

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

ÉLCIO FRISKE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO EM LINHAGENS
DE MILHO PARA MATURAÇÃO DE GRÃOS**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2016

ÉLCIO FRISKE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO EM LINHAGENS
DE MILHO PARA MATURAÇÃO DE GRÃOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador: Adilson Ricken Schuelter

MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F917d

Friske, Élcio

Diversidade genética e mapeamento por associação em linhagens de milho para maturação de grãos./Élcio Friske. Marechal Cândido Rondon, 2016.

76 p.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Ricken Schuelter

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. Variabilidade genética. 2. Perda de umidade. 3. Desequilíbrio de ligação. I. Schuelter, Adilson Ricken. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 633.153
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

ÉLCIO FRISKE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO EM LINHAGENS
DE MILHO PARA MATURAÇÃO DE GRÃOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do
Oeste do Paraná, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para
obtenção do título de Magister Scientiae.

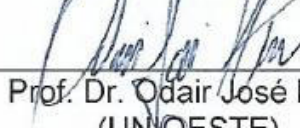
APROVADA em: 29 de fevereiro de 2016.



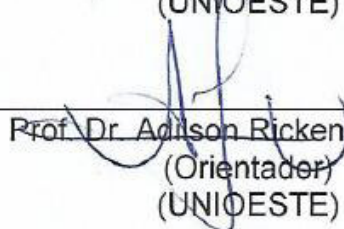
Pesq. Dr. Ivan Schuster
(COODETEC)



Profª. Drª. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo
(UFPR)



Prof. Dr. Odair José Kuhn
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Adilson Ricken Schuelter
(Orientador)
(UNIOESTE)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao professor Dr. Adilson Ricken Schuelter, por sua orientação, ensinamentos, doutrina, compreensão, motivação, empenho e dedicação ímpar à minha formação.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado, e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro ao longo do curso.

A Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), e novamente ao Dr. Adilson Ricken Schuelter, que colocou a disposição à infraestrutura da empresa para a execução do experimento.

Aos professores membros da banca de qualificação, Dr. Vandeir Francisco Guimarães e Dr. Ivan Schuster, também colaborador desse trabalho, e aos professores membros da banca de defesa, Dr. Odair José Kuhn e Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, nas importantes sugestões para o enriquecimento da dissertação.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Dr. Antônio Carlos Torres da Costa, Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi, Dr. Edmar Soares de Vasconcelos, Dr.^a Fabíola Villa e Dr. José Barbosa Duarte Júnior, pelos ensinamentos nas disciplinas.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Ana Paula Deves Rufino e Leila Allievi Werlang, que sempre demonstraram carinho, atenção e comprometimento com cada aluno do curso.

Aos meus pais, Elemar Friske e Zenilde Rosa Friske, e toda minha família, especialmente a minha irmã Eliane Friske e meu cunhado Roberto Marcelo Ortiz Moreira, que me incentivaram e me apoiaram nos momentos mais delicados. E ao meu amigo Marcos André Bortolanza, próximo em todos os momentos na realização e finalização do mestrado.

Aos meus mestres da graduação que iniciaram minha formação profissional e impulsionaram minha continuidade acadêmica: Dr. Alexandre de Castro Salvestro, Dr. Douglas Seijum Kohatsu, Dr.^a Juliana Parisotto Poletine, Me. Max Emerson Rickli e Dr. Valdir Zucareli, profissionais que têm meu respeito e admiração.

Aos meus primos Kelly Tatiane Rech e João Laborde, e meus tios Neli Friske Rech e Jolci Rech, de Marechal Cândido Rondon, que me acolheram em seus lares com muito amor e carinho.

Aos meus amigos do mestrado: André Luís Alves, Jéssica Fernanda de Souza e Douglas Genro, Lorena Maia Noreto, Meirieli Nunes e Ronaldo Beladeli, Pablo Wenderson Ribeiro Coutinho e Vanessa Aline Egewarth, pela amizade sincera e companheirismo dentro e fora da sala de aula.

Aos meus amigos de Nova Santa Rosa e de Marechal Cândido Rondon: André Liseu Fonseca, Cristiane Maria Gabriel Fonseca, Cristiane Santana, Maurício Alessandro Rieger, Suéllen Rech, Valdemir Santana e Vanessa Schuck, que tive o prazer de conhecê-los aos poucos através da minha prima Kelly Tatiane Rech, os quais demonstraram carinho, preocupação e incentivo.

Aos meus amigos e colegas da COODETEC: Adriana Rodrigues, Andressa Silva, Ana Paula Rocha, Bruno Brand, Celso Lopes, Cláudia Karoline Topan, Cláudia Zaura, Diego Oliveira, Diego Tatim, Jéssica C. Lacerda Fogliarini, Jonatas Marcolin, José Alípio Júnior, Kaian Kaefer, Mariana Bonesque, Mayara Silva, Rafael Binsfeld, Rafael Simionato, Renato Malfatto e Silmar Veiga, por terem auxiliado na condução e avaliações do ensaio e manterem agradável convivência durante todo o estágio.

Aos meus amigos do período da graduação; os Engenheiros (as) Agrônomos (as): Ana Cláudia Mascarello, Arthur Carniato Sanches, Beatriz Tomé Gouveia, Camila Vieira Viana, Fabiana Bremm Martins, Flávia de Andrade Meira, Gabriela Chierici Azevedo, Giovana Zucchi de Melo, Guilherme Sapia, Julia Pelegrineli Fasolin, Magnun Rodrigo Silva, Mayra Renata Cruz Soares, Walter Frohlich e Willian Silva Lima; os de outros cursos: André Pregnotato Farhate, Danielle Ikino, Fernanda Ferreira e Juliana Castro; os companheiros de república: Anderson Koch, Carlos Vinícius Molina e Hewerton Lopes; e os amigos do vôlei: Renato e Rodrigo; todos esses, verdadeiros amigos-irmãos, que mesmo distante também estiveram transmitindo forças positivas e carinho.

E a todos que de alguma forma não estejam citados, mas que tenha colaborado nesse trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

FRISKE, Élcio. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2016. **Diversidade genética e mapeamento por associação em linhagens de milho para maturação de grãos.** Orientador: Adilson Ricken Schuelter.

O trabalho teve como objetivos avaliar a diversidade genética e mapear regiões genômicas associadas com maturação de grãos em linhagens de milho comum. Os atributos fenotípicos de 81 linhagens elites de milho foram avaliados em experimento de campo implantado em delineamento de látice quadrado com três repetições. Procedeu-se a análise de variância e multivariada considerando blocos completos casualizados devido a sua equivalência com a estimação para eficiência do látice. Para o mapeamento por desequilíbrio de ligação, 72 linhagens elites foram genotipadas para marcadores SNP na plataforma 650K (Affymetrix®) e associados aos valores genotípicos dos caracteres relacionados à maturação: número de dias para o florescimento masculino (DFM) e feminino (DFF), e perda de umidade dos grãos, determinada pela área abaixo da curva de umidade (AACUM). Os resultados da análise de variância indicaram a existência de diversidade genética no germoplasma para todos os caracteres avaliados, detectando-se ampla variabilidade para DFM, DFF e AACUM. Correlações genéticas fracas entre os componentes de rendimento e de maturação indicaram a possibilidade de seleção para precocidade sem comprometer a produtividade. A diversidade genética quantificada pelas distâncias de Mahalanobis permitiu sugerir combinações híbridas de maior efeito heterótico para precocidade e produtividade. Houve semelhanças no agrupamento de Tocher e UPGMA, que foram eficientes para classificar a variabilidade genética. Pelo modelo linear misto (MLM) foi possível detectar associações entre dias para o florescimento masculino e feminino com marcadores SNP em todos os cromossomos, com predominância nos cromossomos 1 e 3, e para perda de umidade nos cromossomos 5 e 6. Com a análise de regressão múltipla de stepwise para DFM, DFF e AACUM, os modelos completos explicaram 79%, 93% e 56% da variação para os valores genotípicos, respectivamente, encontrando-se predominantemente marcadores significativos nos cromossomos 1 e 3. A detecção de regiões genômicas semelhantes e também distintas para esses caracteres, que são altamente correlacionados, torna possível levantar a hipótese da importância de ligação gênica e de pleiotropia para explicar a maturação de grãos em linhagens de milho. Os resultados obtidos são promissores e as regiões genômicas associadas com DFM, DFF e AACUM, serão avaliadas em experimentos de validação, que poderão ser úteis em programa para seleção de genótipos com a maturidade buscada pelo melhorista.

Palavras-chave: Variabilidade genética. Perda de umidade. Desequilíbrio de ligação.

ABSTRACT

FRISKE, Élcio. State University of West Paraná, in February 2016. **Genetic diversity and mapping by association in maize inbred lines for grain maturation.** Advisor: Adilson Ricken Schuelter.

The aim of this work was to evaluate the genetic diversity and map genomic regions associated with grains maturation in common corn lineages. The phenotypic attributes of 81 elite inbred lines of corn were assessed in field experiment implanted in square lattice design with three repetitions. The variance and multivariate analysis were carried out considering complete randomized blocks due to its equivalence with the estimation for the lattice efficiency. For the mapping by linkage disequilibrium, 72 elite inbred lines have been genotyped for SNP markers at platform 650K (Affymetrix®) and associated with the genotypic values of the traits related to maturation: number of days for the male flowering (DFM) and female (DFF), and the grain moisture loss, determined by the area below the moisture curve (AACUM). The results of the variance analysis pointed out the existence of genetic diversity in the germplasm for all the assessed traits, detecting a wide variability for DFM, DFF and AACUM. Weak genetic correlations between yield and maturation components indicated the possibility of selection for earliness without compromising the grain yield. The genetic diversity quantified by the distances of Mahalanobis enabled the suggestion of hybrid combinations of higher heterotic effect for earliness and grain yield. There were similarities in the Tocher and UPGMA grouping, which were efficient to classify the genetic variability. By the mixed linear model (MLM) it was possible to detect associations among days for male and female flourishing with SNP markers in all chromosomes, with predominance of chromosomes 1 and 3 and for the loss of moisture in the chromosomes 5 and 6. With of multiple regression analysis of stepwise for DFM, DFF and AACUM, the complete models explained 79%, 93% and 56% of the variation for the genotypic values, respectively, being found predominantly significant markers in the chromosomes 1 and 3. The detection of similar and also different genomic regions for these traits, which are highly correlated, makes possible to raise the hypothesis of the importance of the genetic linkage and pleiotropy to explain the maturation of grains in corn inbred lines. The results obtained are promising and the genomic regions associated with DFM, DFF and AACUM, will be evaluated in validation experiments, which will be useful in selection programs of genotypes with the maturity sought by the breeder.

Keywords: Genetic variability. Grain moisture loss. Linkage disequilibrium.

SÚMARIO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.2.1 Origem e Domesticação da Cultura do Milho	11
1.2.2 Fisiologia da Cultura do Milho com Ênfase ao Ciclo da Cultura	11
1.2.3 Genética e Melhoramento Relacionados à Maturação em Milho	13
1.2.4 Marcadores Moleculares com Ênfase ao Mapeamento por Desequilíbrio de Ligação	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
 CAPÍTULO 1 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO PARA CARACTERES RELACIONADOS À MATURAÇÃO	24
2.1. INTRODUÇÃO	26
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.2.1 Material e Condições de Cultivo	28
2.2.2 Características Avaliadas	28
2.2.3. Análise Estatística	29
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
2.3.1 Análise Univariada	31
2.3.2 Análise Multivariada	40
2.4 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
 CAPÍTULO 2 – MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO DE DIAS PARA O FLORESCIMENTO E PERDA DE UMIDADE DE GRÃOS EM MILHO	49
3.1 INTRODUÇÃO	51
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.2.1 Germoplasma e Condições de Cultivo	53
3.2.2 Fenotipagem e Análise dos Dados	53
3.2.3 Genotipagem	54
3.2.4 Análise da Estrutura Populacional	54
3.2.5 Análise de Associação	55
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.3.1 Análise Fenotípica	56
3.3.2 Análise de Modelo Linear Misto (MLM)	57
3.3.3 Análise de Stepwise	67
3.4 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
 4 CONCLUSÕES GERAIS	76

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.), cereal que apresenta ampla utilização na alimentação humana e animal e derivado útil em diferentes segmentos da indústria (PAES, 2008) é a segunda cultura de maior área plantada no Brasil, totalizando 15,4 milhões de hectares (ha) dos 58,5 milhões de ha cultivados para a safra agrícola de 2015/2016 (CONAB, 2016).

A produção de milho de verão vem diminuindo ano após ano em todo País. Na safra de verão de 2005/2006 a área semeada de milho no Estado do Paraná foi de 1,3 milhões de ha, sendo que após dez anos o cultivo resume-se a 424,6 mil ha (CONAB, 2005; CONAB, 2016). Segundo Camargo e Moraes (2014), a menor expressão do milho de verão encontra-se relacionada à perda de espaço para a cultura da soja, que entre os comparativos dos produtores, relatam que essa oleaginosa possui maior rentabilidade, baixos custos e menores riscos de produção. Já em relação ao cultivo de safrinha, que segundo estimativa da CONAB (2016) haverá um acréscimo de 3,7% em relação aos 9,5 milhões de hectares cultivados em 2015. Essa estimativa e os dados de cultivo de anos anteriores ratificam o estabelecimento da safrinha de milho como a principal safra de cultivo do milho, e empregados híbridos superprecoces para a manutenção de áreas inadequadas para a cultura do milho safrinha, e para a antecipação do ciclo no milho de verão, visando escapar das estiagens comuns nos meses de novembro e dezembro (FRANCO; MARQUES; VIGIDAL FILHO, 2013).

