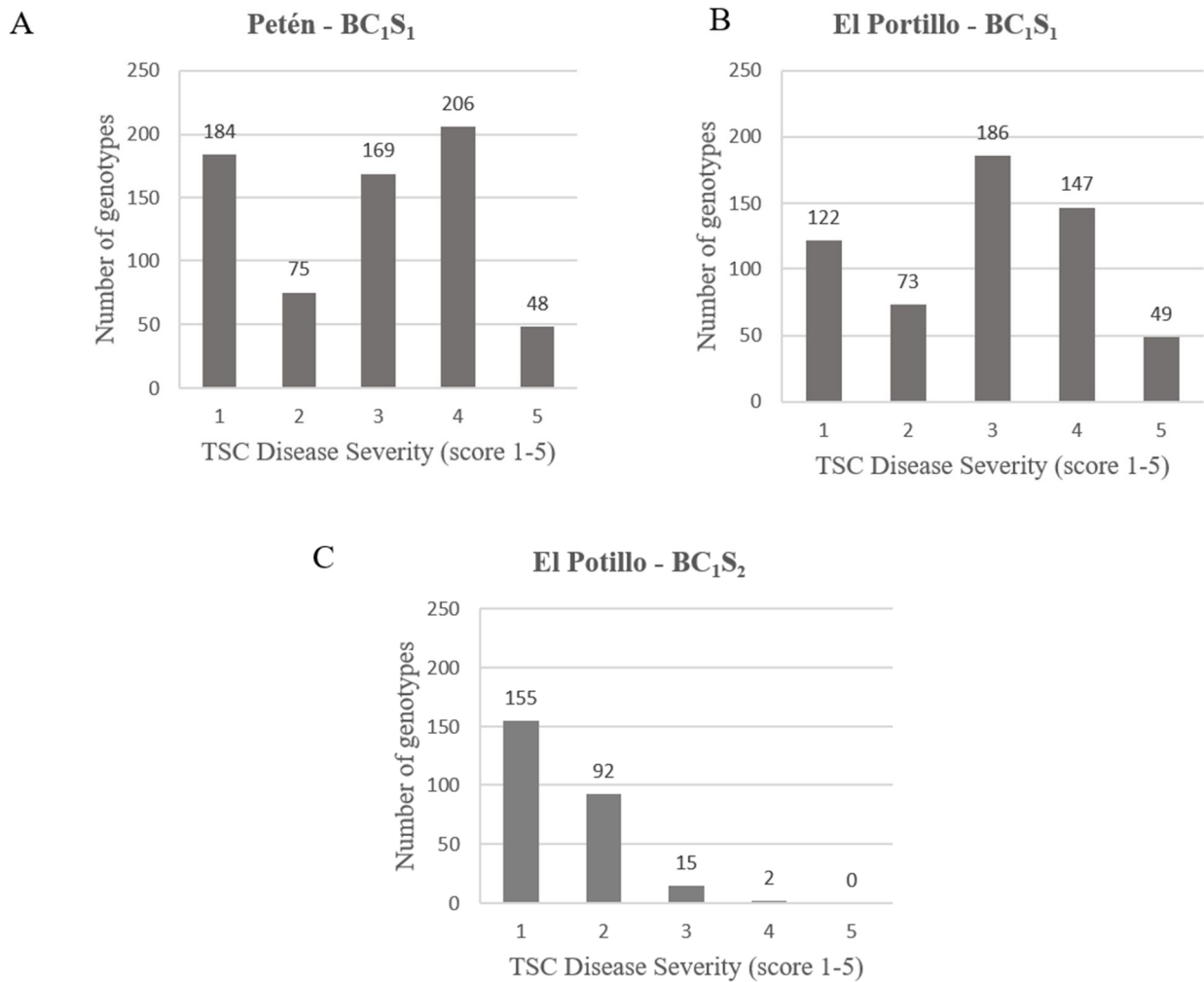


Figure 1 – Histograms of the number of semi-inbred lines showing the different levels of disease severity for individual analysis in both locations El Portillo (A) and Petén (B) for the BC₁S₁ and for individual analyze for BC₁S₂ (C). “0” was considered a lack of incidence, so it was not included to measure severity.

Among 815 BC₁S₁ semi-inbred lines evaluated for TSC response, 106 were selected as best performing, and used to compose the next generation BC₁S₂. Of the 106 semi-inbred lines selected 47.2% had the best genetic value. Considering the generation BC₁S₁ regardless of the environment, the average for TSC severity rate was higher for the CML503, CML264 and CML9 when compared to CLWN274, regardless of the accession with each the lines were crossed (Figure 2). Among the 15% best BLUPs it was found that 96% were derived from CLWN247. Among the four CMLs used as parents for the BC₁S₁ populations, CML503 and CML264 had mean scores ranging between 4

and 5. In contrast, the CLWN247 was highly resistant in both areas, with average scores of 1-2 (Figure 2).

Based on the BLUPs, it is observed that 72% of the best semi-inbred lines presented GUAT153 as parental, showing its superiority to OAXA280. After a cycle of selection, the genetic gain was -0.903 using a selection intensity of 15%. In figure 1C (BC₁S₂) it is presented the progress achieved with a selection of the best 15% genotypes, the displacement of the curve in the sense of reducing the note shows the phenotypic gain after the selection, because the lower means indicates less disease incidence.

