

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS AO
ACAMAMENTO EM MILHO**

**Aline Migueis
Engenheiro Agrônomo**

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS AO ACAMAMENTO
EM MILHO**

Discente: Aline Migueis

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes de Oliveira Miranda

Coorientador Prof Dr. Ivan Schuster

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Unep, campus Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Agronomia, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2022

M636m	<p>Migueis, Aline</p> <p>Mapeamento de QTLs associados ao acamamento em milho : mapeamento de QTLs associados ao acamamento em milho / Aline Migueis. -- Jaboticabal, 2023</p> <p>41 p. : il., tabs., fotos, mapas</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Vitor Fenarndes Oliveira de Miranda</p> <p>Coorientador: Ivan Schuster</p> <p>1. Desequilíbrio de Ligação. 2. Estudo de Associação Genômica Ampla. 3. Genes de plantas. 4. Melhoramento vegetal. 5. Zea mays. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS AO ACAMAMENTO EM MILHO

AUTORA: ALINE MIGUEIS

ORIENTADOR: VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA

COORIENTADOR: LEANDRO VAGNO DE SOUZA

COORIENTADOR: IVAN SCHUSTER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:



Pesquisador Dr. IVAN SCHUSTER (Participação Virtual)
Longping High-Tech, Pesquisa e Desenvolvimento / Cravinhos/SP

Leandro Vagno de Souza

Prof. Dr. LEANDRO VAGNO DE SOUZA (Participação Virtual)
KWS Group Seeding the future Agricultura / Uberlândia/MG

Luiz Ricardo Hanai

Pesquisador Dr. LUIZ RICARDO HANAI (Participação Virtual)
LongPing de alta tecnologia / Cravinhos/SP

Jaboticabal, 08 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE MIGUEIS – Nasceu em 24 de março de 1980, na cidade de Teresópolis, interior do estado do Rio de Janeiro. Em 2001, ingressou no curso de Engenharia Agrônoma (Bacharelado) na Universidade Federal de Viçosa, *Campus* de Viçosa, Minas Gerais. Desde o segundo semestre do curso, iniciou estágio junto ao departamento de fitotecnia, trabalhando no “Programa Feijão”, onde desenvolveu práticas no melhoramento genético de feijão. No ano de 2017, ingressou no curso de Ciências Biológicas (licenciatura) na Universidade de Franca, *campus* de Ribeirão Preto, São Paulo. Em 2020, ingressou no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), onde desenvolve estudo com genética e melhoramento de milho.

Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja vacas, todavia, eu me alegrarei no SENHOR, exultarei no Deus da minha salvação

Habacuque 3:17

DEDICATÓRIA

A Deus por todo amor e cuidado que Ele tem por mim

Aos meus pais, José Bento (in memoria) e Maria de Lourdes Migueis;

A meu esposo, Helder Médice Júnior;

Aos meus filhos Nicolas e Lydia que são minha força diária;

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados;

E a todos os amigos que, de alguma maneira, contribuíram para a minha formação.

Assim, dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que esteja com saúde e capaz de seguir meu caminho.

A minha mãe, pelo amor que tem por mim e por me ter dado o respaldo para seguir na vida acadêmica.

Ao meu pai, (*In Memoria*), por ter me ensinado a gostar das coisas simples da vida e todo amor dedicado a mim.

A meu esposo, Helder Médice Júnior pela paciência, força e encorajamento.

Aos meus filhos, Nicolas e Lydia, por serem a minha força diária.

A meus irmãos e sobrinhos pelo incentivo.

A Prof. Dra Sandra Helena Unêda Trevisoli onde tudo começou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda, primeiramente, pela compreensão e pelo apoio e suporte durante todo o tempo de mestrado.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ivan Schuster, por todo suporte, paciência e aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A *LongPing High Tec* pela oportunidade.

À Universidade Estadual Paulista (Unesp), *campus* de Jaboticabal, e ao Departamento de Produção Vegetal, em especial ao Setor de Melhoramento, pelas oportunidades e experiências proporcionadas.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa.

Aos colegas Jorge, Cibele, por muitas vezes me pegarem pela mão e me conduzirem.

A equipe da *LongPing High Tec*, de biotecnologia de Cravinhos/SP e de Primavera do Leste/MT, pelo suporte.

Ao Programa Feijão da UFV onde iniciei minha caminhada na área de melhoramento de plantas.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O milho	3
2.2 Melhoramento genético do milho	4
2.3 Estudos Associativo Genômica Ampla (GWAS)	5
2.3.1 Desequilíbrio de Ligação (DL)	6
2.4 Acamamento do milho	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Material genético e condução experimental	7
3.2 Avaliação do acamamento do milho.....	8
3.3 Extração do DNA e Genotipagem	8
3.4 Análise de dados	Erro! Indicador não definido.
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1 Resultados	10
4.2 Genes candidatos	14
4.3 Discussão.....	16
5 CONCLUSÃO	18
REFERÊNCIAS.....	19
APÊNDICE A – Cromossomo 1	26
APÊNDICE B – Cromossomo 9	28
APÊNDICE C – Cromossomo 10.....	29

MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS AO ACAMAMENTO EM MILHO

RESUMO – O acamamento do milho tornou-se um dos principais problemas da cultura. Devido às limitações de seleção fenotípica, a seleção genômica pode ser uma alternativa para a seleção de linhagens resistentes. No presente trabalho, o método GWAS foi usado para detectar marcadores associados a locos de características quantitativas (QTL) com base na análise de desequilíbrio de ligação (DL). Para a condução do experimento foram utilizadas 1.109 linhagens endogâmicas. A avaliação de acamamento foi realizada aos 200 dias após o plantio, quantificando-se as plantas com colmos danificados e acamadas. Foram identificadas quatro regiões genômicas que explicam 24,5% da variação observada no acamamento das plantas. Também foram identificados os genes presentes nessas regiões. No cromossomo 9, o gene LOC103637828 da família de genes da miosina (superfamília *ATPase*. Família da miosina) e o gene LOC100502428 do gene putativo da família de proteínas do domínio da ferroportina. No cromossomo 4, o gene LOC103654305, da família GDA1/CD39 *NTPase [putative apyrase local protein (provável apyrase 3)]* e o gene LOC100191644 da família de genes produtores de poliadenilatos (*polyadenilate-binding protein-interacting protein 9*). Os resultados obtidos neste trabalho permitem a criação de uma estratégia de seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, utilizando os QTLs identificados.

Palavras-chaves: Estudo de Associação Genômica Ampla. Desequilíbrio de Ligação. Resistencia de colmo. Melhoramento vegetal. *Zea mays*

MAPPING OF QTLs ASSOCIATED WITH LODGING IN CORN

ABSTRACT – Corn lodging has become one of the main problems of the crop. Due to limitations of phenotypic selection, genomic selection can be an alternative for selection of resistant inbred lines. In the present work, the GWAS method was used to detect markers associated with quantitative trait loci (QTL) based on linkage disequilibrium (DL) analysis. To conduct the experiment, 1,109 inbred lines were used. The lodging evaluation was carried out 200 days after planting, quantifying the plants with damaged and lodging stems. Four genomic regions were identified that explain 24.5% of the observed variation in plant lodging. The genes present in these regions were also identified. On chromosome 9, the LOC103637828 gene of the myosin gene family (*ATPase* superfamily. Myosin family) and the LOC100502428 gene of the putative gene of the ferroportin domain protein family. On chromosome 4, the LOC103654305 gene, from the GDA1/CD39 *NTPase* family [*putative apyrase locali protein* (probable *apyrase 3*)] and the LOC100191644 gene from the *polyadenylate-binding protein-interacting protein 9* family of genes. The results obtained in this work allow the creation of a selection strategy assisted by molecular markers in genetic improvement programs, using the identified QTLs.