A semeadura do milho safrinha no Oeste do Paraná vinha sendo realizada em meados fevereiro, mas teve modificações que são diretamente relacionadas com o desenvolvimento de variedades de soja mais precoces, possibilitando a antecipação de plantio desse cereal (SEAB/DERAL, 2016). Para os plantios realizados a partir de meados de fevereiro, a cultura de milho se estabelece em condições de elevadas temperaturas no início do desenvolvimento vegetativo, redução de temperaturas noturnas no período da polinização, ocorrência de geadas durante o enchimento de grãos e altos índices pluviométricos na colheita, resultando em perdas substanciais ao produtor (SOUZA, 2013). Nesse contexto, híbridos superprecoces têm sido recomendados preferencialmente para essa época de plantio. Como a área de milho vem sendo empregada predominantemente em sucessão à cultura da soja, o produtor tem a oportunidade de explorar melhor o potencial produtivo pela escolha de híbridos precoces e superprecoces, para abertura e fechamento da janela de plantio, respectivamente (CRUZ et al., 2010). Assim, com a antecipação de plantio da safrinha de milho, a superprecocidade torna-se secundária, podendo-se recomendar híbridos precoces, que em condições edafoclimáticas adequadas apresentam maior capacidade produtiva do que os superprecoces (SHIOGA; GERAGE, 2010).

Pela busca por híbridos de alto valor para o mercado, aliada a necessidade de agilidade e economia de recursos, os programas de melhoramento genético de milho têm realizado trabalhos de caracterização de linhagens, para atributos de importância agrônômica, dentre eles a avaliação para número de dias para o florescimento, perda de umidade dos grãos e produtividade de grãos, fornecendo informações aos melhoristas para a predição de híbridos promissores e com a maturidade exigida pelo mercado (SILVA, 2014; CLOVIS, et al., 2015).

O processo de criação de novos híbridos baseia-se na obtenção e identificação das melhores linhagens e posteriores cruzamentos entre elas, geralmente oriundas de populações distintas, apresentando alta capacidade de combinação (MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1987). Em regiões tropicais, a elevada variabilidade genética do germoplasma tem dificultado a seleção das linhagens elites para precocidade e produtividade, pois são caracteres complexos e negativamente correlacionados (HAULLAUER; CARENA; MIRANDA FILHO, 2010), mas a seleção pode ser realizada de modo indireto com a avaliação de componentes secundários de herança menos complexa (LIMA et al., 2008; BALESTRE et al., 2012; CHAVES, 2013).

Como a produtividade de grãos e outras características de valor econômico para a cultura do milho, como florescimento e perda de umidade são governadas por vários genes e altamente influenciadas pelas condições de cultivo, pesquisas têm sido intensificadas com o intuito de prever os valores genotípicos dos indivíduos para os locos de características quantitativas (*Quantitative Trait Loci* - QTLs) de interesse. Nesse contexto, é fundamental aos programas de melhoramento genético identificar a posição dos genes no genoma e estimar os efeitos gênicos e interações para permitir a seleção genômica (MEYER et al., 2013).

Com o advento de plataformas de genotipagem para os marcadores do polimorfismo de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) a custo acessível e genotipagem em larga escala, tornou-se possível identificar regiões genômicas em plantas por meio do mapeamento por associação, que dispensa emprego de cruzamentos (XU et al., 2009). Nessa estratégia de análise, a base do mapeamento ocorre no desequilíbrio de ligação (DL) da população não relacionada, em que se avalia o DL entre o marcador e o QTL. O mapeamento por associação vem tornando-se uma poderosa ferramenta para a identificação de regiões genômicas relacionados a características genéticas complexas e que pode ser usada para seleção em diferentes populações de melhoramento (YU; BUCKLER, 2006; FRITSCHÉ-NETO et al., 2012).

Assim, o trabalho teve como objetivos avaliar a diversidade genética e mapear regiões genômicas associadas com maturação de grãos em linhagens de milho comum.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Origem e Domesticação da Cultura do Milho

O milho é uma gramínea diploide da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. É taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. spp. *Mays*, para distinguir do seu parente silvestre mais próximo, o teosinto, considerado de mesma espécie e com várias subespécies. Sua origem data entre 7.000 e 10.000 anos atrás no México e na América Central, e sua linha evolutiva é bastante discutida. Várias hipóteses têm sido propostas com o intuito de explicá-la, porém, a teoria mais consistente relaciona a ascendência do milho ao teosinto, gramínea com várias espigas sem sabugo, que pode cruzar naturalmente com o milho, produzindo descendentes férteis (GALINAT, 1995).

A tribo Maydeae diferencia-se pelo monoecismo, com flores unissexuadas, em inflorescências masculinas e femininas separadas na mesma planta. Para o milho esse mecanismo acentuou-se durante a evolução, com maior separação espacial da inflorescência feminina (espiga) e da masculina (pendão), justificando sua classificação alógama, com taxa de autofecundação inferior a 5%, e compreendendo o vento seu principal agente de polinização (MIRANDA FILHO; VIÉGAS, 1987).

1.2.2 Fisiologia da Cultura do Milho com Ênfase ao Ciclo da Cultura

O ciclo de vida da planta de milho pode ser dividido em uma série de estádios fenológicos. Em cada estágio são identificadas mudanças que os caracterizam, controladas por estímulos hormonais e induzidas por fatores ambientais, mas, de modo geral, são consideradas duas fases: vegetativa e reprodutiva (FANCELLI, 2001).

A fase vegetativa (VE) inicia-se com a emergência. Os demais estádios vegetativos são designados numericamente como V1, V2, etc., até V(n), em que “n” representa o último estágio foliar antes do pendoamento (VT) (Figura 1). Cada estágio vegetativo é caracterizado pelo número de folhas completamente expandidas. O estágio VT inicia-se quando o último ramo do pendão está completamente visível e os estilos-estigmas ainda não emergiram. O estágio VT começa, aproximadamente, de dois a três dias antes da emergência do estilo-estigma da boneca. O tempo decorrente entre VT e R1 pode variar consideravelmente, dependendo do genótipo e das condições ambientais. Terminada a fase vegetativa, inicia-se a fase reprodutiva, também dividida em vários estádios, referentes ao desenvolvimento do grão, iniciando com o estágio R1

(florescimento) e encerrando com o R6 (maturação fisiológica) (Figura 1) (FANCELLI, 2001; MAGALHÃES; DURÃES, 2010).

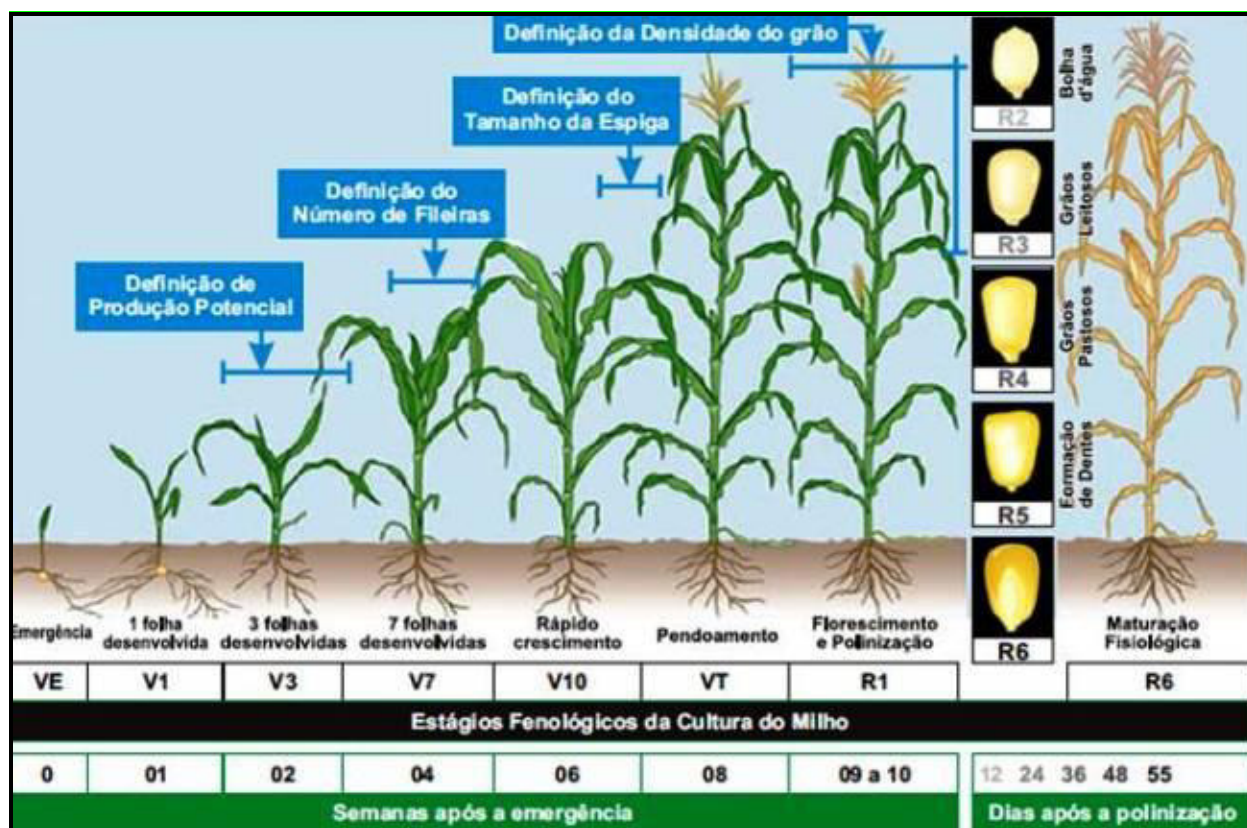


Figura 1 - Estádios de desenvolvimento da cultura do milho. Adaptado de Fancelli (1986).

Por pertencer ao grupo de plantas C4, o milho apresenta taxa fotossintética elevada, respondendo em rendimento ao aumento da intensidade luminosa. A maior sensibilidade à variação de luz ocorre no início da fase reprodutiva, ou seja, nos primeiros 15 dias após o pendoamento (LANDAU; SANS; SANTANA, 2010). A precipitação e radiação também assumem papel de destaque, pois o regime de chuvas determina a disponibilidade de água no solo, afetando indiretamente as taxas de radiação, uma vez que chuvas intensas limitam a radiação solar que chega à superfície. A temperatura também representa um fator limitante, por influenciar vários processos metabólicos, como crescimento do sistema radicular, absorção de água, fotossíntese, respiração e transpiração (BARBANO et al., 2003).

1.2.3 Genética e Melhoramento Relacionados à Maturação em Milho

A existência de caracteres correlacionados pode interferir positivamente ou negativamente a seleção, afetando a identificação de progênes produtivas e precoces (FIORINI et al., 2015). A correlação reflete o grau de associação entre caracteres e seu conhecimento é importante por mostrar como um caractere influencia a expressão de outros (PATERNIANI, 1993). De forma geral, o ciclo do milho encontra-se correlacionada com número de dias para o florescimento (LOPES; GALVÃO; CRUZ, 1995; LIMA et al., 2008; MARCONDES et al., 2015), com a perda de umidade do grão após a maturidade fisiológica (SCHMIDT; HALLAUER, 1966; GUISCEN, J. M. et al., 2002; FIORINI et al., 2015) e com os componentes secundários, como: comprimento de espiga, diâmetro de espiga, diâmetro do sabugo, relação diâmetro espiga/sabugo, relação massa espiga/grãos, número de fileiras de grãos, peso de mil sementes e peso hectolitro (LIMA et al., 2008; BALESTRE et al., 2012; CHAVES, 2013).

Troyer e Brow (1976) trabalharam a precocidade em milho realizando seleção direta entre os genótipos daquela época, que eram na grande maioria classificados como tardios, e entre as hipóteses, acreditavam que a seleção pudesse acarretar queda na produtividade. Ao selecionarem progênes tardias cruzadas com linhagens elites, acabaram promovendo ampliação da variabilidade genética, e com seleção recorrente das mais precoces, perceberam que a produtividade manteve-se a mesma. O milho por ser insensível ao fotoperíodo mantém-se produtivo, mesmo sendo selecionando a partir de materiais tardios (RUSSELL; STUBER, 1985, TROYER; LARKINS, 1985).

Variáveis como altura de planta e área foliar são diretamente influenciados pelo número de dias para o florescimento (CHASE; NANDA, 1967) em que, híbridos de milho com maior estatura e folhas mais extensas, apresentam maior período vegetativo. Tollenaar (1992) recomendou o cultivo de milho em alta densidade de estaturas menores e de folhas curtas e eretas, que possibilitariam incremento da produtividade sem interferir na interceptação solar máxima. Com o intuito de maximizar o rendimento de grãos em regiões de curta estação de crescimento, Almeida et al. (2000) sugeriram o aumento da densidade de plantio de milho precoce como alternativa para maximizar o rendimento de grãos de híbridos resistentes ao acamamento em regiões de curta estação de crescimento sob condições edafoclimáticas favoráveis (PIANA et al., 2008; FARINELLI; CERVEIRA JUNIOR, 2014; FOLONI et al., 2014).

O florescimento em milho é um caractere oligogênico (WARNER, 1952; ROOD; MAJOR, 1981, LOPES; GALVÃO; CRUZ, 1995; LIMA et al., 2008; SHER et al., 2012),

determinado em vários estudos por apresentar distintos tipos e magnitudes para ação gênica: efeito aditivo e dominância parcial (GIESBRECHT, 1960; HALLAUER, 1965), de dominância parcial e sobredominância (ROOD; MAJOR, 1981), e controlado por QTLs de efeito aditivo (KOESTER; SISCO; STUBER, 1993; CHARDON et al., 2004; BUCKLER et al., 2009).

A construção de mapas de consenso com QTL permitiu identificar regiões cromossômicas distribuídos em todo o genoma envolvidos no controle genético da época de floração e características relacionadas. Porém a falta de informações moleculares ainda impede descrição mais completas e compreensão da arquitetura genética para floração em milho (SALVI; CASTELLETTI; TUBEROSA, 2009).