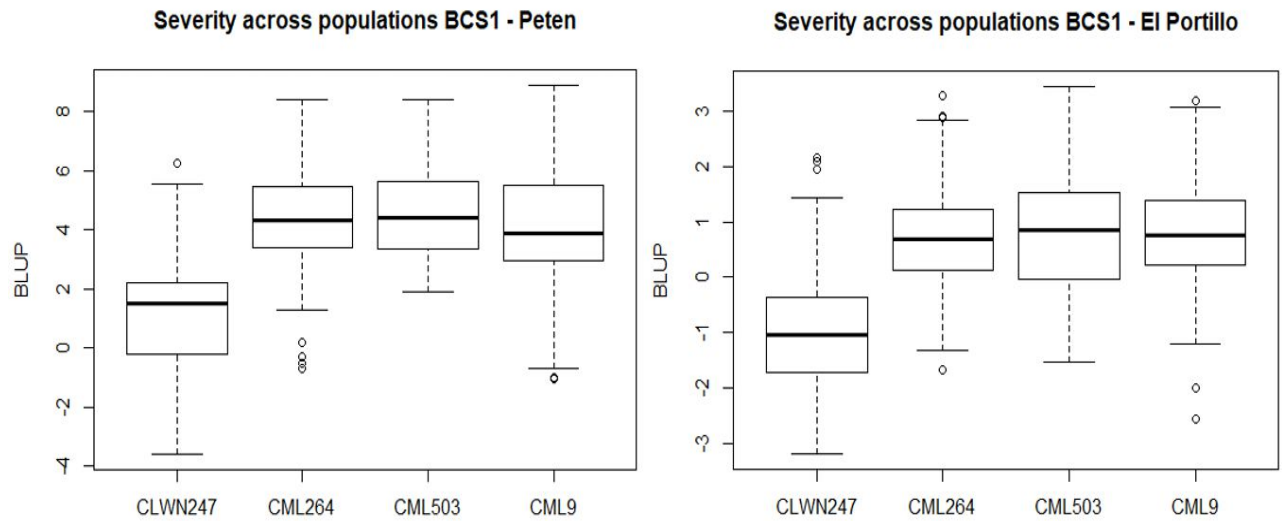


Figure 2 – BLUP values of CMLs performance to TSC infection in Petén and El Portillo environments on the BC₁S₁ generation.

3.2 Genome-Wide Association analysis

For the GWAS, it was obtained the BLUPs for both environments and generations, and for the joint analysis across environments. The principal component analysis revealed the presence of a clear distinction between population structure in BC₁S₁, using the first two PCs (Figure 3). For figure 3C and 3D it can see that the CLWN247 and CML9 form two different groups isolated, while

CML246 and CML503 are mixed together. The figure 3D shows that CLWN247 is the most divergent among the lines for this trait. The same is observed when we analyze all families together.

For each Manhattan plot carried it was obtained a different threshold. The quantile-quantile (QQ) plots were generated to detect inflation of statistics due to population stratification (Figure 4). Using the data from Petén, BC₁S₁, we found 4 significant SNPs distributed in the chromosomes 4 and 5 (Figure 4A). The environment El Portillo does not show significant SNPs (Figure 4B). In the joint analysis, BC₁S₁, were found 7 significant SNPs localized in the chromosomes 2, 4, 5, 7 and 8 (Figure 4C). The generation BC₁S₂ shows two significant SNPs, in the chromosome 8 and 10 (Figure 4D). The genes localizing at a 50 kb sliding window were considered as possible candidate genes. The B73 maize genome was used as the reference sequence to identify the candidate genes (Table 2).