Keywords: Linkage disequilibrium. Genome Wide Association Study. Stem resistance. Plant breeding. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1– Distribuição de frequência do acamamento do milho	11
Figura 2 – Manhattan Plot da análise de associação de marcadores SNP e a tolerância ao acamamento em milho	12
Figura 3 – Q-Q plot da análise de associação de marcadores SNP e a tolerância ao acamamento em milho	Erro! Indicador não definido.
Tabela 1 – Marcadores associados a resistência do milho ao acamamento, após análise sequencial de GWAS e regressão múltipla.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2 – Genes candidatos localizados nas regiões contendo os QTLs associados a tolerância ao acamamento do milho	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

O milho atualmente é uma das culturas mais importantes produzidas mundialmente, sendo a matéria prima de produtos como óleo, açúcar, etanol e também como alimentação humana e animal (Xue et al., 2013). Devido a composição proteica do milho houve um aumento no consumo devido ao aumento da população mundial.

Um dos maiores desafios que a cultura do milho vem enfrentando é o acamamento, que compromete a granação da espiga e acarreta a perda de estande e redução na produtividade. É um grande desafio aumentar a produtividade do milho no Brasil, uma vez que devido ao clima tropical, fatores bióticos e abióticos interferem na produtividade. Além disso, os caracteres de importância agrônômica e econômica do milho são de natureza quantitativa e sofrem influência ambiental.

No Brasil, o milho é plantado no sistema de plantio direto, o que favorece a sobrevivência e multiplicação do inóculo dos fungos necrotróficos. Além disso, a alta densidade populacional causa restrições à atividade fotossintética das folhas, induzindo o colmo à redirecionar fotoassimilados em maior quantidade para enchimento de grãos, enfraquecendo e predispondo a ocorrência de podridões e doenças (Costa *et al.* 2019a). Para se contornar esses fatores, é de grande importância que os programas de melhoramento genético no milho desenvolvam linhagens e híbridos tolerantes ao acamamento, seja qual for a causa do acamamento.

Tradicionalmente, os programas de melhoramento de plantas utilizam seleção fenotípica para as características de interesse. Mas como nem sempre ocorre o acamamento nas áreas de avaliação de linhagens e híbridos, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) pode ser uma alternativa mais eficaz. Para que a SAM possa ser aplicada, é necessário inicialmente identificar os marcadores associados aos genes ou QTLs (*Quantitative Trait Loci* ou Loci de Características Quantitativas) associados a variação fenotípica da característica.

Uma técnica robusta para a identificação de marcadores moleculares associados a características quantitativas é GWAS (*Genome Wide Association Study* ou Estudo da Associação Genômica Ampla).

Este trabalho teve como objetivo utilizar o método GWAS para identificar marcadores moleculares associados a QTLs de tolerância ao acamamento em milho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O milho

O milho tem diferentes nomenclaturas, sendo a mais aceita a utilizada primeiro pelos indígenas do Caribe, que descende da língua aruaque (Smith, 2001). Lineu incluiu o nome na espécie para o gênero (*Zea mays L.*) (Ranum *et al.*, 2014). Sua origem é no continente americano, precisamente no México, baseada em evidências atuais de que o teosinto (ancestral do milho), se restringe a essa área e evidências arqueológicas de que o milho é mais antigo no México (Beadle, 1978 e Wilkes, 1967)

O milho é uma gramínea alógama, anemófila, monoica e protândrica, pertencente à família botânica *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, espécie *Zea Mays L.* É uma espécie diplóide, com o número de cromossomos $x=10$, $2n=2x=20$ (Lisch, 2012). A diversidade existente nessa espécie permite que novos conhecimentos sejam incorporados constantemente no processo de aperfeiçoamento dos programas de melhoramento (Buckler *et al.*, 2006).

O milho é um dos cereais mais cultivado do mundo, com produção mundial de aproximadamente, 1,206 bilhões de toneladas na safra global 2021/22, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2022). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial produzindo 115 milhões de toneladas, seguindo atrás dos Estados Unidos com 382,59 milhões de toneladas e China com 272,55 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2020). O motivo para se tenha tal volume de produção é o cultivo em vários locais do mundo, abrangendo a produção e adaptação a diversos ambientes (Fornasieri Filho, 2007). Devido à grande variabilidade genética presente no milho, torna-se fácil a adaptação da mesma em vários ambientes e climas (Sangoi *et al.*, 2006).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2022), o milho é a segunda cultura mais plantada no Brasil, com aproximadamente 19,8 milhões ha, com 72% dessa área destinada ao cultivo de segunda safra, ficando atrás somente da soja, com 35 milhões ha, evidenciando a importância dessa atividade para a agricultura brasileira. Para a safra 2022/2023 (CONAB, 2022), o milho tem uma estimativa para 2023 de na primeira safra ter uma área total de 4,5 milhões de ha

plantados com uma safra estimada de 28,99 milhões toneladas. A segunda safra é responsável 94,53 milhões de toneladas em uma área de 17 milhões de ha. Recentemente surgiu uma terceira safra com área de 669,8 mil ha com uma produtividade de 2 milhões de toneladas.

No Brasil, o milho é muito importante na alimentação de animais, na produção *in natura*, em silagens e em composições de rações, sendo o cereal a base do setor de bovinocultura de corte, aves e suínos (Pavão e Ferreira Filho, 2011). Atualmente um dos maiores consumidores de milho é a bovinocultura de corte devido ao aumento de exportação da carne brasileira. Houve um aumento significativo do consumo da carne brasileira em países asiáticos. Na China e na África, esse crescimento se deu em torno de quatro vezes o valor de consumo, desde 1980 (Schneider e Sharma, 2014). Além disso, o milho é um cereal muito utilizado na alimentação dos chineses e africanos (Adrian *et al.*, 2016).

O milho também é utilizado na produção de biocombustível, como o etanol, ou fazendo parte da composição de combustíveis e aditivo em gasolina (FAO, 2013). Além disso, o milho ainda destaca-se na alimentação humana, como óleo, glucose, amido, farinhas de milho, canjiquinhas, canjicas, *in natura*, milho em conserva, rações de animais domésticos, além da composição de cervejas, panificação, snacks, fármacos, entre outros subprodutos que encontramos no mercado cuja composição contém milho (Cardoso *et al.*, 2011).

2.2 Melhoramento genético do milho

A cultura do milho no Brasil tem grandes desafios devido ao clima tropical que favorece pragas e doenças, fatores bióticos e abióticos que dificultam a produção do milho, diminuindo sua produtividade. Com a ajuda do melhoramento genético esses desafios encontrados pelo produtor para a produção da cultura têm se tornado cada vez menores.

A variabilidade genética tem permitido a obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a pragas e doenças, e mais bem adaptadas ao ambiente diferente do seu centro de origem (Faleiro, 2018).

Um programa de melhoramento envolve escolha de populações, obtenção e avaliação de linhagens, testes de combinações híbridas, avaliações de linhagens, o que torna o programa caro e oneroso (Paterniani *et al.*, 2010). Um programa de melhoramento genético clássico de milho pode levar de 7 a 9 ciclos para desenvolver um híbrido comercial (Faleiro *et al.*, 2018).

Com o avanço das tecnologias de genotipagem e sequenciamento, e a sua redução de custos, surgiram novas oportunidades para o entendimento de processos biológicos, identificação de genes e QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e a aceleração na obtenção de novas cultivares e híbridos. A utilização de dados de genotipagem tem permitido racionalizar o processo de fenotipagem por meio da predição do comportamento de genótipos no campo (Faleiro *et al.*, 2018).