A perda de água do grão no campo é significativamente diferente para cada genótipo durante e após a maturação fisiológica, e também é influenciada pelo ambiente (SCHMIDT; HALLAUER, 1966). O período de perda de água varia mesmo quando as datas de florescimento são similares (TROYER; AMBROSE, 1971). A perda de água está associada a duas fases, antes e após a maturidade fisiológica. A velocidade da perda apresenta comportamento distinto em cada uma delas, sendo lenta na fase de enchimento do grão e mais rápida após a maturidade fisiológica (BROOKING, 1990). Segundo Andrew, Ferweda e Strommem (1956), a associação do ciclo de híbridos de milho avaliado em graus-dias está correlacionada a 98% com a redução do teor de água.

A permanência excessiva do milho no campo após a maturidade fisiológica promove prejuízos decorrentes ao atraso da colheita, favorecendo incidência de doenças e gerando quebras de produtividade (BORBA; ANDRADE; OLIVEIRA, 1994; MAGARI, KANG, ZHANG, 1996). A perda de água também está correlacionada significativamente com outras características morfoagronômicas do milho (PURDY; CRANE, 1967; TROYER; AMBROSE, 1971; GUISCHEM et al., 2002). Espigas com empalhamento curto (TROYER; AMBROSE, 1971) e frouxas (CRANE; MILES; NEWMAN, 1959) favorecem rápida secagem dos grãos. Espigas com sabugos mais curtos e diâmetros menores também apresentam maior velocidade da perda de água (PURDY; CRANE, 1967; CROSS; CHYLE JÚNIOR; HAMMOND, 1987).

1.2.4 Marcadores Moleculares com Ênfase ao Mapeamento por Desequilíbrio de Ligação

Os marcadores moleculares têm sido utilizados pelos melhoristas com finalidade de avaliar a diversidade genética entre germoplasma, apresentando algumas vantagens em relação aos outros métodos, pois além de aumentarem a capacidade de detecção de polimorfismo, sem interação ambiental, podem ser avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento; sendo utilizados na estimação de diversidade genética, identificação de grupos heteróticos, classificação de germoplasma, identificação de genitores, pureza genética, seleção assistida e outros (PEREIRA; PEREIRA, 2006, GUIMARÃES et al., 2006, SCHUSTER et al., 2006; FERNANDES, 2010).

Existe, atualmente, um grande número de marcadores moleculares. Cada tipo de marcador apresenta vantagens e desvantagens e a utilização de um ou outro vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013).

Os marcadores SNPs são utilizados para identificar mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo, ou seja, mudança de uma única base em posição específica do genoma. Os SNPs podem ser classificados de acordo com o tipo de variação do nucleotídeo sendo transição ou transversões. Na sua utilização é necessário informações de sequenciamento do DNA para o desenho de primers e sondas específicas, a expressão genética mostra a sequência de nucleotídeos. Os marcadores SNPs podem ser utilizados na construção de mapas genéticos de alta resolução, no mapeamento de características de interesse, na seleção assistida por marcadores, nos estudos genéticos análise de estrutura populacional, na análise filogenética e no mapeamento associativo com base no desequilíbrio de ligação (FALEIRO, 2011).

Os SNPs e pequenas inserções e deleções representam a forma mais frequente de variação genética natural na maioria dos organismos e têm sido usados como nova geração de marcadores moleculares. Os marcadores SNPs são geralmente bialélicos, ou seja, apresentam dois alelos por loco, e por isso são menos informativos que os *Simple Sequence Repeats* (SSRs), que geralmente são multialélicos (vários alelos por loco). Essa desvantagem é compensada pela abundância e capacidade dos SNPs a serem usados em genotipagem em larga escala, pois ao contrário dos SSRs, os SNPs não se limitam apenas aos genes conhecidos. A distribuição e frequência no genoma e a automação dos dados conferem outras vantagens desse tipo de

marcador, que favorecem os estudos de seleção genômica ampla (CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM; 2013).

Em análises moleculares com a cultura do milho, os microssatélites e os SNPs estão entre as técnicas mais informativas, pela disponibilidade de dados e por conterem *primers* já desenvolvidos para amplificação, facilitando a exploração do seu genoma (TOMÉ, 2009; LANES et al., 2014).

A utilização de marcadores moleculares fundamenta-se na ligação gênica entre marcadores e locos que governam as características quantitativas de interesse. Todo QTL é na verdade uma associação genética-estatística entre uma região do genoma e um caractere, que possibilita a determinação do efeito da interação QTL por ambiente, da ocorrência de efeitos pleiotrópicos e/ou de ligação gênica (RESENDE; SILVA; RESENDE JÚNIOR, 2013).

A construção de mapas genéticos detalhados com alto nível de cobertura do genoma possuem inúmeras finalidades ao melhoramento de plantas, tais como: cobertura e análise do genoma, mapeamento comparativo entre as diferentes espécies para avaliar a semelhança entre os genes na expressão de um fenótipo, predição de descendências de cruzamentos controlados, decomposição de caracteres complexos em seus componentes mendelianos e identificação de marcas relacionadas com regiões-chave do genoma para a expressão QTLs (MOULIN, 2013).

Mapear uma população é gerar um conjunto ordenado de informações sobre as sequências do DNA que cobrem a totalidade ou parte do genoma, detalhando a distância entre genes e grupos de ligações genéticas. A técnica de mapeamento genético, que foi desenvolvida e aplicada em populações segregantes, cruzamentos testes e duplo-haploides, é utilizada para identificar regiões genotípicas associadas com caracteres de interesse por meio de cruzamentos (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997). Porém a sua utilização para fins de melhoramento tem sido limitada aos genitores envolvidos na população de mapeamento (CRUZ et al., 2013).

Com o advento de plataformas de genotipagem para os marcadores SNPs com custo acessível e genotipagem em larga escala, tornou-se possível a identificação de regiões genômicas em plantas por meio do mapeamento por associação (XU et al., 2009), que dispensa o emprego de cruzamentos, conferindo a principal vantagem do mapeamento por associação em relação ao mapeamento por ligação gênica, utilizando populações naturais ao invés de populações derivadas de cruzamentos e que potencialmente possuem maior número de alelos por loco (FLINT-GARCIA et al., 2005).

Como desvantagem, a técnica apenas identifica efeitos fenotípicos de alelos com frequência razoavelmente alta na população. Nessa estratégia de análise, a base do mapeamento ocorre no desequilíbrio de ligação (DL) da população não relacionada, em que se avalia estatisticamente o DL entre o marcador e o QTL, que são variações geradas por mutações e ampliadas por recombinações durante a evolução das espécies. (RESENDE JÚNIOR et al., 2013).

A eficiência do mapeamento associativo é significativamente influenciada pela estrutura da população, o que pode gerar associações espúrias, isto é, entre marcador e QTL não ligados (SORKHEH et al., 2008), mas a escolha da população de mapeamento pelo melhorista com ampla variabilidade genética contorna esse efeito (FRITSCHÉ-NETO et al., 2012).

Estatisticamente, o mapeamento por associação considera a diferença entre as probabilidades das frequências gaméticas observadas e esperadas sob equilíbrio de ligação gênica (D), identificando a frequência dos gametas para cada loco. Por ser dependente das frequências dos alelos individuais, o cálculo de D não é suficiente para análises de múltiplos pares em todo genoma, em que se utiliza o quadrado da correlação (r^2) entre os valores de alelos de dois locos. O r^2 permite medir a proporção da variação causada por alelos do QTL que é explicada pelos marcadores (MEUWISSEN, 2007).

A estratégia da genética de associação no melhoramento de plantas foi proposta inicialmente por Bernardo e Yu (2007) para a cultura do milho, que verificaram eficiência de até 43% na seleção para características quantitativas comparado com a técnica pioneira de seleção assistida, além da economia de recursos por minimização das atividades de fenotipagem. O genoma de milho tropical foi comparado com o de origem temperado quanto à queda de DL, com 447 linhagens genotipadas com 1943 marcadores SNPs, e identificaram que o milho tropical possui uma rápida queda do DL, o que fornece maiores possibilidades para a seleção (LU et al., 2011). A análise por DL tem sido efetiva em germoplasma de milho, e pode ser empregada dentro de programas de melhoramento genético para maior número e precisão de informações para seleção (BERNARDO; YU, 2007; XU et al., 2009; LU et al., 2011; FRITSCHÉ-NETO et al., 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. I.; MEROTTO JÚNIOR, A.; SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A. F. Incremento da densidade de plantas: uma alternativa para aumentar o rendimento de grãos de milho de regiões de curta estação estival de crescimento agronômicas do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 23-29, 2000.
- ANDREW, R. H; FERWEDA, F. P.; STROMMEM, A. M. Maturation and yield of corns as influencend by climate and production technique. **Agronomy Journal**, Maidson, v. 48, p. 231-236, 1956.
- BALESTRE, M.; VON PINHO, R. G.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; BUENO FILHO, J. S. S. Bayesian mapping of multiple traits in maize: the importance of pleiotropic effects in studying the inheritance of quantitative traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 125, n. 3, p. 479-493, 2012.
- BARBANO, M. T.; SAWAZAKI, E.; BRUNINI, O.; GALLO, P. B.; PAULO, E. M. Temperatura base e soma térmica para cultivares de milho de pipoca (*Zea mays* L.) no sub-período emergência florescimento masculino. **Revista Brasileira de Agrometereologia**, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 79-84, 2003.
- BERED, F; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.
- BERNARDO, R.; YU, J. M. Prospects for genome wide selection for quantitative traits in maize. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 1082-1090, 2007.
- BORBA, C. S.; ANDRADE, R. V.; OLIVEIRA, A. C. Maturidade fisiológica de sementes de híbrido simples BR 203 de milho (*Zea mays*, L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 63-67, 1994.
- BROOKING, I. R. Mayze ear moisture during grain-filling, and its relation to physiological maturity and graindrying. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 23, p. 55-68, 1990.
- BUCKLER, E. S.; HOLLAND, J. B.; BRADBURY, P. J; ACHARYA, C. B.; BROWN, P. J.; BROWNE, C.; ERSOZ, E.; FLINT-GARCIA, S.; GARCIA, A.; GLAUBITZ, J. C.; GOODMAN, M. M.; HARJES, C.; GUILL, K.; KROON, D. E.; LARSSON, S.; LEPAK, N. K.; LI, H.; MITCHELL, S. E.; PRESSOIR, G.; PEIFFER, J. A.; ROSAS, M. O.; ROCHEFORD, T. R.; ROMAY, M. C.; ROMERO, S.; SALVO, S.; VILLEDIA, H. S.; SILVA, S.; SUN, Q.; TIAN, F.; UPADYAYULA, N.; WARE, D.; YATES, H.; YU, J.; ZHANG, Z.; KRESOVICH, S.; MCMULLEN, M. D. The genetic architecture of maize flowering time. **Science**, Washington, v. 325, p. 714-718, 2009.
- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Biotechnology aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. cap. 2. p. 31-68.
- CAMARGO, T. V.; MORAES, M. C. Sistema integrado de soja precoce e milho safrinha. **Informativo Pioneer**. Santa Cruz do Sul, RS, 2014. Disponível em: < <http://www.pioneer>

sementes.com.br/soja/central-de-informacoes/artigos/170/sistema-integrado-de-soja-precoce-e-milho-safrinha>. Acesso em: 05 de fev. 2016.

CHARDON, F.; VIRLON, B.; MOREAU, L.; FALQUE, M.; JOETS, J.; DECOUSSET, L.; MURIGNEUX, A.; CHARCOSSET, A. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and syntenic conservation with the rice genome. **Genetics**, Baltimore, v. 168, p. 2169-2185, 2004.

CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Number of leaves and maturity classification in *Zea mays* L. **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 5, p. 431-432, 1967.

CHAVES, L. G. **Mapeamento e congruência de QTLs para teor de óleo, produção de grãos e seus componentes em milho**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.

CLOVIS, L. R.; SCAPIM, C. A.; PINTO, R. J. B.; BOLSON, E. SENHORINHO, H. J. C. Avaliação de linhagens S3 de milho por meio de testadores adaptados à safrinha. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 109-120, 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2005. **Primeiro levantamento de intenção de plantio**. Brasília. 2005. p. 27-29.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília. 2016. 178 p.

CRANE, P. L.; MILES, S. R.; NEWMAN, J. E. Factors associated with varietal differences in rate of field drying in corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 51, n. 2, p. 318-321, 1959.

CROSS, H. Z.; CHYLE JÚNIOR, J. R.; HAMMOND, J. J. Divergent selection for ear moisture in early maize. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 5, p. 914-918, 1987.

CRUZ, E. M.; CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; TOMÉ, L. G. O. Análise genômica. In: CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; BHERING, L. L. (Eds.). **Genômica aplicada**. Viçosa, UFV, 2013, cap. 1, p. 1-30.

CRUZ, J. C.; SILVA, G. H.; PEREIRA FILHO, I. A.; GONTIJO NETO, M. M.; MAGALHÃES, P. C. Caracterização do cultivo de milho safrinha de alta produtividade em 2008 e 2009. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 9, n. 2, p. 177-188, 2010.

FALEIRO, F. G. Princípio científico e análises genéticas utilizando marcadores moleculares. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Eds.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. cap 2, p. 31-54.

FANCELLI, A. L. **Plantas alimentícias: guia de aula, estudos e discussão**. Centro acadêmico “Luiz de Queiroz”. ESALQ/USP, 1986, 131 p.

FANCELLI, A. L. Fisiologia das plantas de milho em condições de safrinha. In: Seminário nacional de milho safrinha, 6, 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 11-31.

FARINELLI, R.; CERVEIRA JUNIOR, W. R. Resposta de cultivares de milho transgênico e convencional a densidades populacionais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 13, n. 3, p. 336-346, 2014.

FERNANDES, E. H. **Análise de diversidade genética por marcadores moleculares microssatélites entre linhagens elite de milho e associação com a heterose**. 2010. 62 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

FIORINI, F. V. A.; PINHO, R. G. V.; CAMARGOS, R. B.; SANTOS, A. O.; FIORINI, I. V. A. Relação entre perda de água dos grãos e características agronômicas de híbridos de milho. **Revista Brasileira de Sorgo e Milho**, Sete Lagoas, v. 14, n. 1, p. 88-100, 2015.