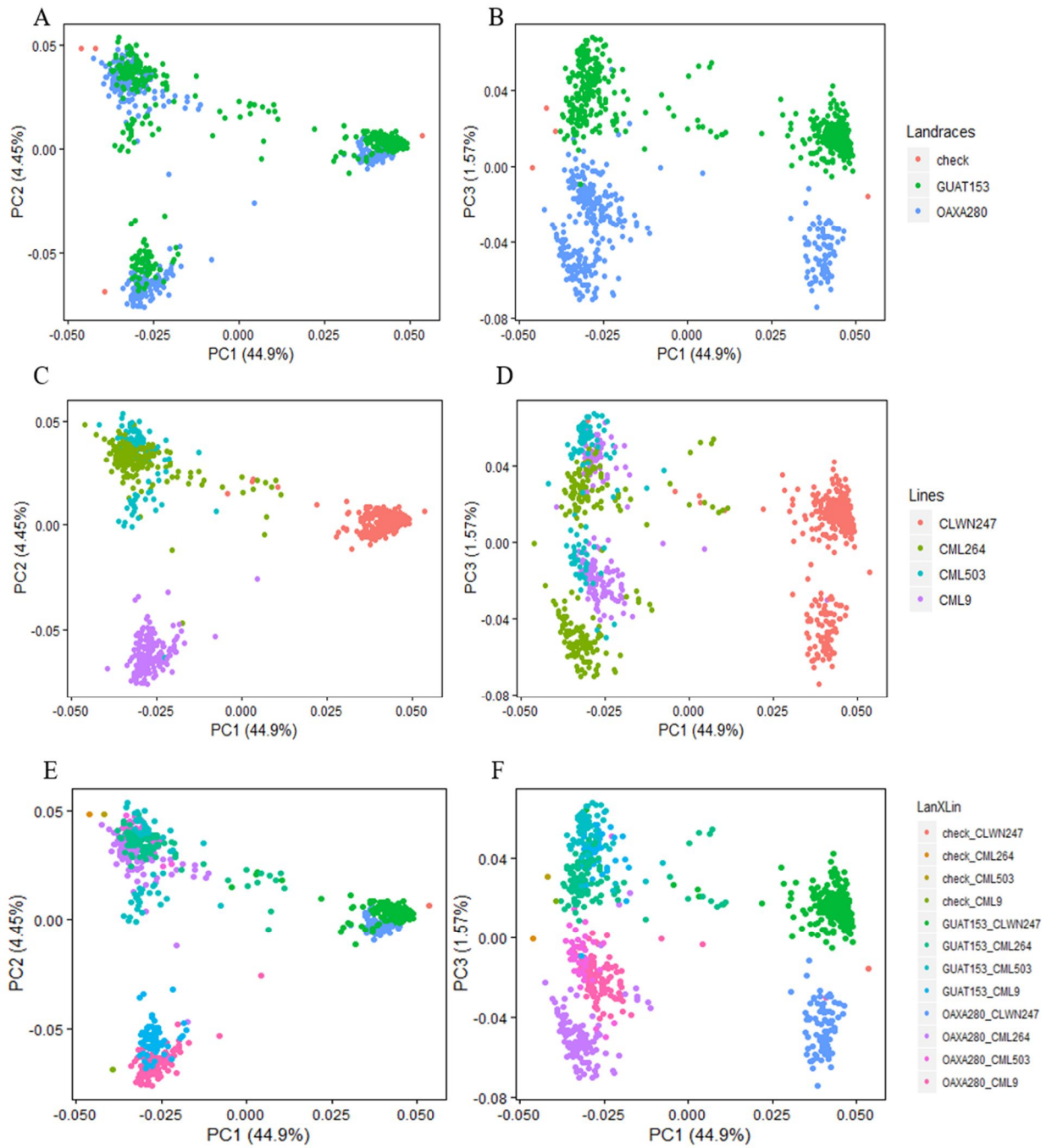


Figure 3 - Principal Component Analysis (PCAs) for group of parental and for complete population. Figures A e B: Grouping based in accessions GUAT153 and OAXA280 information; C e D: Grouping based on the CLMs information; E e F: Grouping based in the information from the eight different families considering BC₁S₁ generation

Three significant SNPs in the chromosomes 5 were detected by Petén individual analysis and by joint analysis, in the BC₁S₁. Of the three SNPs identified in this chromosome, the SNP M14218 was consistent in both analyzes, individual and joint analysis. The same occurs for SNP M12279, in chromosome 4, which was observed in the joint and individual analysis (Table 2).

In the chromosomes 7, 8 and 10 it was identified only one SNP for each chromosome. These significantly associated SNPs explained in total 4% of the total genotypic variance. The SNPs of major effect were: M25903 (BC₁S₂), M22917 (BC₁S₂) and M12874 (BC₁S₁). Individual analyses for Petén in the chromosomes 10, 8 and 4 respectively. The presence of these is directly associated with increased resistance, and consequently decreased scores. The Table 2 also shows the marker effect for the average of the populations. Significant SNPs were found in six out of ten different chromosomes of the maize genome. It was identified 11 candidate genes associated with resistance to TSC. The putative candidate genes were identified and their functions and classes are described in table 2.