A genotipagem usando chips de DNA permite estudos precisos e acurados de caracterização molecular e suas aplicações práticas nas etapas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos, pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (Faleiro *et al.*, 2018).

2.3 Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS)

Com os avanços na biologia molecular, a inovação de sequenciamento do DNA e de genotipagem, conseguiu-se uma redução nos custos e maior rapidez e prospectar marcadores SNPs (*Single Nucleoides Polimorphism*). Os SNPs estão distribuídos aleatoriamente nos cromossomos, e espera-se que alguns estejam dentro ou muito próximo dos gene responsáveis pelas características de interesse. Os SNPs são extremamente importantes na identificação de regiões contendo QTLs no genoma (Matukumalli *et al.*, 2009).

Os Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) tem o objetivo de identificar QTL para características de interesse, ou seja, identificar marcadores que estejam associados ao fenótipo de interesse (Ikegawa, 2012 e Visscher *et al.*, 2012)

O GWAS possibilita a identificação de regiões cromossômicas e SNPs que juntos podem explicar parte da variação genética do fenótipo em estudo. Com estudos de associação em mapas com alta cobertura de SNPs, pode-se explicar toda variabilidade genética aditiva de uma característica através dos SNPs distribuídos no

genoma. É possível estimar o valor genético de um indivíduo com base nos genótipos dos marcadores associados a característica de interesse (Faleiro *et al.*, 2018).

O GWAS baseia-se na suposição de que mutações causativas, que são responsáveis pela criação dos alelos alternativos dos genes em uma espécie, estão em Desequilíbrio de Ligação (DL) com os marcadores adjacentes em uma população (Hamblin e Jannink, 2011). Quanto maior o DL, maior o poder de detectar os QTLs (Long e Langley, 1999 e Farfan *et al.*, 2015).

2.3.1 Desequilíbrio de Ligação (DL)

O desequilíbrio de ligação (DL) é a propriedade que define que um alelo do SNP é herdado em conjunto ou está correlacionado com o alelo de outro SNP dentro da população estudada (Bush e Moore, 2012).

O DL é uma tentativa matemática de descrever as mudanças na variação genética dentro de uma população. Os eventos recombinantes acontecem a cada geração quebrando os segmentos cromossômicos. As medidas do DL baseiam-se na diferença entre a frequência observada de ocorrência para os alelos de dois genes ou marcadores moleculares (haplótipo de dois marcadores) e a frequência esperada se os dois marcadores fossem independentes (Altshuler *et al.*, 2005). Para análises genéticas, o DL é reportado em termos de r , medida estatística de correlação, que varia de zero a 1 na estimação do DL. Pode-se considerar que maiores valores de r indicam que dois SNPs transmitem informações semelhantes, ou que os mesmos pares de alelos são herdados juntos em uma grande frequência (Sollero *et al.*, 2016).

Graficamente, quando mais de dois *loci* são considerados em conjunto, uma prática comum é distinguir os pares que têm altos níveis de LD dos demais. Tem-se a formação de grupos denominados blocos de haplótipos, e os limites são pontos de recombinações (Slatkin, 2008).

2.4 Acamamento do Colmo do milho

O acamamento é definido como um estado permanente de modificação da posição do colmo comparado à posição original, resultando em plantas encurvadas e até mesmo na quebra de colmos. No acamamento pode haver a ruptura dos tecidos, o que impede a vascularização do colmo e a recuperação da planta, afetando a estrutura anatômica essencial para o transporte de água e nutrientes. Quanto mais cedo se manifestar no ciclo de vida da planta, menores serão o rendimento e a qualidade dos grãos (Gomes, et. al, 2010).

O acamamento é um fenômeno complexo, sendo que sua expressão depende de fatores genéticos, interrelacionados com fatores do clima, do solo, das práticas culturais adotadas, fatores bióticos e abióticos. Entre os principais agentes que promovem acamamento destaca-se o vento e a chuva (Gomes, et.al., 2010).

Segundo Zorzô 2019, um fator que contribui muito para que ocorra o acamamento é a altura da inserção da espiga que, quanto mais alta estiver, mais suscetível a planta está ao acamamento.

O acamamento é determinado pelo percentual de plantas acamadas, com o colmo formando ângulo maior que 20° com a vertical. Vários fatores podem ser levantados, que somados ou não, causaram a queda prematura dessas plantas. Entre as possíveis causas estão: doenças radiculares ou de colmo como Fusarium, Antracnose, Macrophomina, Pythium, entre outras; complexo do enfezamento do milho causado pela cigarrinha (*Dalbulus maydis*); ventos fortes; solos com excessiva umidade no momento da semeadura, e na fase de estabelecimento do sistema radicular; solo compactado; pragas de solo e de colmo; híbridos ou variedades de diferentes genótipos e/ou ciclos; época, densidade de semeadura e espaçamento entrelinha (Filho & Borges, 2019)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético e condução experimental

Foram avaliadas 1.109 linhagens endogâmicas de milho oriundas do banco germoplasma da empresa Longping High-Tech. O desenvolvimento das atividades de pesquisa ocorreu na localidade de Poxoréu, no estado do Mato Grosso, no ano de

2021, no período da safrinha, sendo instalado em janeiro de 2021. O ensaio foi conduzido na latitude 15°38'58.09"S e longitude 54° 7'10.30"O, com altitude 670 m, clima Aw (Tropical de Savana), de acordo com a classificação de Köppen (Dubreuil *et al.*, 2018) e o solo é classificado como Neossolos Quartzarênicos (Santos, *et al.*, 2018).

O experimento foi conduzido em parcelas experimentais compostas de 1 linha de 2 metros com 10 sementes por parcela, com espaçamento de 0,5 m entre linhas.

3.2 Avaliação do acamamento do milho

Para avaliação do acamamento e dos sintomas, as parcelas experimentais foram avaliadas aos 200 dias após o plantio, quantificando as plantas com os colmos danificados ou acamadas.

Foram realizadas as avaliações de número de plantas por parcela, número de plantas acamadas e após contagens foi realizada a conversão dos dados para porcentagem. Na avaliação, foram atribuídas notas de 1 a 9, sendo 9 plantas resistentes (plantas com porte ereto, sem sintomas de acamamento) e 1 plantas muito suscetíveis.

3.3 Extração do DNA e Genotipagem

No estágio V4 de desenvolvimento das plantas foram coletados discos foliares de 5 mm de diâmetro para extração de DNA. De cada linhagem foram amostradas 5 plantas, coletando-se um disco foliar de cada planta, em bulk. A extração de DNA dos discos foliares foi realizada utilizando-se o *kit Fast ID Genomic* (Genetic ID), seguindo as instruções do fabricante. Os dados genotípicos foram obtidos através de plataforma de sequenciamento de nova geração *Ion Gene Studio* (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América), com um painel de 5 mil marcadores SNP. Foi utilizada a técnica de genotipagem por sequenciamento de regiões-alvo (*target Genotyping by Sequence – tGBS*) (Ott *et al.*, 2017). Marcadores SNP com menos de 90% de dados válidos não foram usados nas análises subsequentes.

3.4 Análise de dados

Os dados genotípicos e fenotípicos obtidos foram usados na análise de Associação Genômica, utilizando-se o Modelo BLINK-R (*Bayesian-information and*

Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway) do pacote GAPIT (*Genome Association and Prediction Integrated Tool*) (Wang e Zang, 2021) do software R.