FLINT-GARCIA, S. A.; THUILLET, A. C.; YU, J.; PRESSOIR, G.; ROMERO, S. M.; MITCHELL, S. E.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M. M.; BUCKLER, E. S. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. **The Plant Journal**, London, v. 44, n. 1, p. 1054-1064. 2005.

FOLONI, J. S. S.; CALONEGO, J. C.; CATUCHI, T. A.; BELLEGGIA, N. A.; TIRITAN, C. S.; BARBOSA, A. M. Cultivares de milho em diferentes populações de plantas com espaçamento reduzido na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.13, n.3, p. 312-325, 2014.

FRANCO, A. A. N.; MARQUES, O. J.; VIGIDAL-FILHO, P. S. Sistemas de produção do milho safrinha no Paraná 2014. In: Seminário nacional de milho safrinha, 12, 2013, Dourados. **Anais...** Dourados: UFGD, 2013, p. 01-33. (Palestra).

FRITSCHÉ-NETO, R.; RESENDE, M. D. V.; MIRANDA, G. V.; VALE, J. C. Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 6, p. 794-802, 2012.

GALINAT, W.C. The origin of maize: grain of humanity. **New York Botanical Garden Journal**, New York, v. 44, p. 03-12, 1995.

GIESBRECHT, J. The inheritance of maturity in maize. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 9, n. 3, p. 675-677, 1960.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: BORÉM, A., CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006, 374 p.

GUISCHEM, J. M.; BICUDO, S. J.; NAKAGAWA, J.; ZANOTTO, M. D.; SANSÍGOLO, C.; ZUCARELLI, C.; MATEUS, G. P. Características morfológicas e fisiológicas do milho que influenciam a perda de água do grão. **Revista Brasileira de Sorgo e Milho**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 28-37, 2002.

HALLAUER, A. R. Inheritance of flowering in maize. **Genetics**, Baltimore, v. 52, n. 1, p. 129-137, 1965.

HAULLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 2010. 486 p.

KOESTER, R. P.; SISCO, P. H.; STUBER, C. W. Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenics lines of maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1209-1216, 1993.

LANDAU, E. C.; SANS, L. M. A.; SANTANA, D. P. **Clima e solo**. In: CRUZ, J. C. (Ed). Cultivo do milho. 2010. (Manual Técnico).

LANES, E. C.; VIANA, J. M.; PAES, G. P.; PAULA, M. F.; MAIA, C.; CAIXETA, E. T.; MIRANDA, G. V. Population structure and genetic diversity of maize inbreds derived from tropical hybrids. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 7365-7376, 2014.

LIMA, J. L.; SOUZA, J. C.; MACHADO, J. C.; RAMALHO, M. A. P. Controle genético da exigência térmica para o início do florescimento em milho. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 127-131, 2008.

LOPES, U. V.; GALVÃO, J. D.; CRUZ, C. D. Inheritance of the flowering time in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 10, p.1267-1271, 1995.

LU, Y.; SHAH, T.; HAO, Z.; TABA, S.; ZHANG, S.; GAO, S.; LIU, J.; CAO, M.; WANG, J.; PRAKASH, A. B.; RONG, T.; XU, Y. Comparative snp and haplotype analysis reveals a higher genetic diversity and rapider ld decay in tropical than temperate germplasm in maize. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. 24861, 2005.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Ecofisiologia**. In: CRUZ, J. C. (Ed). Cultivo do milho. 2010. (Manual Técnico).

MAGARI, R.; KANG, M. S.; ZHANG, Y. Sample size for evaluation field ear moisture loss rate in mayze. **Maydica**, Bergamo, v. 41, n. 1, p. 19-24, 1996.

MARCONDES, M. M.; FARIA, M. V.; MENDES, M. C.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, J. F.; CAVALLIN, I.; WALTER, A. L. B. Desempenho agrônômico de linhagens S4 de milho em cruzamentos top crosses. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 14, n. 1, p. 145-154, 2015.

MEUWISSEN, T. H. E. Genomic selection: maker assisted selection on genome-wide scale. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Malden, v. 124, p. 321-322, 2007.

MEYER, A. S.; LEANDRO, R. A.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; SOUZA, A. P. Uma abordagem bayesiana para mapear QTL e detectar efeitos epistáticos em uma população de milho. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 31, n. 4, p.558-581, 2013.

MIRANDA FILHO, J. B., VIÉGAS, G. P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Eds). **Melhoramento e produção de milho**. v. 1, Campinas: Fundação Cargil, 1987. cap. 7, p. 277-340.

MOULIN, M. M. **Construção de mapa genético, identificação de QTLs associados a caracteres agrônômicos e detecção de inibidores de proteases em *Capsicum baccatum* var.**

pendulum. 2013. 142 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes, 2013.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. (Eds.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e sorgo, 2008. cap 2. p. 47-61.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (Eds.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação brasileira para pesquisa do potássio e do fosfato, 1993. v. 1, cap. 3, p. 23-42.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S. Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006, p. 85-106.

PIANA, A. T.; SILVA, P. R. F.; BREDEMEIER, C.; SANGOI, L.; VIEIRA, V. M.; SERPA, M. S.; JANDREY, D. B. Densidade de plantas de milho híbrido em semeadura precoce no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2608-2612, 2008.

PURDY, J. L.; CRANE, P. L. Inheritance of drying rate in “mature” corn (*Zea mays*, L.). **Crop Science**. Madison, v. 7, n. 1, p. 294-297, 1967.

RESENDE JÚNIOR, M. F. R. ALVES, A. A.; SÁNCHEZ, C. F. B.; RESENDE, M. D. V.; CRUZ, C. D. **Seleção genômica ampla**. In: CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; BHERING, L. L. (Eds.). **Genômica aplicada**. Viçosa, UFV, 2013, cap. 10, p. 375-424.

RESENDE, M. D. V.; SILVA, F. F.; RESENDE JÚNIOR, M. F. R. Genética de associação. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013, cap. 4, p. 119-150.

ROOD, S. B.; MAJOR, D. J. Inheritance of tillering and flowering-time in early maturing maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 30, p. 327-334, 1981.

RUSSELL, W. K.; STUBER, C. W. Genotype x photoperiod and genotype x temperature interactions for maturity in maize. **Crop Science**, Madison, v. 25, p.152-158, 1985.

SALVI, S.; CASTELLETTI, S.; TUBEROSA, R. An updated consensus map flowering time QTLs in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 54, p. 501-512, 2009.

SCHMIDT, J. L.; HALLAUER, A. R. Estimating harvest date of corn in the field. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 3, p. 227-231, 1966.

SCHUSTER, I.; VIEIRA, E. S. N.; PADILHA, L. **Marcadores moleculares no pós-melhoramento**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006, p. 205-230.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ. DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (SEAB/DERAL) **Situação das lavouras de**

culturas selecionadas. 2016. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/qas/uploads/4833/plantio_colheita.pdf > Acesso em: 13 de fev. 2016.

SHER, H.; IQBAL, M.; KHAN, K.; YASIR, M.; RAHMAN, H. Genetic analysis of maturity and flowering characteristics in maize (*Zea mays* L.). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapura, v. 2, n. 8, p. 621-626, 2012.

SHIOGA, P. S.; GERAGE, A. C. Influência da época de plantio no desempenho do milho safrinha no estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 3, p. 236-253, 2010.

SILVA, T. N. **Caracterização agronômica e morfológica de populações de milho.** 2014. 38 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

SORKHEH, K.; MALYSHEVA-OTTO, L. V.; WIRTHENSOHN, M. G.; TARKESH-ESFAHANI, S.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Linkage disequilibrium, genetic association mapping and gene localization in crop plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 4, p. 805-814, 2008.

SOUZA, T. C. Parâmetros fisiológicos em milho safrinha. In: Seminário nacional de milho safrinha, 12, 2013, Dourados. **Anais...** Dourados: UFGD, 2013, p. 01-18. (Palestra).

TOLLENAAR, M. Is low plant density a stress in mayze? **Maydica**, Bergamo, v. 37, p. 305-311, 1992.

TOMÉ, L. G. O. **Análises biométricas e mapeamento de QTLs para tolerância à seca em milho.** 2009. 148 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

TROYER, A. F.; AMBROSE, W. B. Plant characteristics affecting field drying rate of ear corn. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 529-531, 1971.

TROYER, A. F.; BROW, W. L. Selection for early flowering in corn: seven late synthetics. **Crop Science**, Madison, v. 16, p. 767-772, 1976.

TROYER, A. F.; LARKINS, J. R. Selection for early flowering in corn: 10 late synthetics. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 695-697, 1985.

WARNER, J. N. A method of estimating heritability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 427-430, 1952.

XU, Y.; SKINNER, D. J.; WU, H.; PALACIOS-ROJAS, N.; ARAUS, J. L.; YAN, J.; GAO, S.; WARBURTON, M. L.; CROUCH, J. H. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. **International Journal of Plant Genomics**, Philadelphia, v. 2009, p. 1-30, 2009.

YU, J. M.; BUCKLER, E. S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, Leiden, v. 17, p. 155-160, 2006.

CAPÍTULO 1 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO PARA CARACTERES RELACIONADOS À MATURAÇÃO

RESUMO

Dentre os atributos fenotípicos mais importantes na cultura do milho, e que vem sendo usados como parâmetro para a escolha dos híbridos, está a produtividade associada com maturação dos grãos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética associada com maturação de grãos em linhagens elites de milho. Os atributos fenotípicos de 81 linhagens elites foram avaliados em experimento de campo implantado em delineamento de látice quadrado com três repetições. Procedeu-se a análise de variância e multivariada considerando blocos completos casualizados devido a sua equivalência com a estimação para eficiência do látice. Os resultados da análise de variância indicam a existência de diversidade genética no germoplasma para todos os caracteres avaliados, detectando-se ampla variabilidade para número de dias para o florescimento masculino (DFM) e feminino (DFF), e perda de umidade dos grãos, determinada pela área abaixo da curva de umidade (AACUM). A elevada magnitude para correlação genética entre AACUM e umidade de grãos coletados em diferentes momentos do estágio R6, torna viável sugerir a sua substituição pela avaliação do teor de umidade em uma única coleta. As correlações genéticas fracas entre os componentes de rendimento e de maturação evidenciam a possibilidade de seleção para precocidade sem comprometer a produtividade. Além do que, os resultados dos métodos de otimização de Tocher e de UPGMA foram concordantes, permitindo classificar o germoplasma, e sugerir combinações híbridas entre linhagens dos grupos I e II, que apresentam maior efeito heterótico para produtividade associadas com precocidade.

Palavras-chave: Variabilidade genética. Perda de umidade. Florescimento. Precocidade. Produtividade.

ABSTRACT

Among the more important phenotypic attributes in the corn crop and that are being used as a parameter to the hybrids choice, is the yield associated with grains maturation. This work aimed to evaluate the genetic diversity associated with grains maturity in corn inbred lines. The phenotypic attributes of 81 inbreds were assessed in field experiment implanted in square lattice design with three repetitions. The variance and multivariate analysis were carried out considering complete randomized blocks due to its equivalence with the estimation for the lattice efficiency. The results of the variance analysis pointed out the existence of genetic diversity in the germplasm for all the traits, detecting a wide variability for number of days for the male flowering (DFM) and female (DFF), and the moisture loss of grains, determined by the area below the moisture curve (AACUM). The extensive magnitude for the genetic correlation between AACUM and moisture of grains collected at different moments of R6 stage, make it viable to suggest its substitution for the moisture content evaluation in just one collection. Weak genetic correlations between yield and maturation components indicated the possibility of selection for earliness without compromising the yield. In addition to this, the results of Tocher optimization methods and UPGMA were similar, enabling the classification of the germplasm and the suggestion of hybrid combinations among inbreds of groups I and II, which presented higher heterotic effect for yield associated with earliness.

Keywords: Genetic variability. Grain moisture loss. Flowering. Earliness. Yield.

2.1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é a segunda cultura de maior área plantada no Brasil após a cultura da soja, que ocupa 56% dos 58,5 milhões de ha cultivados (CONAB, 2016). Na progressão dos últimos dez anos, a semeadura do milho verão perdeu espaço gradativamente para a cultura da soja, onde no Estado do Paraná a área semeada que já foi de 1,3 milhões de ha resume-se a 425 mil ha (CONAB 2005; CONAB 2016). Entre as justificativas, dos produtores estão a maior rentabilidade, baixos custos e menores riscos de produção da oleaginosa (CAMARGO; MORAES, 2014).

No entanto, o milho cultivado na segunda safra, cresceu de 711,9 mil ha para 2,0 milhões de ha nesse mesmo período (CONAB 2005; CONAB 2016). Mudança de cenário que estabeleceu a safrinha como a principal safra de cultivo do milho (SOUZA, 2013). A manutenção de áreas inadequadas para a cultura do milho safrinha, e o plantio antecipado visando escapar das estiagens comuns nos meses de novembro e dezembro nos cultivos de verão, justificam o investimento em híbridos precoces e superprecoces de alto valor (FRANCO; MARQUES; VIGIDAL-FILHO, 2013).

Na busca por híbridos de alto valor para o mercado, aliada a necessidade de agilidade e economia de recursos, os programas de melhoramento genético de milho têm realizado trabalhos de caracterização de linhagens, para atributos de importância agrônômica, dentre eles a avaliação para produtividade de grãos, o número de dias para o florescimento e perda de umidade dos grãos, que fornecem informações aos melhoristas para a predição de híbridos promissores e com a maturidade exigida pelo mercado (SILVA, 2014; CLOVIS et al., 2015).