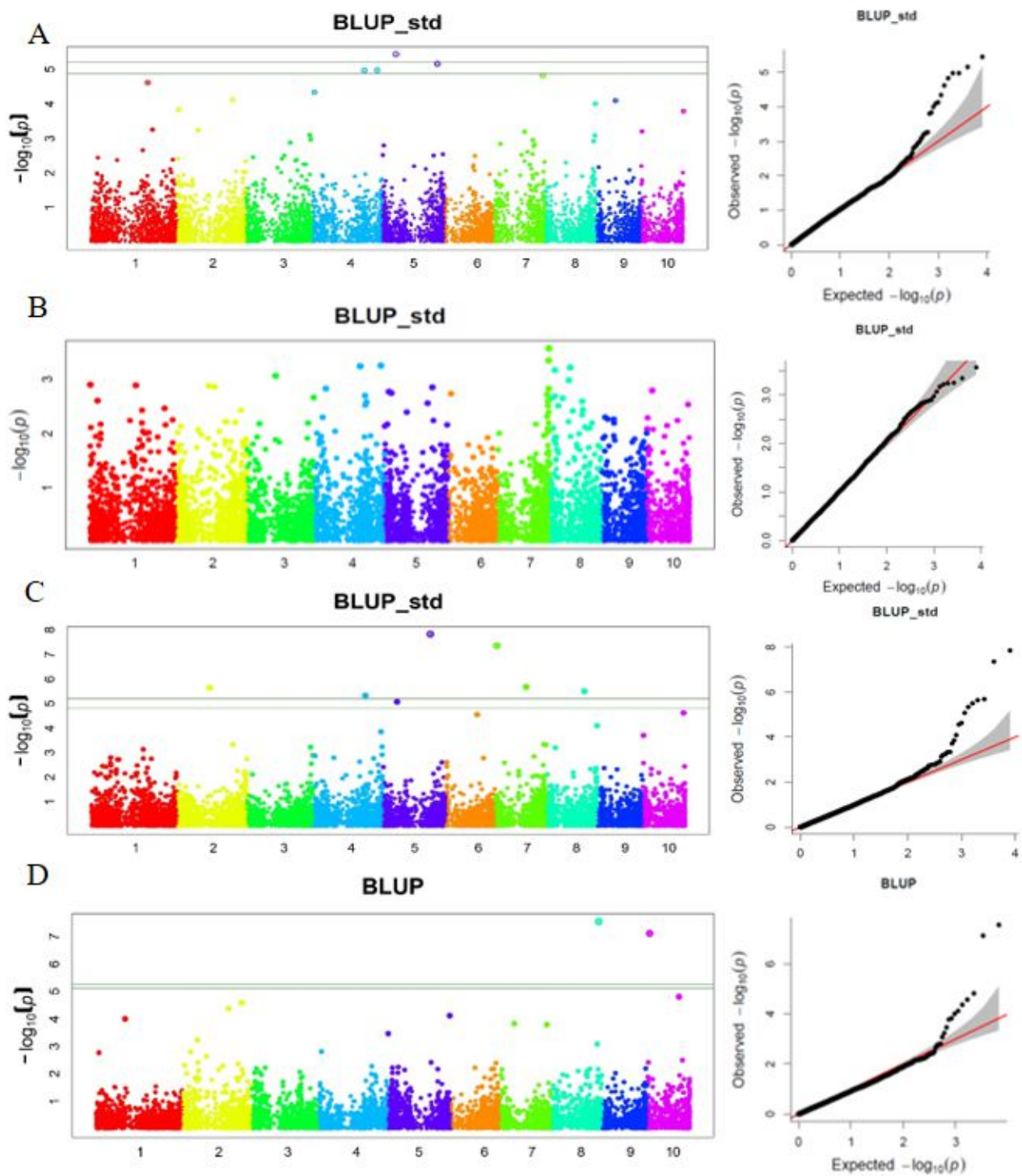
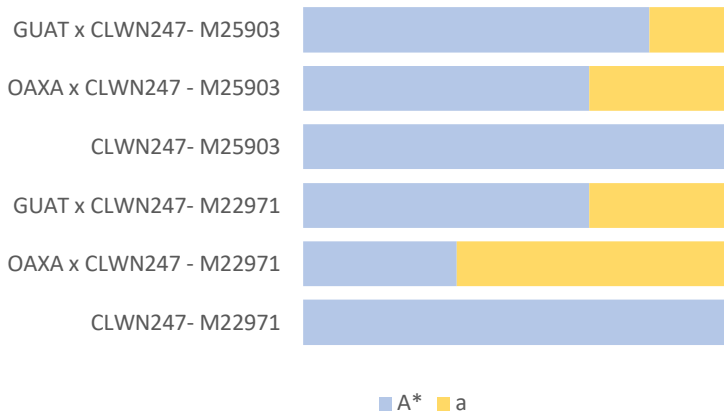
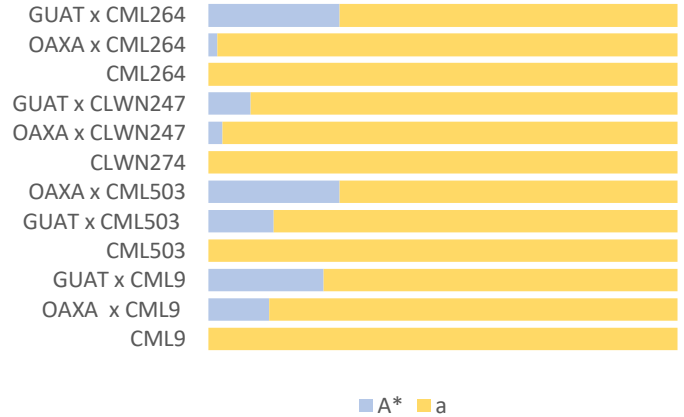
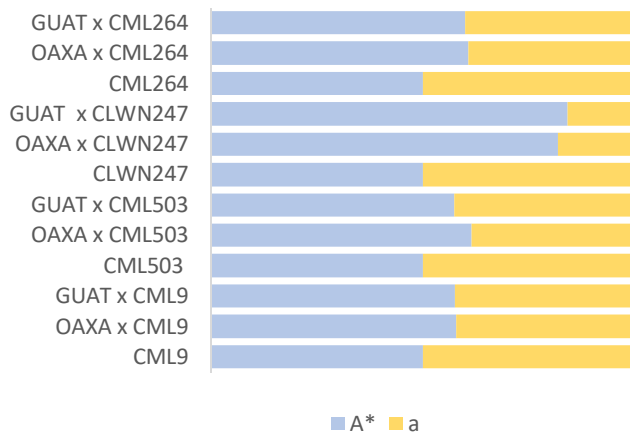
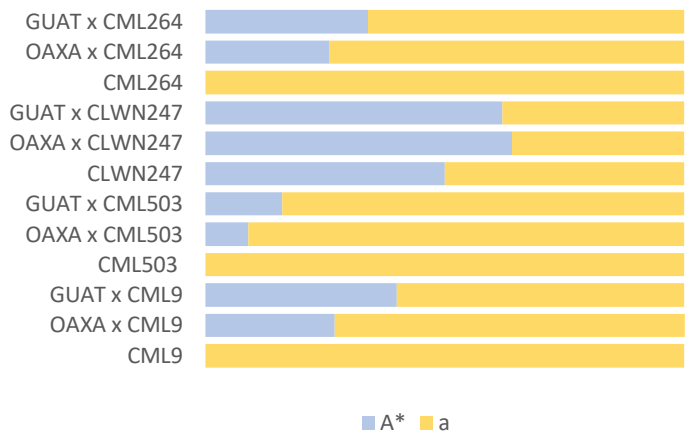
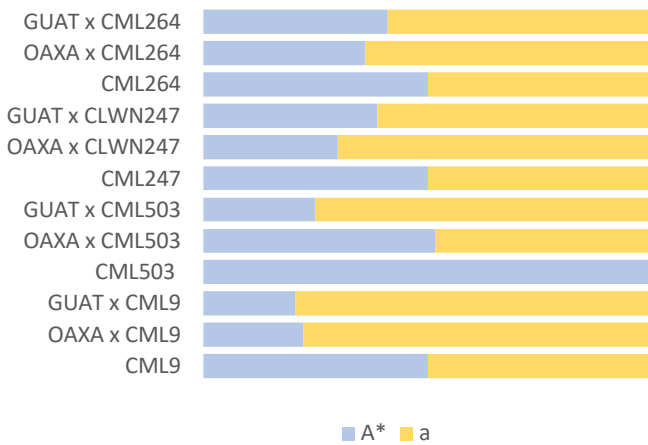
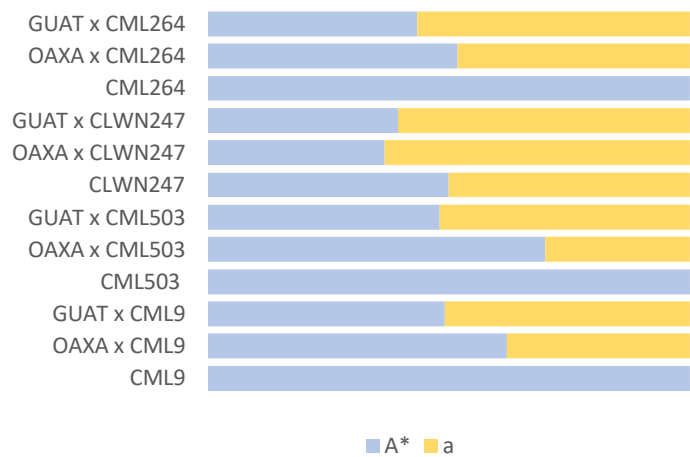


Figure 4 –Manhattan plot and QQ-plot for TSC resistance from A: Petén (BC₁S₁); B: El Portillo (BC₁S₁); C: Joint analysis (BC₁S₁); D: El Portillo (BC₁S₂).

Table 2 – Significant SNPs from the Genome-wide association study (GWAS) for TSC resistance in the semi-inbred lines for both environments (Petén and El Portillo) and generations and their candidate genes.