Como controle de parentesco no método BLINK-R foi utilizada a matriz de estrutura de população (Q). A matriz Q foi obtida pelo agrupamento gerado pelo método Bayesiano generalizado, com uso do modelo de máxima verossimilhança e o método de relaxamento em bloco para acelerar a convergência, utilizando-se o software Admixture (Alexander *et al.*, 2009).

Marcadores foram considerados significativos quando o valor de significância foi menor do que 0,01, aplicando-se a correção de *Bonferroni*. Os resultados de $-\log_{10}(P)$ foram plotados em gráficos Manhattan Plot para visualização dos resultados.

Marcadores significativos na análise GWAS foram utilizados na análise de regressão linear múltipla para estimar o efeito conjunto dos marcadores significativos. Para as análises de regressão múltipla foi utilizado o programa JMP (SAS Institute, 1990), com probabilidade de entrada e de saída de 5%, e procedimento Stepwise de seleção do modelo.

O Desequilíbrio de Ligação (DL) entre os marcadores SNPs foi obtido com auxílio do programa Haploview (Barret *et al.*, 2005)

Para investigar a existência de genes nas regiões contendo os QTLs de resistência ao acamamento do milho foram consideradas as sequências do genoma do milho no intervalo entre pares de SNPs em que DL foi $\geq 0,9$ e FDR (*False-discovery rate*) $\leq 0,01$ em relação ao SNP identificado para cada QTL. Para verificar a presença de genes nesses intervalos foi utilizada a plataforma MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org>) e o genoma de referência B73 RefGen_V3 do milho.

Utilizando-se o ID do gene foram obtidas as informações relativas ao mesmo com uso da plataforma do NCBI GENBANK (Kinsella *et al.*, 2011 e Faria, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

Duzentos dias após o plantio, foram avaliadas as porcentagens de acamamento das 1.109 linhagens endogâmicas de milho utilizadas neste estudo. Na Figura 1 observa-se a distribuição fenotípica, em porcentagem, do percentual de acamamento observado.

Dos 5.076 marcadores SNPs utilizados na genotipagem das 1.109 linhagens, 1.160 marcadores foram excluídos antes da análise de GWAS por apresentarem menos de 90% de dados válidos ou MAF menor do que 5%.

Na análise GWAS foram identificados sete marcadores significativos sendo um marcador no cromossomo 1, um no cromossomo 3, dois marcadores no cromossomo 4, dois no cromossomo 9 e um marcador no cromossomo 10 (Figura 2). Pode-se observar na Figura 3 que a análise Q-Q plot ilustra o bom ajuste do modelo, e um adequado controle de associações falsas. A linha vermelha indica a distribuição esperada do teste de associação, com base na hipótese nula, e os círculos azuis indicam a distribuição observada dos SNPs. Ou seja, os SNPs representados no desvio da reta azul são caracterizados como os SNPs mais significativos. Os desvios do observado em relação ao esperado representam os SNPs significativos a tolerância ao acamamento, ou seja, uma pequena proporção de hipóteses alternativas verdadeiras (Burghardt *et al.* 2017). Isso sugere que o modelo testado é confiável e pode ser utilizado para a escolha dos SNPs a serem usados para seleção de linhagens resistentes ao acamamento.

Os sete marcadores identificados na análise GWAS foram utilizados na análise de regressão múltipla. Após a análise de regressão múltipla, o marcador do cromossomo 3 deixou de ser significativo (Tabela 1). A análise de regressão múltipla com método Stepwise de seleção de modelo, conserva somente marcadores que não sejam redundantes para o mesmo QTL, ou seja, marcadores que contribuam para o efeito conjunto da característica estudada. Assim, cada marcador significativo nesta análise corresponde a um QTL (Schuster e Cruz, 2004). O marcador do cromossomo

3 não foi relevante na análise conjunta, pois na presença dos demais QTLs, este não aumenta os níveis de resistência.

Após a análise de GWAS usando o método sequencial de Modelos Mistos e Regressão Múltipla, restaram 6 QTLs significativos em 4 cromossomos (1, 4, 9 e 10). Os cromossomos 4 e 9 contêm dois QTLs cada. O efeito conjunto destes marcadores (R^2) na variação fenotípica foi de 24% (Tabela 1).

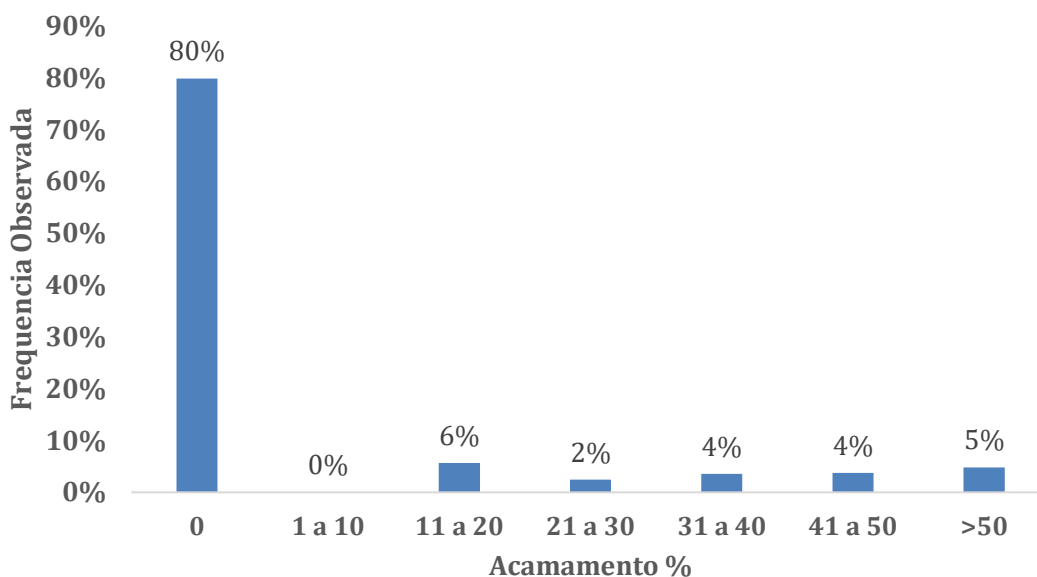


Figura 1– Distribuição de frequência do acamamento observada em 1.109 linhagens endogâmicas de milho em Poxoréu, MT, 2021.

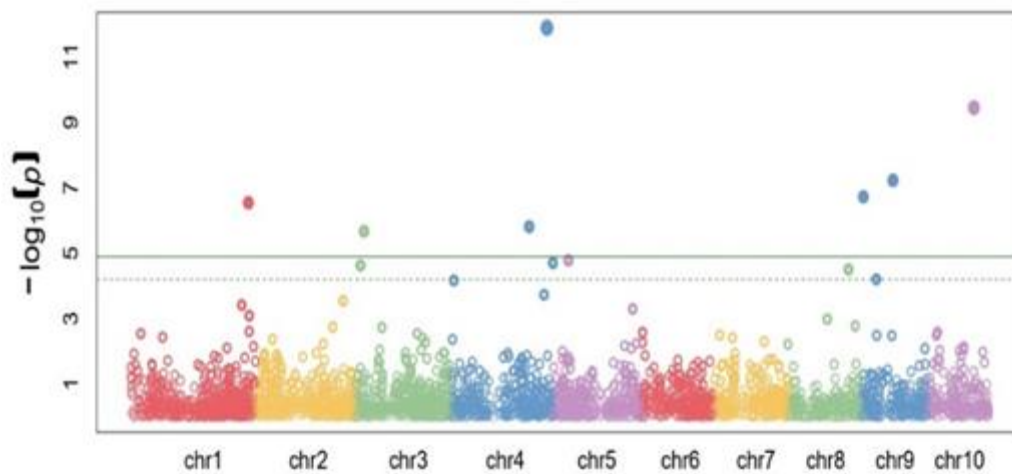


Figura 2 – Manhattan Plot da análise de associação de marcadores SNP e a tolerância ao acamamento em milho. Cada cor representa um cromossomo do milho. O limite de significância indicado pela linha contínua horizontal foi obtido pela correção de Bonferroni para $p = 0,001$.