O controle genético envolvido na determinação do número de dias para o florescimento em milho foi investigado em vários estudos, detectando-se diferentes magnitudes e tipos de ação gênica envolvidos na expressão desse caractere (WARNER, 1952; ROOD; MAJOR, 1981, LOPES; GALVÃO; CRUZ, 1995; LIMA et al., 2008). Pela análise de QTLs relacionados ao florescimento em mapa consenso em milho, foram identificadas regiões genômicas distribuídos em todos os grupos de ligação (KOESTER; SISCO; STUBER, 1993; CHARDON et al., 2004; BUCKLER et al., 2009; SHER et al., 2012). Esses resultados discrepantes podem ser justificados pela elevada influência das condições de ambiente para determinação desse caractere, aliada ao emprego de germoplasma e metodologias genético-estatísticas distintas.

A perda de água do grão no campo é significativamente diferente para cada genótipo durante e após a maturação fisiológica, e também é muito influenciada pelo ambiente (SCHMIDT; HALLAUER, 1966), dependente da constituição genotípica, mesmo quando as

datas de florescimento são similares (TROYER; AMBROSE, 1971). A perda de água está associada a duas fases, antes e após a maturidade fisiológica. A velocidade da perda apresenta comportamento distinto em cada uma delas, sendo lenta na fase de enchimento do grão e mais rápida após a maturidade fisiológica (BROOKING, 1990).

Segundo Andrew, Ferweda e Strommem (1956), a correlação do ciclo de híbridos de milho avaliado em graus-dias está correlacionada a 98% com a redução do teor de água. Outros componentes morfoagronômicos do milho, de herança menos complexa, tais como diâmetro da espiga, diâmetro do sabugo, comprimento da espiga, comprimento do pedúnculo e número de fileiras também influenciam a perda de água, e sua avaliação auxilia a seleção de genótipos de modo indireto (PURDY; CRANE, 1967; GUISCHEM et al., 2002; LIMA et al., 2008; CHAVES, 2013).

Em regiões tropicais, a elevada variabilidade genética do germoplasma tem dificultado a seleção das linhagens elites para precocidade e produtividade, pois são caracteres complexos e correlacionados negativamente (HAULLAUER; CARENA; MIRANDA FILHO, 2010). Realizar a identificação de materiais com rápido florescimento e rápida perda de umidade sem que ocorra redução da produtividade; conferem os maiores desafios dos programas de melhoramento genético (SOUZA, 2013).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a existência de variabilidade genética no florescimento e na maturação de grãos em linhagens de milho comum.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material e Condições de Cultivo

O ensaio foi implantado em condições de campo na estação experimental da COODETEC (24°53'8.54"S; 53°32'4.72"W; 678 m de altitude), no município de Cascavel, na safra de verão 2014/15. As 81 linhagens de milho comum foram distribuídas empregando-se o delineamento de látice quadrado (9 x 9) com três repetições, totalizando 243 parcelas. A unidade experimental foi constituída de quatro linhas de quatro metros, com 20 plantas/rua e o espaçamento entre linhas foi de 0,76 m. Os tratos culturais foram efetuados conforme as recomendações da cultura (EMBRAPA, 2010).

2.2.2 Características Avaliadas

O número de dias para florescimento feminino (DFF) e masculino (DFM) foi determinado no estágio R1 em parcela total, aferindo-se a data quando 50% + uma das plantas estavam com emissão de pólen e estilos-estigmas expostos.

As coletas das espigas para a determinação do teor de umidade iniciaram-se no momento que as linhagens mais precoces atingiram o estágio R6 (maturação fisiológica) e apresentavam em torno de 30% de umidade. Três espigas foram amostradas aleatoriamente nas observações, com umidade estabelecida em determinador de umidade automático tipo 999 ES Motomco®, com dial máximo de 35,8%. As espigas foram coletas sem desprendimento da palha, colocadas em sacos plásticos de rede “tipo cebola”, etiquetadas e transportadas rapidamente a um ambiente protegido, para aferição da umidade. No total, sete coletas foram realizadas em intervalos de quatro dias, totalizando 28 dias de anotações para umidade de grãos. Os percentuais de umidade dos grãos para as sete amostragens realizadas foram tabuladas em gráfico visando estimar a área abaixo da curva de umidade (AACUM) empregando-se metodologia descrita por Shaner e Finney (1977).

Como as diferentes linhagens apresentavam considerável variação no percentual de umidade de grãos, efetuou-se a colheita de todos os tratamentos quando as mais tardias atingiram 22%. Assim, todas as parcelas foram colhidas e submetidas à secagem artificial em câmara de ar forçado a 60 °C por 72 horas, para obtenção da umidade ideal de armazenamento de 13% e avaliadas empregando-se metodologia descrita pelo MAPA (2009): peso de mil grãos (PMG), em gramas (g); peso hectolitro (HL), em g; massa de grãos (MG), em g; relação massa da espiga/grãos (RMEG); diâmetro da espiga (DE), em milímetros (mm); diâmetro do sabugo (DS),

em mm; relação diâmetro espiga/sabugo (RDES); comprimento da espiga (CE), em cm; e número de fileiras (NF) em número médio de fileiras por espiga. Para os caracteres RMEG, DE, DS, RDES, CE, e NF, realizaram-se 10 observações/parcela, e posteriormente obteve-se a média aritmética.

2.2.3. Análise Estatística

Inicialmente os dados do experimento foram submetidos à verificação de assimetria, curtose e distribuição normal dos dados pelo teste de Lilliefors, e de homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Como todos os dados para os caracteres avaliados atenderam as pressuposições da análise de variância, empregou-se o modelo estatístico do látice (COCHRAN; COX, 1966). A eficiência do látice foi estimada para todos os caracteres, com variação 95,8 a 109,2%, sendo inferior ao limite de 120%, e permitindo realizar a análise de variância com modelo estatístico para experimentos conduzidos em blocos casualizados (MORAES et al., 1988; GOMES; GARCIA, 1991).

Após a definição do modelo e a realização da análise de variância, estimou-se os parâmetros genéticos e de ambiente, o coeficiente de variação (CV), coeficiente de variação genético (CVg) e a herdabilidade, e efetuou-se o agrupamento das médias das linhagens em grupos homogêneos, aplicando-se o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

As correlações genéticas e fenotípicas foram estimadas para identificar o grau de associações entre eles. A correlação linear (r) entre duas variáveis aleatórias X e Y é dada pela expressão:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \quad (1)$$

Em que $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$ refere-se a covariância de X e Y, e $\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \right]}$ = a variância de X e Y (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Com o intuito de identificar a linha de tendência das linhagens entre o número de dias para o florescimento masculino (DFM), feminino (DFF) e para área abaixo da curva de umidade (AACUM), as médias foram submetidas ao estudo de regressão polinomial, que determinou qual dos polinômios (1º, 2º ou 3º grau) explicou satisfatoriamente a relação entre as linhagens e os

caracteres. Utilizou-se o teste F para verificar a significância dos efeitos polinomiais, escolhendo-se o modelo de maior grau (GOMES, 1990; CRUZ; REGAZZI, 1997).

A utilização de estatística univariada e análise de correlações podem disponibilizar informações insuficientes, sendo que o emprego de estratégias multivariadas, como os métodos de agrupamento de Tocher e de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), fornecem informações complementares aos pesquisadores.

Para esse fim, foi estimada inicialmente a distância generalizada de Mahalanobis, que leva em consideração as correlações residuais entre as variáveis analisadas. A partir da observação Y_{ijk} referente à j-ésima característica, na i-ésima linhagem e na k-ésima repetição, são estimadas as médias X_{ij} ($= X_{ij}/r$) e a matriz $n \times n$ de dispersão residual entre os caracteres, ou matriz de variâncias e covariâncias residuais (ψ). Considerando que d_j representa a diferença entre médias de duas linhagens (i e i') para uma dada característica j , a distância generalizada de Mahalanobis (D^2) é dada por: $D^2_{ii'} = \delta' \psi^{-1} \delta$, em que $\delta' = d_j$. Com as distâncias de Mahalanobis estimadas para os pares de linhagens avaliadas, submeteu-se a análise multivariada, empregando-se o método de otimização de Tocher e do UPGMA (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

A importância relativa dos caracteres em relação à divergência genética entre as variáveis foi estudada segundo Singh (1981), com eliminação do caractere relação diâmetro espiga/sabugo (RDES) de menor contribuição à divergência entre as linhagens.

Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise Univariada

Pelos resultados da Tabela 1, observou-se diferenças significativas entre as médias das linhagens de milho no nível de 1% de probabilidade pelo teste F, em todos os caracteres avaliados. Esse fato indica que pelo menos uma linhagem difere significativamente das demais e evidenciando a existência de variabilidade genética. Observou-se também alta precisão do ensaio, revelado pelos baixos coeficientes de variação para todos os caracteres, com exceção do caráter PMG ($4,5 < CV \leq 11\%$) considerado médio (SCAPIM; CARVALHO; CRUZ, 1995).

Tabela 1 - Análise de variância para 12 caracteres avaliados em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

FV	GL	Quadrados médios					
		AACUM	DFM	DFF	MG	PMG	HL
Blocos	2	1492,44	0,10	1,66	442,94	946,59	27,58
Genótipos	80	13100,95**	36,71**	57,04**	1101,31**	4778,47**	167,18**
Resíduo	160	371,55	0,90	1,21	69,10	162,08	14,80
Média		836,03	68,24	69,42	93,96	275,15	192,83
CV (%)		2,31	1,39	1,59	8,85	4,63	2,00
CVg (%)		7,79	5,06	6,21	19,74	14,26	3,70
CVg/CV		3,38	3,64	3,92	2,23	3,08	1,85
h ²		0,97	0,97	0,97	0,93	0,96	0,91

FV	GL	Quadrados médios					
		RMGE	DE	DS	RDES	NF	CE
Blocos	2	0,004	3,11	1,24	0,001	0,65	2,46
Genótipos	80	0,005**	36,48**	19,56**	0,02**	8,94**	7,26**
Resíduo	160	0,000	1,06	0,31	0,001	0,28	0,28
Média		0,82	43,10	27,18	0,61	14,56	13,34
CV (%)		2,49	2,38	2,06	3,89	3,64	3,25
CVg (%)		5,24	7,97	9,32	13,69	11,67	9,33
CVg/CV		2,10	3,34	4,52	3,52	3,21	2,87
h ²		0,92	0,97	0,98	0,97	0,96	0,96

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CV = coeficiente de variação; CVg(%) = coeficiente de variação genotípica; CVg/CV = razão do CVg com o CV; e h² = herdabilidade.

AACUM = área abaixo da curva de umidade; DFM = dias para floração masculina; DFF = dias para floração feminina; MG = massa de grãos; PMG = peso de mil grãos; HL = peso hectolitro; RMGE = relação massa da espiga/grãos; DE = diâmetro da espiga; DS = diâmetro do sabugo; RDES = relação diâmetro espiga/sabugo; NF = número de fileiras; e CE = comprimento da espiga.

Em relação aos parâmetros genéticos estimados (Tabela 1), constatou-se que os coeficientes de herdabilidade e a relação CVg/CV foram superiores a 0,90 e a 1, respectivamente, ratificando a existência de variabilidade genética e a importância de fatores

genéticos na determinação dos caracteres relacionados a maturação e a produtividade de grãos (LIMA et al., 2008; HALLAUER; CARENA; MIRANDA FILHO, 2010).

Os valores médios das linhagens para o caractere AACUM variaram de 599,7 a 981, distribuídos em 10 grupos pelo método de Scott Knott a 5% de probabilidade (Tabela 2). A linhagem CDL08 foi a mais eficiente na redução de umidade de grãos, considerada a mais precoce dentre os genótipos. As linhagens CDL52, CDL57 e CDL72 no grupo “I” também se destacaram como precoces, com área $\leq$ a 703,6. As linhagens classificadas nos grupos “A”, “B” e “C” somaram maior AACUM por apresentarem umidade elevada no início das coletas e por isso, consideradas tardias.

Para DFM, detectou-se amplitude de 19,7 dias entre a linhagem mais precoce e a mais tardia. Pela técnica de Scott Knott ($p < 0,05$), dos nove grupos formados, a linhagem CDL57 apresentou a menor soma de DFM, que seguida das linhagens CDL08, CDL14, CDL22, CDL52 e CDL72, foram consideradas precoces, com floração em até 63,9 dias após a semeadura (Tabela 2). E para DFF, a amplitude foi de 21,7 dias entre os genótipos, com agrupamento de oito grupos por Scott Knott ($p < 0,05$). A linhagem CDL57 novamente destacou-se pela precocidade relacionada à floração, seguida das linhagens CDL08, CDL22, CDL26, CDL52, CDL72 e CDL79, também consideradas precoces para o caractere, com floração média $\leq$ de 64,2 dias após a semeadura (Tabela 2).

Ao observar-se diretamente o agrupamento por Scott Knott ($p < 0,05$) para DFM e DFF, nota-se grandes semelhanças de pares e até grupos de linhagens que se mantiveram juntamente agrupados em ambos os atributos (Tabela 2). Essa associação foi confirmada com a estimação da correlação genética (r_g) para esses caracteres, de 0,92, considerada muito forte (Tabela 3). De maneira geral, a emissão da inflorescência masculina antecede de dois a quatro dias a exposição dos estilos-estigmas (MAGALHÃES; DURÃES, 2008), revelando a alta correlação.

Também se detectou forte correlação genética entre DFM e AACUM ($r_g=0,81$) e entre DFF e AACUM ($r_g=0,78$) (Tabela 3), e por isso um estudo de regressão polinomial foi utilizado para verificar a possibilidade de estimar a AACUM dispondo apenas da informação do número de dias para o florescimento.