Origin	SNP	Chr	Position	MAF	P-value	Effect	Candidate Gene	Annotation
BCS2	M25903	10	8210206	0.38492063	7.67E-08	-0.6148515	Pentatricopeptide repeat	GRMZM2G163550
BCS2	M22971	8	167679415	0.30753968	2.30E-08	-0.3441116	Trichome birefringence-like	GRMZM2G096169
PE	M12874	4	228565433	0.06291391	1.03E-05	-0.29466284	Extra-large G protein-related	GRMZM2G016923
PE	M15506	5	195874900	0.15496689	6.81E-06	-0.20696661	Heat shock protein DnaJ	Zm00001d017435
JA	M5529	2	112222523	0.45380774	2.30E-06	-0.16059917	ABC transporter	GRMZM2G167658
JA	M22234	8	133.860.810	0.18476904	3.14E-06	0.14601839	DNA methyl transferase 6	GRMZMG069599
JA	M19411	7	109391319	0.48626717	2.06E-06	0.17252626	HAUS augmin-like complex subunit5	GRMZM2G055917
PE -JA	M12279	4	183563582	0.47284768	1.07E-05	0.2071679	DIS3-like exonuclease 2	GRMZM2G405815
JA	M15091	5	167738986	0.23970037	1.47E-08	0.21228654	Dirigent protein	GRMZM2G015333
JA	M18617	7	5662218	0.08114856	4.39E-08	0.31415311	Aluminum-induced protein Homolog1	GRMZM2G003762
PE-JA	M14218	5	50005465	0.26754967	3.59E-06	0.32977185	EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CD ₁	GRMZM2G340807

BCS2: Back cross S2. PE: Petén; PO: El Portillo; JA: Joint Analysis. MAF: Minor allele frequency.

A**M25903 e M22971 - BC1S2****B****M12874 - BC1S1****C****M15506****D****M5529****E****M22234****F****M19411**

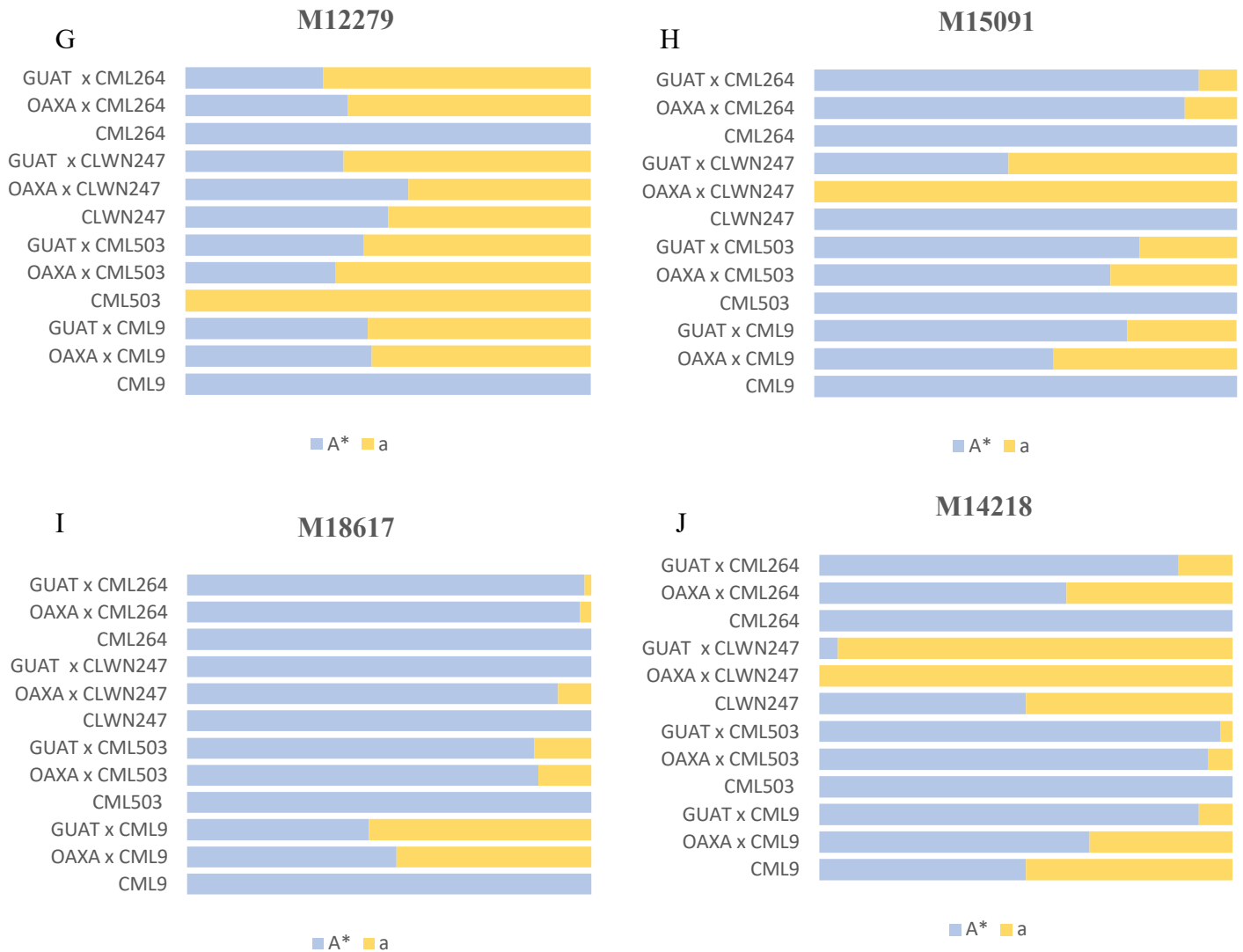


Figure 5 – Frequency of alleles corresponding to significant SNPs in each of the eight families. Code “A*” represents the resistance favorable allele, and "a" represents the non-resistance allele. The use of this code is illustrative only, and does not indicate dominance or recessively effect. “A” represents the favorable allele, and “a” the unfavorable allele.