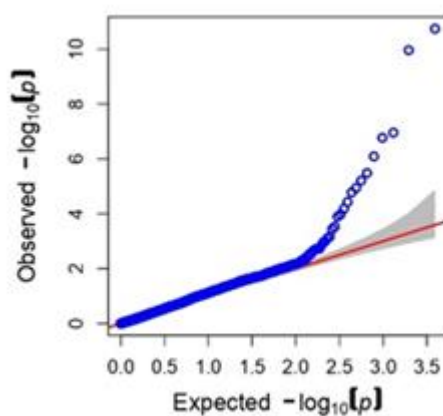


Figura 2 – Q-Q plot da análise de associação de marcadores SNP e a tolerância ao acamamento em milho.

Tabela 1 – Marcadores associados a resistência do milho ao acamamento, após análise sequencial de GWAS e regressão múltipla.

Marcador	Cromossomo	Posição	Prob	R2 acumulado
10K02203	1	290.000.000	0,0000	0,138
10K04941	4	232.000.000	0,0000	0,189
10K04757	4	189.000.000	0,0000	0,217
10K07527	9	3.878.672	0,0001	0,231
10K07728	9	76.105.284	0,0018	0,239
10K08486	10	115.000.000	0,0102	0,245

A ilustração do desequilíbrio de ligação nas regiões contendo os QTLs está apresentada nos Apêndices.

Dos seis SNPs associados ao acamamento do milho, quatro estão em regiões que possuem genes já caracterizados (Tabela 2).

O gene LOC103637828 está localizado no cromossomo 9, na posição 3.878.672 até a posição 3.878.900 associado ao SNP 10K04941. De acordo com O'Connell *et al.* (2006), esse gene pertence à família de genes *myosin* (*ATPase superfamily. Myosin family*), o sistema actina-miosina faz parte do processo celular de organização e dinâmica do sistema de endomembranas e rede de transporte em células vegetais.

Observa-se no milho que há um aumento relativo dos genes de miosina devido aos seus *intros* mais longos abundantes em elementos transponíveis. (Wang *et al.* 2014). Em *Arabidopsis* foram observados uma família de miosina com 17 genes. O gene *Myosina2* (MYA2) se localiza em peroxissomos em células epidérmicas e guarda de folhas de *Arabidopsis* de maneira dependente de actina.

Estudos em milho e agrião relataram o gene *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM1) da miosina localizados em plasmodesmos em células de raízes, sugerindo que a miosina está relacionada a maturação das paredes celulares e ao reestabelecimento da actina na célula. Essas características estão associadas resistência dos tecidos, o que pode explicar a relação do gene LOC103637828 com a resistência ao acamamento do milho.

Tabela 2 – Genes candidatos localizados nas regiões contendo os QTLs associados a tolerância ao acamamento do milho

SNP	Cromossomo	Posição	P valor	MAF	Código variação	da	Modelo de gene associado (NCBI Gene ID)	Anotação Funcional	
10K04941	4	232.176.563	1.30E-12	0.065	rs129944531		LOC100191644	polyadenylate-binding interacting protein 9	protein-
10K08486	10	115.002.401	3.60E-10	0.072	rs132584092		No Data	No Data	
10K07728	9	76.105.284	5.96E-08	0.170	rs131024615		LOC100502428	putative ferroportin-domain protein	family
10K07527	9	3.878.672	1.90E-07	0.062	rs131692134		LOC103637828	myosin-11	
10K02203	1	289.630.855	2.89E-07	0.075	rs131907116		No Data	No Data	
10K04757	4	188.889.928	1.56E-06	0.222	rs129860563		LOC103654305	putative apyrase (probable apyrase 3)	family protein

O gene LOC100502428 está localizado no cromossomo 9, na posição 76105284 até a posição 76105400 e está associado ao SNP 10K07728. De acordo com a literatura esse gene pertence à família de genes de domínio de proteínas (*putative ferroportin-domain family protein*).

O gene LOC100502428, faz parte família de transportadores de soluto 40 (transportador regulado por ferro), e pode estar envolvido no transporte de ferro e na homeostase do ferro (Ward e Kaplan 2012). Foi observado em *Arabidopsis* que a concentração do elemento ferro induz a expressão do gene LOC100502428 e, de acordo com Ward e Kaplan (2012), atua na produção da Ferroportina (FPN), que atua codificando proteínas com diferentes localizações e funções teciduais e subcelulares.

A FPN1 atua na membrana plasmática das células onde se encontram os vasos condutores, possuindo uma maior afinidade pelo elemento ferro. A FPN2 encontra-se nas membranas vacuolar da raiz e seus níveis mudam de acordo com a quantidade de ferro no ambiente. Geralmente tem a função do transporte do cobalto para as células (Ward e Kaplan 2012). O ferro em forma reduzida Fe²⁺ é muito importante para transferência de elétrons em muitas enzimas nas plantas (por exemplo *citocromos*, *peroxidases*, *catalises*). Ele é também requerido para síntese de clorofila (OLIVEIRA, 2013).

O gene LOC103654305, que está localizado no cromossomo 4, na região 188.889.928 a 18.900.000 associado ao SNP 10K04757, é um modelo genético pertencente à família GDA1/CD39 *NTPase (Nucleoside-Triphosphatase) [putative apyrase locali protein (probable apyrase 3)]* presentes em organismos procariontes e eucariontes (Day et al. 2000).

As aspirases NTPDase (*Nucleosideo Trifosfato Difosfohidrolase*) hidrolisam uma ampla gama de nucleosídeos tri e difosfatos. Nas plantas, principalmente em arroz (*Oryza sativa*) e sicômoro (*Acer pseudoplatanus*) e *Arabidopsis thaliana*, observou-se que as funções da aspirase são diversas incluindo nodulação, resistência a Xenobióticos, eliminação de fosfato e crescimento da planta.

Schiller et al. (2012) observaram duas apirases em *Arabidopsis thaliana*, presentes no complexo de golgi, que estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento de plantas por estarem associadas a regulação da produção de ATP nas células. Devido a localização do gene e sua função, este pode estar

relacionado ao acamamento do milho, uma vez que o complexo de golgi e os polissacarídeos produzidos no complexo ajudam na formação e produção da parede celular e da lamela média da célula vegetal (Moreira 2014).

O gene LOC100191644 está localizado no cromossomo 4, na posição 232.176.563 até 232.176.700 associado ao SNP 10K04941 e pertence à família de genes de produção de poliadenilato (*polyadenylate-binding protein-interacting protein 9*). O gene liga-se a uma proteína de ligação da família PABP que estimula a tradução de terminação, via interação de seu domínio C-terminal, com fator de liberação da cadeia polipeptídica eucariótica, eRF3. Uma das PABP é uma proteína multifuncional que está relacionada ao metabolismo do Ácido Ribonucleico (RNA), sendo a proteína que interage com o RNA mensageiro (mRNA) (Ivanov et al. 2019).