Tabela 2 - Agrupamento Scott Knott a 5% de probabilidade para área abaixo da curva de umidade (AACUM), dias para floração masculina (DFM) e dias para floração feminina (DFF) em 81 linhagens de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

Grupos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
IM	981	980,9-926,3	926,2-893,0	892,9-868,4	868,3-828,8	828,7-790,4	790,3-733,4	733,3-703,7	703,6-648,9	648,8-599,7
AACUM	60	20 58	12 19 37	9 17 24	1 2 3 5	4 6 10 13	14 15	54 79	52 57	8 (CDL)
		59 77	40 41 43	31 32 34	7 11 18 23	16 21 25 27	22 26		72	
			61 75 80	38 42 45	28 33 35 36	29 30 44 46				
				50 63 68	39 48 55 62	47 49 51 53				
				81	64 67 70 71	56 65 66 69				
					74 76 78	73				
Grupo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
IM	78 - 76,6	76,5 - 74,6	74,5 - 72,3	72,2 - 69,3	69,2 - 67,6	67,5 - 66	65,9 - 64	63,9 - 61,3	61,2 - 58,3	
DFM	60 61	58 75	19 40 59	2 9 12 13 17 20 23 28	1 3 7 10	6 15 16	4 5 11 24	8 14 22	57 (CDL)	
			80	29 31 32 33 34 35 37 38	18 25 27 36	21 44 56	26 30 49 53	52 79		
				39 41 42 43 45 47 50 65	46 48 51 62	64 76	54 55 63 66			
				68 69 70 74 77 78 81	67		71 72 73			
Grupo	A	B	C	D	E	F	G	H		
IM	80 - 78,3	78,2 - 74	73,9 - 71,3	71,2 - 69	68,9 - 67	66,9 - 64,3	64, 2 - 61,3	61,2 - 58,3		
DFF	17 59 60	19 34 37	9 10 20	1 2 3 7 13 18 25 29	12 15 16 27	4 5 6 11 14 21	8 22 26	57 (CDL)		
	61 80	42 58 75	23 28 40	31 32 33 35 38 43 44 45	36 39 46 56	24 30 49 53 54 55	52 72 79			
		77 78	41 47 69	48 50 51 65 68 70 74 81	62 64 67 71	63 66 73 76				

IM = intervalo de médias.

Tabela 3 - Valores dos coeficientes de correlações genéticas (r_g) acima da diagonal, e fenotípica (r_f), abaixo da diagonal, entre os componentes de produção avaliados em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

	AACUM	DFM	DFF	MG	DE	DS	RDES	RMEG	NF	CE	PMG	HL
AACUM	-	0,81	0,78	0,17	0,21	0,20	0,18	-0,10	0,21	0,45	0,24	0,07
DFM	0,79	-	0,92	-0,02	0,02	0,16	0,24	-0,30	0,12	0,52	0,02	0,18
DFF	0,76	0,91	-	-0,13	-0,15	-0,01	0,37	-0,29	0,05	0,53	-0,01	0,14
MG	0,17	-0,02	-0,12	-	0,74	0,36	-0,03	0,59	0,39	0,31	0,46	0,11
DE	0,20	0,02	-0,14	0,73	-	0,80	-0,57	0,27	0,68	-0,03	0,35	-0,12
DS	0,20	0,15	-0,01	0,35	0,79	-	-0,74	-0,14	0,72	-0,06	0,03	-0,11
RDES	0,18	0,23	0,36	-0,03	-0,55	-0,73	-	0,19	-0,55	0,71	0,11	0,20
RMEG	-0,09	-0,28	-0,28	0,58	0,27	-0,13	0,19	-	0,10	0,13	0,30	0,41
NF	0,20	0,12	0,04	0,37	0,66	0,70	-0,53	0,09	-	-0,11	-0,14	0,09
CE	0,44	0,50	0,51	0,30	-0,02	-0,06	0,72	0,13	-0,11	-	0,18	0,16
PMG	0,24	0,02	-0,01	0,46	0,35	0,03	0,11	0,29	-0,14	0,18	-	0,02
HL	0,07	0,16	0,13	0,14	-0,09	-0,10	0,19	0,41	0,08	0,15	0,03	-

AACUM = área abaixo da curva de umidade; DFM = dias para floração masculina; DFF = dias para floração feminina; MG = massa de grãos; DE = diâmetro da espiga; DS = diâmetro do sabugo; RDES = relação diâmetro espiga/sabugo; RMEG = relação massa da espiga/grãos; NF = número de fileiras; CE = comprimento da espiga; PMG = peso de mil grãos; e HL = peso hectolitro.

Pela análise de regressão polinomial, detectou-se que as equações com efeito quadráticos foram as que melhor representam a AACUM pelos florescimentos masculinos ($Y = -2667,8 + 88,92 X - 0,55 X^2$; $R^2=0,632$) e femininos ($Y = -2537,5 + 84,29 X - 0,51 X^2$; $R^2=0,648$). No entanto, os coeficientes de determinação associados às equações de regressão estimadas foram de moderada magnitude, demonstrando a existência de outros fatores não explicados no modelo, e que poderão resultar na mudança do ordenamento das médias dos genótipos. Assim, a determinação do número de dias para o florescimento não é uma decisão suficientemente eficaz na identificação de genótipos com maior ou menor perda de umidade de grãos requeridos pelos programas de melhoramento de milho.

Considerando a importância do caractere AACUM, mesmo apresentando alta correlação com florescimentos masculinos e femininos (Tabela 3), torna-se necessário verificar a possibilidade de uma alternativa, pois sua determinação é bastante trabalhosa, dificultando sua aplicação na rotina de um programa de melhoramento genético. Nesse contexto, foram empregadas as umidades de grãos de espigas coletadas a cada quatro dias (UR1 até UR7) visando estimar os coeficientes de correlação genética com AACUM, DFF e DFM. Os coeficientes de correlação genética de AACUM com as umidades de grãos foram, a partir da terceira coleta (UR3), muito fortes ($> 0,90$), e atingiram a magnitude de $r_g=0,98$ na quinta (UR5) e sexta coleta (UR6) (Tabela 4). Nas UR5 e UR6, as umidades de grãos das linhagens mais

precoces apresentavam 19,7% e 17,2%, respectivamente, enquanto que as mais tardias se encontravam com aproximadamente 35%. Essa elevada magnitude da umidade de grãos torna viável sugerir a possibilidade de substituição da variável AACUM por uma única coleta de umidade, facilitando o estudo da perda de umidade e aplicável em rotina dentro dos programas de melhoramento de milho.

Tabela 4 - Valores dos coeficientes de correlações genéticas (r_g) acima da diagonal, e fenotípicas (r_f), abaixo da diagonal, entre os caracteres relacionados a maturação e as coletas de umidade em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

	AACUM	DFM	DFF	UR1	UR2	UR3	UR4	UR5	UR6	UR7
AACUM	-	0,81	0,78	0,77	0,89	0,92	0,95	0,98	0,98	0,91
DFM	0,79	-	0,92	0,70	0,81	0,80	0,79	0,77	0,75	0,68
DFF	0,76	0,91	-	0,62	0,74	0,79	0,76	0,77	0,73	0,60
UR1	0,72	0,65	0,58	-	0,92	0,77	0,65	0,74	0,68	0,63
UR2	0,85	0,77	0,70	0,86	-	0,95	0,75	0,87	0,81	0,70
UR3	0,90	0,77	0,77	0,71	0,88	-	0,85	0,91	0,83	0,75
UR4	0,92	0,75	0,72	0,59	0,68	0,79	-	0,94	0,92	0,87
UR5	0,94	0,73	0,73	0,66	0,79	0,84	0,86	-	0,95	0,83
UR6	0,95	0,71	0,69	0,61	0,75	0,79	0,84	0,88	-	0,94
UR7	0,88	0,64	0,57	0,57	0,65	0,71	0,79	0,77	0,89	-

AACUM = área abaixo da curva de umidade; DFM = dias para floração masculina; DFF = dias para floração feminina; UR1 = coleta em 20/01; UR2 = coleta em 24/01; UR3 = coleta em 28/01; UR4 = coleta em 01/02; UR5 = coleta em 05/02; UR6 = coleta em 09/02; UR7 = coleta em 13/02.

Para os componentes de rendimento massa de grãos (MG) e peso de mil grãos (PMG), as linhagens avaliadas foram distribuídas em sete e oito grupos, respectivamente, pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$) (Tabela 5). Os valores médios das linhagens para MG variaram de 58,8 a 144,2 g, sendo que CDL21, CDL36, CDL46 e CDL64 as que apresentaram maior produção, e para PMG a variação foi de 172,0 a 389,8 g, com destaque para CDL11, CDL63 e CDL73 (Tabela 5). Para o caractere peso hectolitro (HL), detectou-se variação de 158,7 a 205,4 g entre as linhagens analisadas, que foram agrupadas pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$) em dois grupos com 72 linhagens, e as demais distribuídas em três grupos menores. Esses resultados revelam a baixa variabilidade genética para o HL (Tabela 5). Contudo, a relação entre CVg/CV (Tabela 1) foi de 1,85, indicando que há maior importância dos fatores genéticos em relação aos de ambiente, possibilitando a sugestão de ganhos pelo melhoramento genético.

Com a análise das correlações genéticas entre os componentes de rendimento, detectou-se que as magnitudes foram de baixa a moderada, sendo a maior delas foi entre MG e PMG ($r_g = 0,46$). Também não houve associações elevadas dos componentes de rendimento com as variáveis que indicam a precocidade. As correlações genéticas de MG, PMG e HL foram de

$r_g = 0,07$ a $0,24$ para AACUM, de $r_g = -0,02$ a $0,18$ para DFM, e de $r_g = -0,13$ a $0,14$ para DFF, classificadas como muito fracas e fracas (Tabela 3). Essas baixas magnitudes indicam a possibilidade de seleção para precocidade sem comprometer a produção de grãos (RUSSELL; STUBER, 1985, TROYER; LARKINS, 1985), também detectados em híbridos de milho por Fiorini et al. (2015).

O caractere RMEG, que representa proporção do peso dos grãos comparados ao peso total da espiga, apresentou variação entre 0,58 a 0,91 entre as linhagens avaliadas, que foram bem distribuídas nos quatro primeiros grupos pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). As linhagens CDL61 e CDL38 ficaram isoladas das demais, constituindo os grupos “E” e “F”. Apesar do reduzido número de grupos (Tabela 5), semelhante ao que foi verificado para HL, há variabilidade genética que é passível de ser empregada para fins de melhoramento genético, visto que a relação CV_g/CV foi de 2,10 (Tabela 1). Não houve correlações genéticas de elevadas magnitudes com os demais caracteres, sendo as maiores associadas aos componentes de rendimento. Rodrigues (2015) estudou as correlações fenotípicas do HL com demais componentes secundários em linhagens de milho, e não encontrou significância.

Dos atributos da espiga (Tabela 6), houve semelhanças nos agrupamentos dos caracteres diâmetro da espiga (DE) e diâmetro do sabugo (DS). O agrupamento por Scott Knott ($p < 0,05$) formou oito e nove grupos, respectivamente. Para DE, as espigas variaram de 37,8 a 51,2 mm entre as linhagens estudadas, e para DS, as médias foram de 21,4 a 32,3 mm. Notou-se que a linhagem considerada precoce para a AACUM, CDL57, ficou agrupada nos grupos dos menores diâmetros. Assim como notável para florescimento, também houve semelhanças de pares e até grupos de linhagens que se mantiveram juntamente agrupados para DE e DS (Tabela 4), associações ratificada pela forte correlação genética entre as variáveis ($r_g = 0,8$) (Tabela 3).

Com os componentes de rendimento, o DS mostrou-se fortemente correlacionado geneticamente com a MG ($r_g = 0,74$). Chaves (2013) também encontrou correlações genéticas do diâmetro com produtividade de grãos ($r_g = 0,66$) e peso médio de 500 grãos ($r_g = 0,67$). A maior associação genética entre os diâmetros e as variáveis que indicam precocidade foi de 0,21 (fraca magnitude) entre DE e AACUM (Tabela 3).

Tabela 5 - Agrupamento Scott Knott a 5% de probabilidade da massa de grãos (MG), peso de mil grãos (PMG), peso hectolitro (HL) e relação massa da espiga/grãos (RMEG) em 81 linhagens de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

Grupo	A				B			C					D				E				F				G						
IM	144,2 - 126				125,9 - 112,9			112,8 - 101,5					101,4 - 91,8				91,7 - 76,7				76,6 - 62,1				62 - 58,8						
MG	21	36	46		6	32	40	1	7	11	24	29	18	20	22	42	3	5	8	9	2	4	15	16	17	61	70				
	64				53	65	81	31	33	34	35	37	43	45	48	51	10	12	13	14	23	25	27	38	72	80 (CDL)					
								44	49	55	56	58	52	59	60	62	19	26	28	30	39	41	47	54							
								63	73	74	77			66	67	68	71	50	75	76	79	57	69	78							
Grupo	A				B			C					D				E				F				G			H			
IM	389,8 - 354,8				354,7 - 330,9			330,8 - 302,4					302,3 - 287				286,9 - 252,8				252,7 - 229,1				229 - 172,1			172,0			
PMG	11	63	73		31			12	20	21	1	2	3	18	19	22	24	6	7	10	13	5	9	14	15	8	25	26	4 (CDL)		
								34	37	41	27	28	32	36	39	43	45	17	30	35	40	16	23	29	33	38	56	61			
								60	64	66	46	47	48	49	50	51	52	44	54	57	72	42	55	58	62	70	75	80			
								77	81		53	59	65	67	68	69	76	78				71	74	79							
Grupo	A										B										C				D		E				
IM	205,4 - 195,2										195,1 - 184,4										184,3 - 172,8				172,7 - 158,8		158,7				
HL	1	2	3	4	7	13	15	18	19	21	5	6	8	9	10	11	12	14	16	17	22	25	27	31	37	26	30	44	20	54	38 (CDL)
	23	24	28	29	32	33	34	35	36	40	39	41	42	43	45	46	47	48	50	51	52	55	60	61	62	56	73				
	49	53	57	58	59	68	74	75	76	77	63	64	65	66	67	69	70	71	72	78	79	80	81								
Grupo	A					B										C					D					E		F			
IM	0,91 - 0,86					0,85 - 0,83										0,82 - 0,8					0,79 - 0,74					0,73 - 0,66		0,65 - 0,58			
RMGE	5	24	33	35	36	1	4	6	7	11	18	20	21	22	26	27	3	9	10	12	15	16	2	8	13	14	25	61	38 (CDL)		
	37	40	46	53	56	28	29	30	32	34	41	42	45	48	49	52	17	19	23	44	51	55	31	39	43	47	50				
	64	66	81			57	58	62	65	68	71	73	74	76	77	79	59	60	63	67	72	75	54	69	70	78	80				

IM = intervalo de médias.