Figure 5 shows the allele frequency for each significant SNP in the eight families studied. Since the parent lines (CMLs) were genotyped, the origin of the resistance allele can be identified. Therefore, if the lines do not present the alleles, they must come from the accessions.

The SNPs M25903 and M22971 show a negative effect (Table 2), so its presence contributes to resistance decreasing the disease score in the populations. From figure 5A it is clear that CLNW247

presents the allele A*. Comparing the families obtained by crossing the CLNW247 with both accessions, it is observed that the GUAT153 x CLNW247 family presents higher frequency of favorable allele compared to the OAXA280 x CLNW247 family, indicating that the GUAT153 access is a potential donor of this allele.

The SNP M12874 is not observed in any of the CMLs (Figure 5B). However, both accesses carry this allele. The allele frequencies in the families generate by GUAT153 is higher than those generated by the OAXA280 parental, showing that this access is best indicated as a donor. The SNP M15506-associated allele is present in all CMLs (Figure 5C). It is not possible to measure which accession contributes most to this allele, since the frequencies between families formed by the different accessions are very close.

Among the CMLs the SNP M5529 allele is observed only for the CLNW247 line (Figure 5D). Evaluating the families originated by CMLs that do not have this allele, we can infer about the origin of the allele and which accession shows a higher frequency of this in the population. It should be noted that both accesses are allele donors, and the GUAT153 has a higher frequency than OAXA280.

SNP M22234, M19411, M12279 and M1509 show a positive effect (Table 2), therefore the presence of this allele contribute to increase the population average and decrease the resistance. It is observed that the lines present favorable and unfavorable alleles. For all families it is observed a tendency to have a higher frequency of unfavorable allele than the lines (Figure 5 E, F, G, and H). This indicates that both accessions contribute in greater proportion with non-resistance alleles to the population. For the M15091 SNPs, we observed that the families formed by the GUAT153 access have a higher frequency of favorable alleles. For M19144 families derived from OAXA280 access have higher frequency of favorable allele.

The unfavorable resistance allele for SNP M18617 is not presented in any of the CMLs (Figure 5I). The accessions are the donors of this allele. The difference between the frequencies of this allele between the populations of GUAT153 and OAXA280 is very small, so we cannot infer the best access. Similar situation is observed for SNP M14218 (Figure 5J), however in this case, the CML9 and CLWN247 have both alleles. Moreover, we can infer about the superiority of GUAT153 access as a favorable allele donor.

4 Discussion

In Mexico and South America mostly of maize production is done by smallholder farmers. The Tar Spot Complex (TSC) has substantially prejudiced these farmers, and now, with the advance of the disease in northern America, it treats the most important maize producer in the world (DIÉGUEZ, 2014; MUNKVOLD, 2003). To control the negative effects of the TSC, breeding programs need to obtain effective resistance sources to the pathogen (MAHUKU et al., 2017). It is natural to find resistance sources of pathogens in areas where the disease pressure is high. The accessions OAXA280 and GUAT153 used in this study are originated respectively from Oaxaca State in Mexico and Guatemala, which are locations with high pathogen pressure with a historical record of TSC occurrence (PEREYDA-HERNÁNDEZ et al., 2009). The averages and the BLUPs show that among these accessions utilized, GUAT153 is the most promising landrace for TSC resistance. The best genotypic values were observed in the families derived from CLWN247, which confirms the superiority of this line as a resistant source as related by CIMMYT (2016).

A broad array of maize genotypes was used to cover all variability generated by the segregating populations and to obtain a reliable phenotypic data. Based in the percentage of pathogen incidence and experimental accuracy observed for both environments El Portillo and Petén, it can be inferred that the pathogen pressure was similar in both locations. This is important for the precise phenotypic characterization and the identification of the genotypes with the best performance, and is essential to evaluate the stable expressed genomic region (YANG et al., 2019).

The broad sense heritability in the joint analysis is considered of high magnitude (62%) providing a high accuracy which resulted in an efficient selection based in the scores. The successful selection effect can be observed in the second generation. After the selection, a high population progress was observed, with this the disease severity means decreased considerably, and occurred a substantial increase in the proportions of resistant genotypes. In this generation (BC_1S_2), only 6.43% of genotypes were considered susceptible and moderate susceptible while 58.71% of populations were considered highly resistant. The selection gains obtained after only one cycle of selection was very high (-0.903) indicating that in just a few cycles it is possible to obtain a resistant population without reducing its variability. This is an important point to encourage breeding programs. Based on the genotypic value

of the genotypes a set of maize inbred lines were identified as highly resistant to TSC across environments.

The relationships matrix, presented in figure 3 (A, B, C, D), shows the distribution of the families based on the genotypic information of the CMLs and the accessions. The PCA 1 (44%) and 2 (4,4%) show that the CML503 and CML264 are in the same group while the CLWN247 and CML9 are clustered in two different groups. It can be inferred that CML503 and CML264 have a common group of alleles that are probably not related to TSC resistance, whereas CLWN247 and CML9 have alleles for resistance divergent from each other. The figure 3C and 3D explained by PCAs 1 and 3 shows that CLWN247 is the most divergent genotype.

The PCA 1 and 3 of the figures 3 B show that genotypes coming from the accessions are divergent from each other. For the introgression of resistance genes, it is important that different sources of resistance are evaluated. The discovery of different genes for resistance and inclusion of these in a breeding population increases the genotypic value of the individuals and allows greater success with the selection. Besides knowing about the genetic variability of the resistance sources, it is important to infer about the frequency and the effect of genes involved in the resistance for each population (MAHUKU et al., 2016).

In this study, GWAS was performed to detect the genetic variation to TSC resistance between the accessions OAXA280 and GUAT153 as well as to identify the magnitude of the contribution of these accessions for the resistance. Identifying the genomic regions associate to TSC resistance is an important step on the process of finding resistance sources.