Nas regiões em desequilíbrio de ligação com os QTLs dos cromossomos 1 (289.630.855pb até 289.630.990pb) e 10 (115.002.401pb até 115.002.800pb), não há nenhum gene descrito até o momento. Estas regiões ainda precisam ser melhor caracterizadas para elucidação do seu papel fisiológico associado ao acamamento do milho.

4.3 Discussão

Para o controle do acamamento do milho uma das formas mais viáveis e sustentáveis para diminuir os danos é o uso de cultivares resistentes. Para isso muitos estudos precisam ser desenvolvidos pra mapeamento de QTLs e identificação de genes com relação de cause e efeito na resistência ao acamamento.

EM diversos estudos sobre o acamamento do milho há relatos de que a resistência do colmo depende da morfologia e da estrutura do tecido (Zhang et al. 2018). Plantas com o colmo com estrutura menos resistentes possuem uma maior facilidade ao acamamento do milho no campo. A integridade do colmo do milho não é somente para a sustentação da planta, mas também pela fotossíntese e a translocação de água e nutrientes. O colmo danificado pode causar danos ao enchimento dos grãos na espiga, afetando diretamente a produtividade e qualidade do grão (Gomes, 2010).

O custo reduzido e a alta eficiência baseada na genotipagem incentivam a utilização dessa técnica em várias espécies (Xu et al. 2020). O fato da ampla cobertura do genoma também é um fator que torna a abordagem bem atraente para a descobertas de SNPs. Os SPNs são marcadores superiores para serem usados em pesquisas da genética molecular e melhoramento, junto a outras tecnologias como re-sequenciamento de genótipos (Vinholes et al. 2019). Essa técnica tornou-se mais eficiente em relação a seleção fenotípicas que além de caras são bastante limitadas. Devido a disponibilidade de recursos genômicos e as informações genéticas do milho, há grande oportunidades para identificação cultivares de milho resistentes ao acamamento.

Ao nosso conhecimento, ainda não há relato na literatura científica de pesquisada de genes associados a tolerância do milho ao acamamento. Neste estudo, quatro genes foram identificados nas regiões associadas aos marcadores significativamente associados a tolerância ao acamamento causado pelo complexo de doenças radiculares em milho.

No cromossomo 9, o gene LOC103637828 da família de genes myosin (*ATPase superfamily.Myosin family*) e o gene LOC100502428 da família de genes de domínio de proteínas (*putative ferroportin-domain family protein*). No cromossomo 4 o gene LOC103654305, da família GDA1/CD39 NTPase [*putative apyrase locali protein (probable apyrase 3)*] e o gene LOC100191644 da família de genes de produção de poliadenilato (*polyadenylate-binding protein-interacting protein 9*). Novos estudos ainda são necessários para identificar o possível papel desses genes no acamamento do milho.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se criar estratégias de seleção assistida por marcadores moleculares para acamamento do milho, visando selecionar cultivares resistente, como já observado em milheto e sorgo (Cenci, 2021).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram identificados seis QTLs associados à tolerância ao acamamento em milho. Dois QTLs no cromossomo 9, próximos ao gene LOC103637828 e ao gene LOC100502428, dois no cromossomo 4 próximos aos genes LOC103654305 e LOC100191644, um QTL no cromossomo 1 e um QTL no cromossomo 10.

Após validação destes QTLs em populações independentes, é possível elaborar estratégias de SAM para auxiliar no desenvolvimento de linhagens e híbridos de milho com maior tolerância ao acamamento.

Trabalhos adicionais para estudar a possível ação dos genes identificados nas regiões dos QTLs na resistência do milho ao acamamento do milho.

REFERÊNCIAS

Adrian, E.A., Sam G.A., Yiching, S.; (2016) Sustainable maize production and consumption in China: practices and politics in transition **Journal of Cleaner Production**. 134: 259-268. doi: [10.1016/j.jclepro.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.001)

Alexander, D.H; Novembre, J; Lange, K.; (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Res**. 19:1655-1664. doi: [10.1101/gr.094052.109](https://doi.org/10.1101/gr.094052.109)

Altshuler, D., Donnelly, P. (2005) The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. **Nature** 437:1299–1320. doi: <https://doi.org/10.1038/nature04226>

Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. 21(2):263-265.

Beadle, G.W (1978). Teosinte and the origin of maize. In: Walden DB (ed.) **Maize breeding and genetics**. New York: Jhon Wiley and Sons, 113-141.

Buckler, E.S.B.S.; Gaut, M.D.M; (2006) Molecular and functional diversity of maize. **Current opinion in plant biology** 9: 172-176.

Burghardt, T.P; , *et al.* (2017) Auxotonic to isometric contraction transitioning in a beating heart causes myosin step-size to down shift. **PLoS One**. 12: 1-23. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174690>

Bush W.S, Moore J.H. (2012). Genome-wide association studies. **PLoS Computational Biology** 8: 800-822.

Cardoso C. *et al.* (2011). Industria do Milho. In: Borém A, Rios SA. (Ed.). **Milho biofortificado**. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 173-195.

Cenci, A.M. (2021) **Relatório de estágio supervisionado realizado na estação de pesquisa Corteva Agriscience™**. 98 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) -Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.

Companhia Nacional De Abastecimento. Milho: safra 2022/23. **Perspectivas para agronomia**. 10: 67-85

Costa, R.V, *et al.* (2017). Manejo de doenças na cultura do milho. In: KAPPES, C (Ed.). **Boletim de pesquisa 2017/2018**: soja, algodão, milho. 18. ed. Rondonópolis: Fundação MT, p. 274-309.

Costa, R.V, *et al.* (2019a) Yield losses in off-season corn crop due to stalk rot disease. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 54: 283-299. doi: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00283>

Day, R.B, *et al.* (2000). Differential expression of two soybean apyrases, one of which is an early nodulin. **Mol Plant Microbe Interact.** 13: 1053-1070. [doi: 10.1094/MPMI.2000.13.10.1053](https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.10.1053)

DUBREUIL V, *et al.* (2018). Os tipos de climas anuais no Brasil: uma aplicação da classificação de Köppen de 1961 a 2015. **Confins**, 37: 24-48. [doi: https://doi.org/10.4000/confins.15738](https://doi.org/10.4000/confins.15738).

Duvick, D.N. (2005a) The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). **Advances in Agronomy** 86:83-145. [doi:10.1016/S0065-2113\(05\)86002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86002-X)

Faleiro F.G.; *et al.* (2018) **Melhoramento de plantas**: variabilidade genética, ferramentas e mercado - Brasília: Proimpress; Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 108 p.

FAO – Food and Agriculture Organization (2013) Committee on World Food Security. High Level Panel of Experts (HLPE). 2013. **Biofuels and food security**. A report by the High Level Panel of Experts on food security and nutrition of the Committee on World Food Security. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1194128/> acessado em 18/10/2022

Farfan, I. D. B., G. N. De La Fuente, S. C. Murray, T. Isakeit, P.-C. Huang, M. Warburton, P. Williams, G. L. Windham, and M. Kolomiets, 2015 Genome wide association study for drought, aflatoxin resistance, and important agronomic traits of maize hybrids in the sub-tropics. **PLoS one** 10: e0117737.

Faria, S.V. (2021) **Caracterização fenotípica e molecular e análise de GWAS e GWS para caracteres de raiz em um conjunto de linhagens endogâmicas de milho tropical**. Viçosa MG

Filho & Borges, 2019; Filho, I. A. P.; Borghi, E.; **Alta tecnologia exige híbrido de milho resistente ao acamamento** | Revista Campo & Negócios nº 582 - 2019

Fornasieri Filho, D; (2007) **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 576 p

Gomes, L.S, *et al.* (2010) Resistência ao acamamento de plantas e ao quebramento do colmo em milho tropical. **Pesq. Agropec. Bras.** 45: 140-145. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000200004>.