Referindo-se a relação diâmetro da espiga/sabugo (RDES), houve variação dos valores médios de 0,44 a 0,84, distribuídos em nove grupos pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$) (Tabela 6). A proporção indica o espaço nas espigas disponível para os grãos, e foi investigada pela possibilidade em favorecer a perda de água, mas o caractere não apresentou correlações genóticas de elevada magnitude com atributos ligados a maturação e nem aos componentes de rendimento. A única correlação de elevada magnitude foi com DS ($r_g = -0,74$), negativa e esperada pela atuação direta de DS no cálculo de RDES (Tabela 3).

Para os caracteres número de fileiras (NF) e comprimento de espiga (CE), foi possível formar nove e oito grupos, respectivamente, pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Para NF, as linhagens variaram de 10,4 a 18,7 fileiras, e para CE, de 12,5 a 19,9 cm (Tabela 6). Associação de elevada magnitude foram observadas entre NF e DE ($r_g = 0,68$); NF e DS ($r_g = 0,72$) e CE e RDES ($r_g = 0,71$) (Tabela 3), que eram esperadas para esses componentes secundários por serem geralmente proporcionais e já observadas por outros autores (LOPES et al., 2007; CHAVES, 2013). As correlações genéticas entre CE e as variáveis que indicam a precocidade foram de moderada magnitude, CE e AACUM ($r_g = 0,45$), CE e DFM ($r_g = 0,52$), e CE e DFF ($r_g = 0,51$) (Tabela 3). Embora Cross, Chyle Júnior e Hammond (1987) tenham afirmado correlação entre CE e a taxa de secagem em variedades de milho, Guissem et al. (2002) não observaram nenhuma relação para híbridos. Em virtude de essa associação ser de moderada magnitude, as diferenças nos resultados observados e na literatura são efeito da variabilidade genética de cada germoplasma avaliado e do efeito ambiental.

Tabela 6 - Agrupamento Scott Knott a 5% de probabilidade do diâmetro da espiga (DE), diâmetro do sabugo (DS), relação diâmetro espiga/sabugo (RDES), número de fileiras (NF), e comprimento da espiga (CE) em 81 linhagens de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

Grupo	A			B			C			D			E			F			G			H												
IM	51,2 - 51			50,9 - 48,8			48,7 - 46,1			46 - 43,3			43,2 - 41,6			41,5 - 39,7			39,6 - 38,2			38,1 - 35,8												
DE	64			6	43	46	3	18	20	21	31	7	11	13	14	22	32	33	1	5	12	16	19	2	8	9	15	23	4	28	41	10	17	25
	81						36	40	48	55	56	39	44	45	49	50	51	62	26	29	30	35	38	24	27	34	37	42	75	78	57 61 72			
							58	68	71	73	74	63	65	66	67	77				47	52	70	76				53	54	59	60	69	79 80 (CDL)		
Grupo	A			B			C			D			E			F			G			H			I									
IM	32,3 - 30,9			30,8 - 29,7			29,6 - 28,2			28,1 - 27,1			27 - 25,9			25,8 - 24,8			24,7 - 23,5			23,4 - 22,9			22,8 - 21,4									
DS	6	14	48	3	43	51	13	18	20	22	2	7	9	16	1	4	11	12	8	15	34	24	25	28	5	10	57	17	37	41				
	50	55	71	56	58	64	31	32	36	38	19	21	33	44	23	26	27	29	35	54	59	52	72				53	79	(CDL)					
				68	81				39	40	46	49	45	47	62	67	30	42	63	69	60	66	75											
RDES							61	65	70	74	73	77				76	78				80													
Grupo	A			B			C			D			E			F			G			H			I									
IM	0,84 - 0,82			0,81 - 0,76			0,75 - 0,7			0,69 - 0,67			0,66 - 0,62			0,61 - 0,58			0,57 - 0,54			0,53 - 0,5			0,49 - 0,44									
RDES	27	40	52	58			16	18	23	5	9	22	1	6	7	8	2	11	14	26	28	4	17	19	12	15	21	3	13	42				
							36	41	75	33	51	61	10	20	24	25	35	39	43	45	46	30	32	38	37	49	53	47	54	68				
										65	78	79	29	31	34	44	55	57	62	63	66	48	50	56	70	74	71 (CDL)							
NF							80				60	67	72	77	69	73	76				59	64	81											
Grupo	A			B			C			D			E			F			G			H			I									
IM	18,7 - 17,9			17,8 - 16,8			16,7 - 15,7			15,6 - 14,9			14,8 - 13,9			13,8 - 13			12,9 - 11,7			11,6 - 11,2			11,1 - 10,4									
NF	6	48	74	3	40	50	13	43	44	4	9	14	1	5	7	15	17	2	8	11	16	24	10	12	28	54	73	41	72	(CDL)				
				51	56	71	45	46	49	19	31	33	18	20	21	22	23	26	27	30	32	34	52	57	61									
							55	62	64	35	47	58	25	29	36	38	39	37	53	60	66	67	76	79										
CE							81				63	68	70	42	59	65	69	78	75	77	80													
Grupo	A			B			C			D			E			F			G			H			I									
IM	19,9 - 18,8			18,7 - 18			17,9 - 16,6			16,5 - 15,9			15,8 - 15,1			15 - 14			13,9 - 13,3			13,2 - 12,5												
CE	19	28	59	9	32	41	1	6	7	21	23	2	11	12	20	5	8	10	17	4	13	15	3	14	43	54	57	(CDL)						
	61	65				42	53	67	24	34	36	40	45	26	27	30	35	18	25	29	31	16	22	38										
				77	78				46	51	56	58	62	37	39	44	47	33	50	55	63	48	68	70										
CE							64	75	80	81				49	52	60	76	66	69	73	74	71	72	79										

IM = intervalo de médias.

2.3.2 Análise Multivariada

As distâncias de Mahalanobis (D^2) estimadas entre os pares de linhagens variaram entre 10,05 e 1032,31 sendo CDL57 e CDL58 as mais divergentes, enquanto que CDL47 e CDL58 as mais semelhantes.

Pelo método de agrupamento de Tocher, empregando as distâncias de Mahalanobis, foi possível reunir as linhagens em oito grupos (Tabela 7). O grupo I abrangeu 73% das 81 linhagens avaliadas, seguido pelos grupos IV, II, V e III que incluíram oito, seis, três e duas linhagens, respectivamente. Já as linhagens CDL73, CDL38 e CDL41 foram distribuídas de maneira isolada nos grupos VI, VII e VIII.

As linhagens precoces, CDL52, CDL57, CDL72 e CDL08, identificadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade para os caracteres AACUM, DFM e DFF, foram reunidas no grupo II da análise multivariada pelo método de otimização de Tocher. Observou-se também que as linhagens CDL64, CDL36, CDL46 e CDL21, que se destacaram para massa de grãos (MG) na análise univariada, também estão contidas em mesmo grupo da análise multivariada (Tabela 7).

Tabela 7 - Agrupamento pelo método de Tocher com base na distância de Mahalanobis entre o germoplasma de milho comum mediante 12 parâmetros genéticos (Cascavel/PR, safra 2014/15)

Grupos	Linhagens														
I	47	69	27	1	23	34	78	7	9	42	29	35	45	62	33
	18	67	39	77	32	76	2	16	36	49	51	21	65	30	44
	15	46	81	31	13	68	50	70	12	74	19	40	25	56	66
	63	24	10	26	3	43	64	58	20	6	71	22	48	11	
II	52	79	72	57	8	54									
III	14	55													
IV	75	80	59	60	17	37	28	41							
V	5	53	4												
VI	73														
VII	38														
VIII	61	(CDL)													

Visando a obtenção de novos híbridos comerciais precoces adaptados as condições de safrinha (CLOVIS et al., 2015) ou para populações de melhoramento (MIRANDA et al., 2003), sugere-se o cruzamento de linhagens dos grupos I e II, desde que pertençam a grupos heteróticos distintos (PATERNIANI et al., 2008). Observou-se a matriz de Mahalanobis, para prever alguns desses cruzamentos entre as linhagens que apresentaram as maiores distância (Tabela 8).

Poucos cruzamentos foram destacados com as linhagens CDL8, CDL52 e CDL54. E para as linhagens CDL57, CDL72 e CDL79, sugeriram-se mais cruzamentos, por haverem maiores distâncias com várias linhagens entre os grupos I e II. A linhagem CDL57 foi a mais divergente com as demais linhagens, e $D^2 > 600,0$ foram observadas entre vários genótipos (Tabela 8).

Tabela 8 - Maiores distâncias de Mahalanobis entre as linhagens precoces do grupo II com as linhagens do grupo I pelo método de Tocher, em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

Linhagens	Intervalo de Distâncias (D^2)																			
	(400 - 500)								(500,1 a 600)								(600,1 - 700)			
57	2	7	12	13	18	23	34	36	3	9	31	32	42	45	46	6	43	48	50	19
	39	44	47	51	62	67			56	65	68	70	71	74	78	64	77	81		58 (CDL)
79	3	31	32	42	43	51	56	64	6	19	20	40	48	50	81	58				
	65	68	70	71	74	77														
72	3	19	20	43	50	56	64	71	6	40	48	58								
	74	81																		
8	11	31	40	43	48	50	77	81	19	20	58									
52	19	20	40	48	50				58											
54	19	40							58											

A estimativa da contribuição relativa dos caracteres relacionados à maturação e a produção, pelo método de Singh (1981), permitiu revelar em ordem decrescente, a sua importância para a divergência genética: DS (15,4%), CE (14,1%), PMG (10,8%), DFF (10,3%), DFM (9,7%), NF (9,1%), AACUM (8,9%), DE (7,8%), HL (4,8%), RMGE (4,7%), MG (3,7%) e RDES (0,2%). O caráter RDES teve importância secundária pela pequena contribuição, entretanto seu descarte causou alterações na constituição dos grupos, sendo recomendada a permanência do mesmo no estudo de divergência (SHIMOYA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; SCHUELTER et al., 2005).

Para análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, o nível de corte arbitrário foi estabelecido em que houvesse diferenças (ou distâncias) entre os grupos. A definição do ponto de corte aos 50% levou em conta o número de grupos obtidos pelo método de Tocher e a melhor distribuição das distâncias no dendrograma, projetando-se a formação de cinco grupos. O grupo I abrangeu 71% das linhagens, o grupo II por cinco linhagens, o grupo III por 13 linhagens, e os grupos IV e V por apenas uma linhagem, CDL38 e CDL61 respectivamente (Figura 2).

Houve semelhança entre os agrupamentos de Tocher e do UPGMA, sendo o grupo I foi composto por 55 linhagens semelhantes. As linhagens CDL52, CDL57, CDL72 e CDL08 consideradas precoces para AACUM, DFM, e DFF ficaram novamente agrupadas em mesmo grupo, compondo o grupo III do UPGMA. Observa-se também que as linhagens CDL17, CDL60, CDL37, CDL41 e CDL28 do grupo II do UPGMA, estavam agrupadas em Tocher no grupo IV. Em ambos os agrupamentos as linhagens CDL38 e CDL61 formaram grupos únicos. Ambos os agrupamentos foram considerados eficientes, revelando variabilidade genética do germoplasma (LANES, 2010).

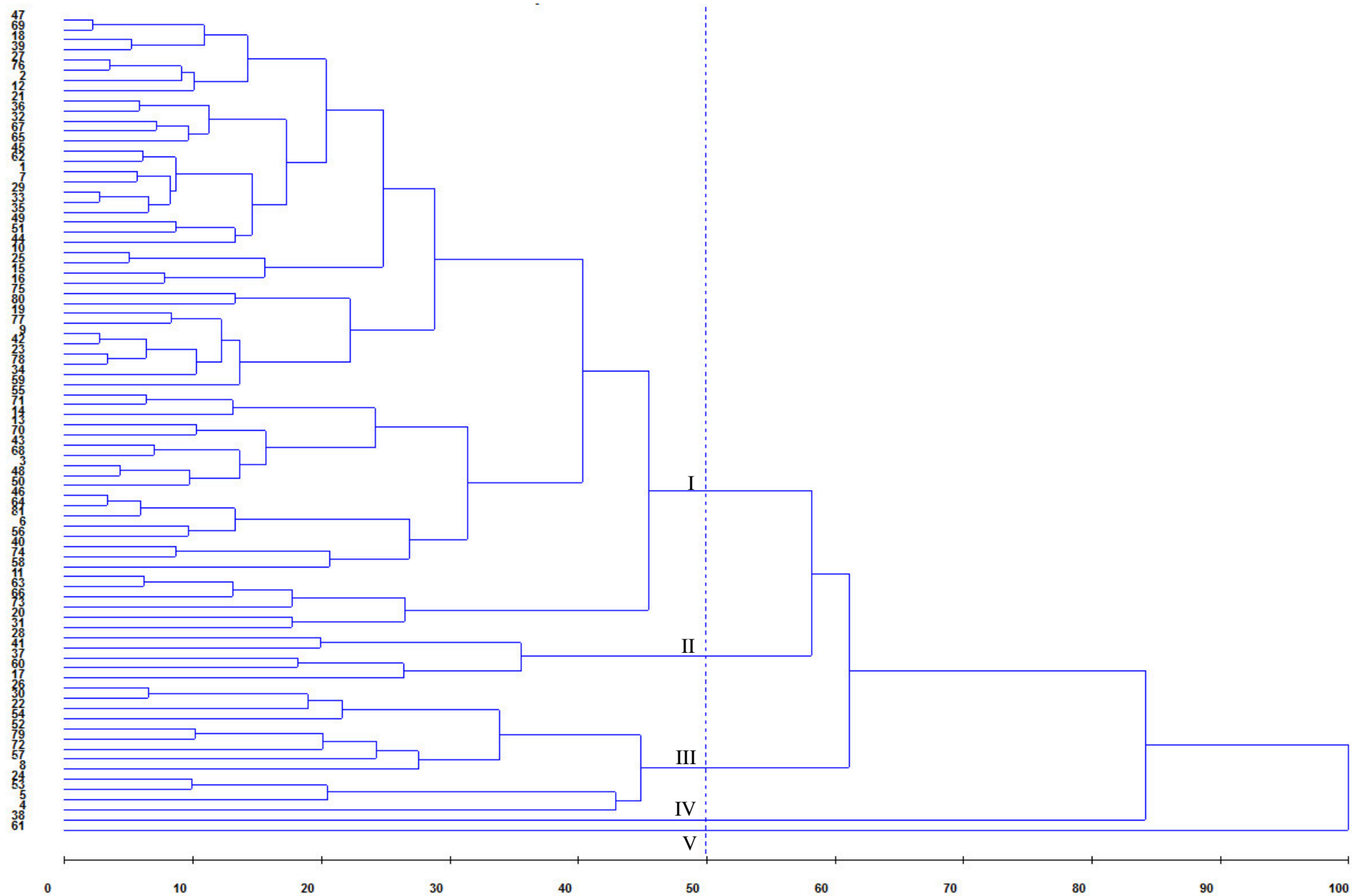


Figura 2 - Dendrograma do agrupamento pelo método do UPGMA com base na distância de Mahalanobis sob 12 parâmetros genéticos em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/2015)

2.4 CONCLUSÕES

A perda de umidade determinada por meio da área abaixo da curva de umidade fornece resultados com alta confiabilidade, mas a sua anotação é bastante trabalhosa, dificultando a sua utilização na rotina de um programa de melhoramento de milho.