Hernández-Ramos (2015) reported that the additive and dominant genetic effect have an influence on the resistance with additive effects being the most important. Disagreeing with Ceballos (1992), who considered TSC resistance to be a trait that was dominated only by a few genes and having a QTL of great effect. Mahuko (2016) e Cao (2017) identified the possible QTL reported by Ceballos on chromosome 8, and called it *qRtsc8-1q8*. In this study, this QTL is presented in the CLWN247 (CIMMYT, 2016), conferring high superiority to the trait. SNP M22971, located on chromosome 8, is close to *qRtsc8-1q8*.

Despite it and assuming that the quantitative resistance involves a set of different genes, we consider that a large range of mechanisms and multiple pathways are required to the resistance, whether in innate or specific immunity (POLAND et al., 2009). Base on that, we can infer that even if a major

QTL, responding for a significant part of the resistance, it is expected that many regions in the genome are involved in this process. We also attribute to small effect QTLs, spread over many chromosomes, an important role in the resistance. In this study we identified the influence of regions on the chromosomes 2, 4, 5, 7, 8 e 10 in the resistance.

Eleven SNPs significantly associated with TSC resistance were localized in six out of ten different chromosomes. The total genotypic variance explained by all significant SNPs found in this study was <4 %, therefore the regions that contain these significant SNPs can be regarded as a relatively minor effect and can have a moderate role in the background of the resistance.

We were able to identify the origin of some alleles and infer about the frequency of these alleles in the population (Figure 5).

The M25903, M22971, M12874 and M5529 SNPs had a negative effect, thus their presence contributes to the resistance. For these SNPs, we observed that for most families evaluated, the GUAT153 accession is the one that contributes most as a donor of these alleles, increasing the frequency of them in the populations (Figure 5 A, B and D).

Both accession GUAT153 and OAXA280 and some CMLs are donors of SNP M22234, M19411, M12279 and M150911 SNPs alleles, which show a positive effect. Therefore, for these markers, these do not contribute positively to the resistance. In this case only alleles derived from CMLs are interesting (Figure 5E, F, G and H).

The frequencies of the M19144 and M1509 positive effect SNPs, which are unfavorable to resistance, are higher in most populations derived from OAXA280. Thus, it is inferred that the GUAT153 access contributes to increasing the frequency of favorable resistance alleles.

The comprehension of the role and functions of candidate genes is necessary to understand the mechanisms involved in the resistance to TSC in maize. Two putative candidate genes were identified in chromosome 4. The candidate gene extra-large G (XLGs) was identified on the chromosome 4. The protein codified by XLGs acts directly with a set of subunits ($G\beta$, and $G\gamma$) to mediate plant immunity. The Arabidopsis mutant deficient in XLGs, $G\beta$, and $G\gamma$ are similarly compromised in several pathogen defense responses, including disease development and production of reactive oxygen species (MARUTA et al., 2015). XLG2 physically interacts with all three possible $G\beta\gamma$ dimers at the plasma membrane and act in the signalization process. Studies utilizing double, triple, and quadruple mutants show that XLGs and $G\beta\gamma$ functionally interact in the same defense signaling pathways. In addition, the

mutation in XLG2 suppressed the seedling lethal and cell death programmed phenotypes, showing the importance of this gene in one of the most important mechanism of resistance (LIU et al., 2013).

In chromosome 5, three significant SNPs were observed and two of these had a negative effect against resistance (Table 2). The putative candidate genes that codify for calcium-binding proteins show a negative effect for resistance. The calcium has an important role in plant stress responses participating in many hormonal and environmental signals including biotic and abiotic stresses (DAY et al., 2002). Calcium-binding proteins belong to the EF-hand super-family and are involved in the regulation of all aspects of cell function. EF-hand motif is a helix-loop-helix structure that can bind a single Ca^{2+} ion. The sensor of calcium, that are the EF-hand proteins, can be induced by various environmental stresses, and generate a cascade of signals in response of it. We assume that stress conditions such as water or salt stress, conditions common to the time and the region where the experiment occurred, may have contributed to the expansion of the disease. Thus, the increase in the expression of genes involved in Ca signaling reflects the drop in plant resistance.

The candidate gene member of the heat shock proteins (HSPs), found in chromosome 5, present a positive effect for resistance. In the resistance response, the plant uses a set of proteins of immunity innate system as the recognition receptors (PRRs) or resistance (R) proteins. The HSPs play an indispensable role as molecular chaperones ensuring the quality control of plasma membrane-resident PRRs and intracellular R proteins against potential invaders (PARK et al., 2015). The presence of this protein can contribute to TSC resistance stabilizing important proteins directly associated with resistance.

Trichome birefringence-like (TBL), localized in chromosome 8 (SNPM22971), is a plant protein family proposed to encode wall polysaccharide specific O-acetyltransferases, which is involved in the secondary cell wall formation through the deposition of cellulose. The TBL family contain a TBL domain with a conserved glycine-aspartate-serine (GDS) signature, similar to the conserved motif (GDLS) found in some esterases/lipases. Members of the TBL protein family had been shown to impact pathogen resistance, freezing tolerance, and cellulose biosynthesis (GAI et al., 2017). The imposition of physical barriers, such as the cell wall, is one of the primary mechanisms of resistance. The deposition of cellulose hinders the penetration of the pathogen, contributing significantly for the resistance to many pathogens. In our case it is possible that this deposition occurs mainly in the leaves, making it difficult for the fungi of the complex to infect the plant.

In chromosome 2 the putative ABC transporter contributes positively to the resistance. ABC transporters constitute one of the largest protein families found in all living organisms. The ABC transporter gene is responsible for conferring the durable *Lr34* disease resistance. Observations, based on eight independent mutations within a single putative ABC transporter gene, suggest that this gene controls resistance to leaf tip necrosis (KANG et al., 2011).

The parent CLWN247 is characterized as being a source of resistance to TSC (CIMMYT, 2016). The genotyping of this and others lines from CIMMYT germplasm identified an important QTL in chromosome 8 known as *qRtsc8-1*. This large QTL is responsible for 14.6% of the phenotypic resistance and is observed in about 3.5% of the materials analyzed so far (MAHUKU et al., 2016). Despite the importance of this QTL for the resistance, it is of extreme importance to identify and introduce other QTLs and resistance alleles into the genotypes of interest aiming to integrate minor and major QTLs into the same background in order to prolong the usefulness of this and other QTLs of greater effect. In this study it was identified a set of markers in the accessions from CIMMYT germplasm bank that have not been reported in previously studies.