Hallauer, A.R.; Carena MJ (2009) **Maize**. Springer.

Hamblin, M.; Jannink, J. Factors affecting the power of haplotype markers in association studies. **Nature Methods**, v. 4, p. 145–153, 2011.

Huang et.al, (2019) BLINK: a package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions, **GigaScience**, 8: 154-168. Doi: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy154>

Ikegawa, S. A short history of the Genome-Wide Association Study: where we were and where we are going. **Genomics & Informatics**, v. 10, p. 220–225, 2012.

Ivanov, A.; Shuvalova, E.; Egorova, T.; Shuvalov, A.; Sokolova, E.; Bizyaev, N.; Shatsky, I.; Terenin, I.; Alkalaeva, E.; Polyadenylate-binding protein-interacting proteins PAIP1 and PAIP2 affect translation termination. **J Biol Chem**. 2019 May 24;294(21):8630-8639. doi: [10.1074/jbc.RA118.006856](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006856). Epub 2019 Apr 16. PMID: 30992367; PMCID: PMC6544843

Kinsella, R.J., Kähäri, A., Haider, S., Zamora, J., Proctor, G., Spudich, G., Almeida, J., Staines, D., Derwent, P., Kerhornou, A., 2011. **Ensembl BioMart**: a hub for data retrieval across taxonomic space. Database 2011.

Lisch, D., 2012 Regulation of transposable elements in maize. **Current opinion in plant biology** 15: 511–516.

Long, A.; Langley, C. The Power of Association Studies to Detect the Contribution of Candidate Genetic Loci to Variation in Complex Traits. **Genome Research**, v. 9, p. 720–731, 1999.

Matukumalli, L.K.; Schoroeder, S.; Denise, S.K.; Sonstegard, T.; Lawley, C.T.; Georges, M.; Coppeters, W.; Gietzen, K.; Medrano, J. F.; Rincon, G.; Lince, D.; Eggen, A.; Glaser, L.; Cam, G.; Van Tassel, C. V. **Analyzing LD blocks and CNV segments in cattle**: Novel genomic features identified using the BovineHD BeadChip. Illumina Inc, n. 370-2011-002, 2011.

Moreira, C. (2014) Ciclo Celular, **Rev. Ciência Elem.**, V2(04):249 doi:[10.24927/rce2014.249](https://doi.org/10.24927/rce2014.249)

Nass, L.L.; Paterniani, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, p.581-587, 2000.

O’Connell et. al, 2006 – O’connell, C.B; Tyska, M.J. ;Mooseker, M. S. Myosin at work: Motor adaptations for a variety of cellular functions – Elsevier **Biochimica et Biophysica Acta** 1773 (2007) 615–630

Oliveira 2013 – Oliveira, L. E. M.; **Fisiologia vegetal** – UFLA 2013

Ott et al., 2017- Ott, A;Liu, S; Schnable, J.C;Yeh, C.T.E.; Wang, K.S; Schnable P. S; tGBS® genotyping-by-sequencing enables reliable genotyping of heterozygous loci - **Nucleic Acids Research**, 2017, Vol. 45, No. 21 e178 - doi: [10.1093/nar/gkx853](https://doi.org/10.1093/nar/gkx853)

Paes, G. P.; (2014) **Desequilíbrio de ligação e mapeamento associativo em populações de milho-pipoca relacionadas por ciclos de seleção**. Viçosa, MG, 2014. ix, 48f. : il. ; 29 cm.

Paterniani, M. E. A. G. Z.; Ferreira, E. A.; Duarte, A. P.; Gallo, P. B. Potencial de híbridos top crosses de milho no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 2, p. 163-176, 2010.

Pavão A.R; Ferreira Filho J.B.S.; (2011) Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural** 49:81-108. [doi:10.1590/S0103-20032011000100004](https://doi.org/10.1590/S0103-20032011000100004)

PLOS Genetics Staff (2016) Correction: Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome-Wide Association **Studies**. **PLOS Genetics** 12: 59-57

Ranum et al., Ranum, Peter & Pena-Rosas, J.P. & Garcia-Casal, Maria N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1312. 10.1111/nyas.12396.

Sangoi, L., Silva, P.R.; Silva, A.; Ernani, P.; Horn, D.; Strieder, M.; Schmitt, A.; Schweitzer, C.; (2006) Desempenho agrônomo de cultivares de milho em quatro sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 5:218-231. [doi:10.18512/1980-6477/rbms.v5n02p%25p](https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v5n02p%25p)

Santos, H. G. Dos.; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C. Dos.; Oliveira, V. Á. De.; Lumbreras, J. F.; Coelho, M. R.; Almeida, J. A. De.; Araújo Filho, J. C. De.; Oliveira, J. B. De. ; Cunha, T. J. F. **Embrapa Solos.Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – 5. Ed., ver. E ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2018. 356 p. : il. Color. ; 16 cm x 23 cm. ISBN 978-85-7035-800-4 1.**

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide:** version 6. SAS Institute Incorporated, 1990.

Schneider, M.; Sharma, S.; (2014). **China's pork miracle?** Agribusiness and development in China's pork industry. Institute for Agriculture and Trade Policy.

Schiller, M., Massalski, C., Kurth, T. *et al.* The Arabidopsis apyrase AtAPY1 is localized in the Golgi instead of the extracellular space. **BMC Plant Biol.**12, 123 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-123>

Schuster, I.; Cruz, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.** Viçosa: UFV, 2004. 568 p

Sollero, et.all 2016 – Sollero, B.P.; Reimann, F. A.; Campos, G. S.; Cardoso, F. F.; **Aplicação de métodos Bayesianos em estudos de associação genômica-ampla para características complexas em animais de produção** — Bagé : Embrapa Pecuária Sul, 152 pag- 2016.

Smith, B.D.; (2001). Documenting plant domestication: the consilience of biological and archaeological approaches. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 98:1324-1326. [doi:10.1073/pnas.98.4.1324](https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1324)

Slatkin, M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature reviews – Genetics**, 9:477-485, 2008.

USDA 2022 - <https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/milho-usda-corta-expectativa-de-producao-brasileira-em-3-mi-de-toneladas/> acessado em 18/10/2022

Vinholes, P., Rosado, R., Roberts, P., Borém, A. And Schuster, I. (2019), Single Nucleotide Polymorphism-Based Haplotypes Associated with Charcoal Rot Resistance in Brazilian Soybean Germplasm. **Agronomy Journal**, 111: 182-192. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.07.0429>

Visscher, P. et al. Review: Five Years of GWAS Discovery. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, p. 7–24, 2012.

Xue, Y., M. L. Warburton, M. Sawkins, X. Zhang, T. Setter, Y. Xu, P. Grudloyma, J. Gethi, J.-M. Ribaut, W. Li, et al., 2013 Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water- stressed conditions. **Theoretical and applied genetics** 126: 2587–2596.

Xu, Y., Liu, X., Fu, J., Wang, H., Wang, J., Huang, C., Prasanna, B.M., Olsen, M.S., Wang, G., Zhang, A., (2020). Enhancing genetic gain through genomic selection: from livestock to plants, **Plant Communications**. 1: 1-21.

Wang et.al., 2013 – Wang, G.; Zhong, M.; Wang, J.; Zhang, J.; Tang, Y.; Wang, G.; Song, R.; Genome-wide identification, splicing, and expression analysis of the myosin gene family in maize (*Zea mays*). **J Exp Bot**. 2014 Mar;65(4):923-38. doi: 10.1093/jxb/ert437. Epub 2013 Dec 21. [PMID: 24363426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24363426/); [PMCID: PMC3935558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3935558/).