In addition, we identified resistant genotypes to the TSC originated from the crosses between CIMMYT lines and two landrace accessions. The accession GUAT153 and OAXA280 presented significant SNPs with resistance-related effects not observed in the CMLs used, being GUAT153 access the most promising donor of resistance genes/alleles. This confirms the potential of these accessions as new resistance sources to be used in breeding programs. The development of inbred lines using these new sources are being performed and it is a promising strategy to increase TSC resistance resulting in a background safety if the resistance from the major QTL is broken.

5 References

BAJET, N. B. et al. Control of tar spot of maize and its effect on yield. *International Journal of Pest Management*, v.40, p. 121-125, 1994.

BURGUEÑO, J. et al. Genomic prediction of breeding values when modeling genotype × environment interaction using pedigree and dense molecular markers. *Crop Science*, v. 52, n. 2, p.707-719, 2012.

CAO, S. et al. Genome-Wide Analysis of Tar Spot Complex Resistance in Maize Using Genotyping-by-Sequencing SNPs and Whole-Genome Prediction. *The Plant Genome*, v.10, p1-14, 2017.

CIMMYT. 16 new CIMMYT maize lines released. Acesso em 15 de julho, 2019. Disponível em :<https://www.cimmyt.org/news/16-new-cimmyt-maize-lines-released/>.

CEBALLOS, H.; J.A. DEUTSCH, J. A. Inheritance of resistance to tar spot complex in maize. *Phytopathology*, v.82, p.505–512, 1992.

DAY, I. S.; REDDY, V. S.; SHAD, G. et al. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, v.3, p.1-24, 2002.

DIÉGUEZ, D. O. G. Revisión: Identificación de QTL's asociados con la resistencia al complejo mancha de asfalto en accesiones de maíz. Universidad Autónoma Chapingo - Departamento de Fitotecnia - Instituto de Horticultura. México. p.1-18, 2014.

GAI, X., DONG, H., WANG, S., LIU, B. et al. Infection cycle of maize stalk rot and ear rot caused by *Fusarium verticillioides*. *PLoS ONE*, v.13, p.1-11, 2018: e0201588. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201588>.

GILMOUR, A. R.; GOGEL, B. J.; GULLIS, B. R.; THOMPSON, R. ASReml user guide release 3.0. VSN International. 2009. Disponível em: <http://www.vsnl.co.uk/resources/documentation/asreml-user-guide>.

GRANATO, I. S. C.; GALLI G., FRITSCHÉ-NETO R. snpReady: a tool to assist breeders in genomic analysis. *Mol Breeding*. v. 38, p.1-7, 2018.

HADFIELD, J. D. MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *Journal of Statistical Software*, v. 33, p.1-22, 2010.

URL <http://www.jstatsoft.org/v33/i02/>.

HERNÁNDEZ-RAMOS, L.; SANDOVAL-ISLAS, J. S.; MAHUKU, G.; BENÍTEZ-RIQUELME, I.; CRUZ-IZQUIERDO, S. Genetics of resistance to tar spot complex in 18 tropical maize genotypes. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, 2015.

HOCK, J.; KRANZ, J.; RENFRO, B. El complejo “mancha de asfalto” de maíz: Su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. v. 7, p. 129–135, 1989.

HOCK, J.; DITTRICH, U.; RENFRO, B. L.; KRANZ, J. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. *Mycopathologia*, v. 117, p. 157, 1992.

HOCK, J.; KRANZ, J.; RENFRO, B. Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology*, v. 44, p.490–502, 1995.

KANG J.; PARKA J.; CHOIA, H. et al. Plant ABC Transporters. *American Society of Plant Biologists*, 2011. DOI: e0153. doi: 10.1199/tab.0153.

LIU C.; WENG, J.; ZHANG D. et al., Genome-wide association study of resistance to rough dwarf disease in maize. *Eur J Plant Pathol*, v.139, p.205–216, 2013.

LIU, X., HUANG, M., FAN, B., BUCKLER, E.S., ZHANG, Z. Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome-Wide Association Studies. *PLOS Genet*, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005767>.

- MAHUKU, G.; CHEN J.; SHRESTHA, R. et al. Combined linkage and association mapping identifies a major QTL (*qRtsc8-1*) conferring tar spot complex resistance in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 129, p. 1217–1229, 2016.
- MOTTALEB, K. A. et al. Threats of Tar Spot Complex disease of maize in the United States of America and its global consequences. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v. 24, p. 281–300, 2019.
- MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, v. 109, p. 705–713, 2003.
- PARK, C.; SEO, Y. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol. J*, v.31, p.323-333, 2015.
- PEREYDA-HERNANDEZ, J. et al. Etiology and management of tar spot (*Phyllachora maydis* maubl.) of maize in Guerrero State, México. *Agrociencia*, v. 43, p.511-519, 2009.
- PIXLEY, K. V. et al. CIMMYT's Seeds of Discovery Initiative: Harnessing Biodiversity for Food Security and Sustainable Development. *Indian J. Plant Genet. Resour*, v. 31, p.1-10, 2018.
- POLAND, J. A.; BALINT-KURTI, P. J.; WISSER, R. J.; PRATT, R. C.; NELSON, R. J. Shades of gray : the world of quantitative disease resistance. n. December, p.21–29, 2008.
- SANSALONI, C.C. et al. A. Diversity Arrays Technology (DArT) and nextgeneration sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. *BMC Proceedings*, v. 5, p. 54, 2011. Suppl. 7. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S7-P54.
- RUHL, G. et al. First report of Goss's bacterial wilt and leaf blight on corn caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *nebraskensis* in Indiana. *Plant Disease*, v. 93, p.841, 2009.

TAM, V.; PATEL, N.; TURCOTTE, M.; et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, p.1-18, 2019.

VAN RADEN, P. M. Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci*, v.91, p.4414–4423, 2008. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>.