Wang&Zang, 2021 – Wang, J.; Zhang Z., Gapit Version 3: Boosting Power and Accuracy for Genomic Association and Prediction, **Genomics, Proteomics & Bioinformatics** (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.08.005>.

Ward, D.M.; Kaplan, J.; Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. **Biochim Biophys Acta**. 2012 Sep;1823(9):1426-33. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.004. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22440327; PMCID: PMC3718258.

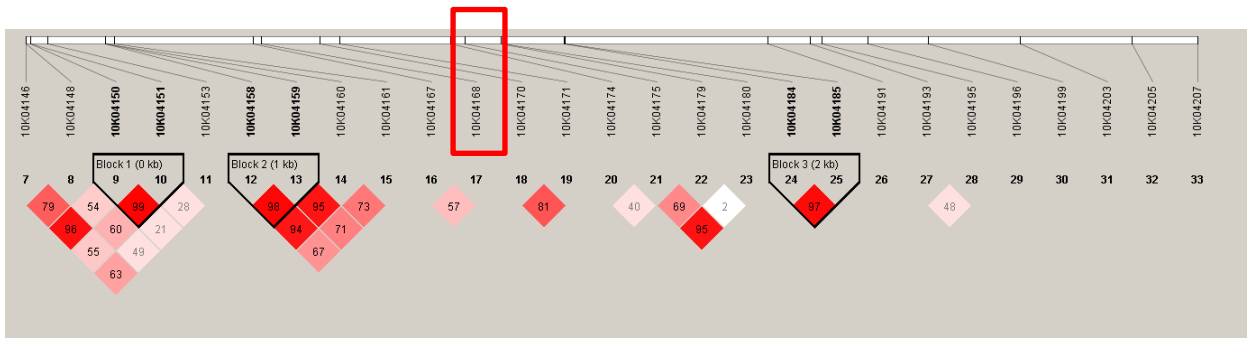
WILKES, H. G.; **Teosinte**: The closest relative of maize. Cambridge: Bussey Institute, 1967. 64p.

Zhang, Y.; Liu, P.; Zhang, X.; Zheng, Q.; Chen, M.; Ge, F.; Li, Z.; Sun, W.; Guan, Z.; Liang, T.; Zheng, Y.; Tan, X.; Zou, C.; Peng, H.; Pan, G.; Shen, Y.; Multi-Locus Genome-Wide Association Study Reveals the Genetic Architecture of Stalk Lodging Resistance-Related Traits in Maize. **Front Plant Sci**. 2018 May 7;9:611. doi: [10.3389/fpls.2018.00611](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00611). PMID: 29868068; PMCID: PMC5949362.

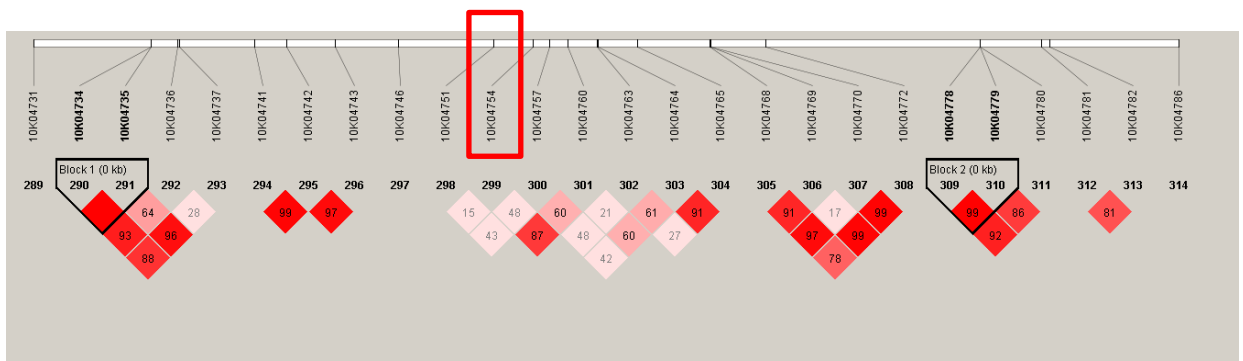
Zôrzo, F.; - Seleção de híbridos de milho em múltiplos locais no Cerrado em cultivo de segunda safra- dissertação de mestrado UnB. - Brasília, 2019. 101 p.

APÊNDICES

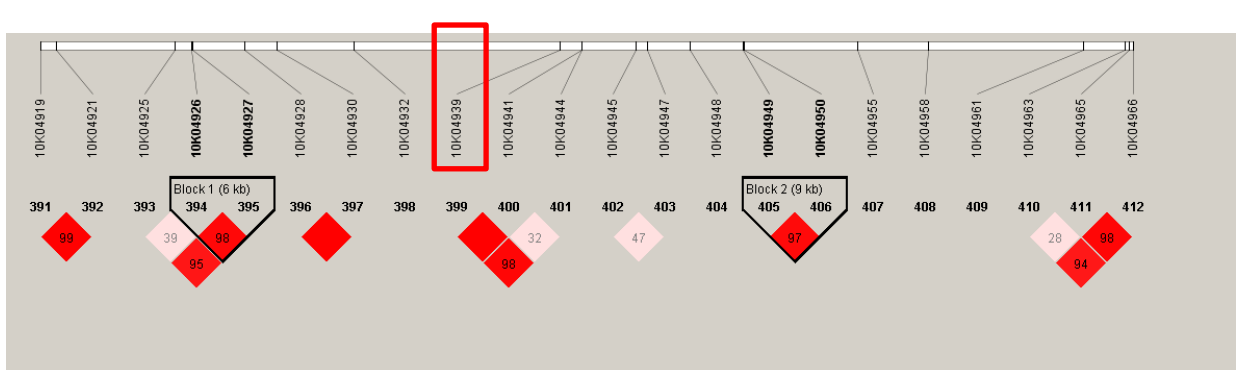
10K04170



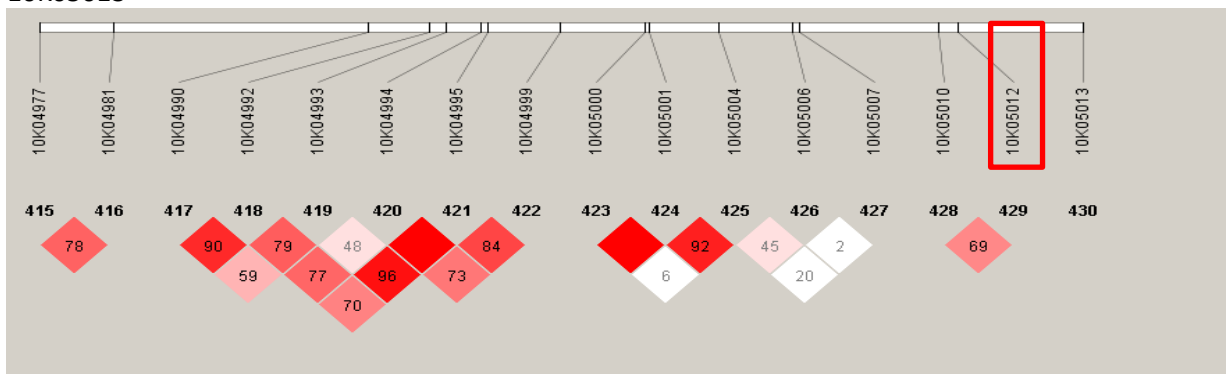
10K04757



10K04941



10K05013



APÊNDICE C – Cromossomo 10

10K08486