O emprego da floração feminina e/ou masculina é ineficiente para classificação da maturação de linhagens de milho.

A avaliação da umidade em única coleta pode ser uma alternativa para substituir a determinação da área abaixo da curva de umidade desde que o germoplasma apresente ampla amplitude para a umidade de grãos no momento da colheita.

As correlações genéticas de baixa magnitude entre os componentes de rendimento e de maturação indicam a possibilidade de seleção para precocidade sem comprometer a produtividade.

A diversidade genética permitiu classificar a variabilidade genética existente no germoplasma e sugerir combinações híbridas de maior efeito heteróticos para precocidade e produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, R. H; FERWEDA, F. P.; STROMMEM, A. M. Maturation and yield of corns as influenced by climate and production technique. **Agronomy Journal**, Maidson, v. 48, p. 231-236, 1956.
- BROOKING, I. R. Mayze ear moisture during grain-filling, and its relation to physiological maturity and graindrying. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 23, p. 55-68, 1990.
- BUCKLER, E. S.; HOLLAND, J. B.; BRADBURY, P. J; ACHARYA, C. B.; BROWN, P. J.; BROWNE, C.; ERSOZ, E.; FLINT-GARCIA, S.; GARCIA, A.; GLAUBITZ, J. C.; GOODMAN, M. M.; HARJES, C.; GUILL, K.; KROON, D. E.; LARSSON, S.; LEPAK, N. K.; LI, H.; MITCHELL, S. E.; PRESSOIR, G.; PEIFFER, J. A.; ROSAS, M. O.; ROCHEFORD, T. R.; ROMAY, M. C.; ROMERO, S.; SALVO, S.; VILLEDA, H. S.; SILVA, S.; SUN, Q.; TIAN, F.; UPADYAYULA, N.; WARE, D.; YATES, H.; YU, J.; ZHANG, Z.; KRESOVICH, S.; MCMULLEN, M. D. The genetic architecture of maize flowering time. **Science**, Washington, v. 325, p. 714-718, 2009.
- CAMARGO, T. V.; MORAES, M. C. Sistema integrado de soja precoce e milho safrinha. **Informativo Pioneer**. Santa Cruz do Sul, RS, 2014. Disponível em: < <http://www.pioneersementes.com.br/soja/central-de-informacoes/artigos/170/sistema-integrado-de-soja-precoce-e-milho-safrinha>>. Acesso em: 05 de fev. 2016.
- CHARDON, F.; VIRLON, B.; MOREAU, L.; FALQUE, M.; JOETS, J.; DECOUSSET, L.; MURIGNEUX, A.; CHARCOSSET, A. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and syntenic conservation with the rice genome. **Genetics**, Baltimore, v. 168, p. 2169-2185, 2004.
- CHAVES, L. G. **Mapeamento e congruência de QTLs para teor de óleo, produção de grãos e seus componentes em milho**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2013.
- CLOVIS, L. R.; SCAPIM, C. A.; PINTO, R. J. B.; BOLSON, E. SENHORINHO, H. J. C. Avaliação de linhagens S3 de milho por meio de testadores adaptados à safrinha. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 109-120, 2015.
- COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental design**. 2 ed. New York: John Wiley, 1966. 611 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2005. **Primeiro levantamento de intenção de plantio**. Brasília. 2005. p. 27-29.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília. 2016. 178 p.
- CROSS, H. Z.; CHYLE JÚNIOR, J. R.; HAMMOND, J. J. Divergent selection for ear moisture in early maize. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 5, p. 914-918, 1987.
- CRUZ, C. D. **Programa genes: biometria**. Editora UFV: Viçosa, 2006. 382 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4 ed. v. 1. Viçosa: UFV, 2012. 514 p.

EMBRAPA. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. (Manual técnico).

FIORINI, F. V. A.; PINHO, R. G. V.; CAMARGOS, R. B.; SANTOS, A. O.; FIORINI, I. V. A. Relação entre perda de água dos grãos e características agrônômicas de híbridos de milho. **Revista Brasileira de Sorgo e Milho**, Sete Lagoas, v. 14, n. 1, p. 88-100, 2015.

FRANCO, A. A. N.; MARQUES, O. J.; VIGIDAL-FILHO, P. S. Sistemas de produção do milho safrinha no Paraná 2014. In: Seminário nacional de milho safrinha, 12, 2013, Dourados. **Anais...** Dourados: UFGD, 2013, 33 p. (Palestra).

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.

GOMES, F. P.; GARCIA, C. H. **Experimentos em látice: planejamento e análise por meio de “pacotes” estatísticos**. Piracicaba: ESALQ/USP, v. 7, n. 23, 1991. 69 p. (Série Técnica).

GUISCHEM, J. M.; BICUDO, S. J.; NAKAGAWA, J.; ZANOTTO, M. D.; SANSÍGOLO, C.; ZUCARELLI, C.; MATEUS, G. P. Características morfológicas e fisiológicas do milho que influenciam a perda de água do grão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 28-37, 2002.

HAULLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 2010. 486 p.

KOESTER, R. P.; SISCO, P. H.; STUBER, C. W. Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenics lines of maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1209-1216, 1993.

LANES, É. C. M. **Caracterização molecular de linhagens de milho tropical por marcadores microssatélites**. 2010. 38 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

LIMA, J. L.; SOUZA, J. C.; MACHADO, J. C.; RAMALHO, M. A. P. Controle genético da exigência térmica para o início do florescimento em milho. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 127-131, 2008.

LOPES, S. J.; LÚCIO, A. D.; STORCK, L.; DAMO, H. P.; BRUM, B.; SANTOS, V. J. Relações de causa e efeito em espigas de milho relacionadas aos tipos de híbridos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1536-1542, 2007.

LOPES, U. V.; GALVÃO, J. D.; CRUZ, C. D. Inheritance of the flowering time in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 10, p.1267-1271, 1995.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção**. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. (Eds). A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 3. p. 63-87.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. p. 343-347.

MIRANDA, G. V.; COIMBRA, R. R.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p.681-688, 2003.

MORAES, M. L. T.; PATINO-VALERA, F.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y. **Aspectos práticos dos delineamentos em látice**. Piracicaba: ESALQ/USP, v. 5, n. 14, 21 p. (Série Técnica).

OLIVEIRA, A. C. B.; SEDIYAMA, M. A. N.; PEDROSA, M. W.; GARCIA, N. C. P.; GARCIA, S. L. P. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 211-217, 2004.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GUIMARÃES, P. S.; LÜDERS, R. R.; GALLO, P. B.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M. Capacidade combinatória e divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 3, p. 639-648, 2008.

PURDY, J. L.; CRANE, P. L. Inheritance of drying rate in “mature” corn (*Zea mays*, L.). **Crop Science**. Madison, v. 7, n. 1, p. 294-297, 1967.

RODRIGUES, M. C. **Avaliação de linhagens de milho tropical para eficiência no uso do nitrogênio**. 2015. 37 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

ROOD, S. B.; MAJOR, D. J. Inheritance of tillering and flowering-time in early maturing maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 30, p. 327-334, 1981.

RUSSELL, W. K.; STUBER, C. W. Genotype x photoperiod and genotype x temperature interactions for maturity in maize. **Crop Science**, Madison, v. 25, p.152-158, 1985.

SCAPIM, C. A; CARVALHO, C. G. P; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 683-686, 1995.

SCHMIDT, J. L.; HALLAUER, A. R. Estimating harvest date of corn in the field. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 3, p. 227-231, 1966.

SCHUELTER, A. R.; FINGER, F. L.; CRUZ, C. D.; CASALI, V. W. D.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Ripening and shelf-life of a firm tomato mutant, wild type and hybrids. **Acta Horticulturae**, Verona, v. 682, p. 419-426, 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow - mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SHER, H.; IQBAL, M.; KHAN, K.; YASIR, M.; RAHMAN, H. Genetic analysis of maturity and flowering characteristics in maize (*Zea mays* L.). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapura, v. 2, n. 8, p. 621-626, 2012.

SHIMOYA, A.; CRUZ, C. D.; FERREIRA, R. P.; PEREIRA, A. V.; CARNEIRO, P. C. S. Divergência genética entre acessos de um banco de germoplasma de capim-elefante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 971-980, 2002.

SILVA, T. N. **Caracterização agrônômica e morfológica de populações de milho**. 2014. 38 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics e Plant Breeding**, Nova Deli, v. 41, p. 237-245, 1981.

SOUZA, T. C. Parâmetros fisiológicos em milho safrinha. In: Seminário nacional de milho safrinha, 12, 2013, Dourados. **Anais...** Dourados: UFGD, 2013, 18 p. (Palestra).

TROYER; A. F.; AMBROSE, W. B. Plant characteristics affecting field drying rate of ear corn. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 529-531, 1971.

TROYER, A. F.; LARKINS, J. R. Selection for early flowering in corn: 10 late synthetics. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 695-697, 1985.

WARNER, J. N. A method of estimating heritability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 427-430, 1952.

CAPÍTULO 2 – MAPEAMENTO POR ASSOCIAÇÃO DE DIAS PARA O FLORESCIMENTO E PERDA DE UMIDADE DE GRÃOS EM MILHO

RESUMO

Com o advento das plataformas de genotipagem de alta capacidade tornou viável o emprego de dados moleculares para realização de mapeamento por associação em caracteres de importância agronômica. Esse trabalho teve como objetivo mapear regiões genômicas associadas com maturação de grãos em linhagens de milho comum. Para o mapeamento por desequilíbrio de ligação, 72 linhagens elites foram previamente genotipadas para marcadores SNP na plataforma 650K (Affymetrix®), e os seus respectivos valores genotípicos foram preditos pelo REML/BLUP para os caracteres número de dias para o florescimento masculino (DFM) e feminino (DFF), e perda de umidade dos grãos, determinada pela área abaixo da curva de umidade (AACUM). Para evitar associações espúrias entre marcadores SNPs e os caracteres avaliados, realizou-se inicialmente a análise de estrutura da população. A análise de associação entre os marcadores SNPs e os caracteres DFM, DFF e AACUM foi realizada utilizando-se modelo linear misto (MLM) e de regressão múltipla stepwise. Pelo MLM foi possível detectar a maior importância de marcadores significativos nos cromossomos 1 e 3 para associação com os caracteres DFM, DFF e AACUM. Contudo, associações entre dias para florescimento masculino e feminino com marcadores SNP foram também verificadas nos demais cromossomos. Com a análise de regressão múltipla de stepwise para DFM, DFF e AACUM, os modelos completos explicaram 79%, 93% e 56% da variação para os valores genotípicos, respectivamente. As associações detectadas encontravam-se também relacionadas aos marcadores localizados predominantemente nos cromossomos 1 e 3. A detecção de regiões genômicas semelhantes e também distintas para esses caracteres, que são altamente correlacionados, torna possível levantar a hipótese da importância de ligação gênica e de pleiotropia para explicar a maturação de grãos em linhagens de milho. Além do que, a observação de efeitos distintos dos alelos para os respectivos marcadores que apresentam associação com esses atributos, indica o potencial do germoplasma para seleção de linhagens com a maturidade requerida pelo melhorista. Enfim, os resultados obtidos são promissores e as regiões genômicas associadas com DFM, DFF e AACUM, deverão ser avaliadas em experimentos de validação, que poderão ser úteis em programa de melhoramento de milho.

Palavras-chave: Desequilíbrio de ligação. Precocidade. Maturação de grãos.

ABSTRACT

With the advent of high capacity genotyping platforms, it has enabled the use of molecular data to carry out mapping by association for agronomic important traits. The aim of this work was to map the genomic regions associated with grains maturation in corn inbred lines of common corn. For the mapping by imbalance connection, 72 elite inbred lines have been previously genotyped for SNP markers at platform 650K (Affymetrix®), and its respective genotypic values were predicted by REML/BLUP for the traits number of days for the male (DFM) and female (DFF) flourishing and grain moisture loss, determined by the area below the moisture curve (AACUM). To avoid spurious associations between the SNP's markers and the assessed traits, it was initially carried out a structure analysis of the population. The association analysis between the SNP's markers and the traits DFM, DFF and AACUM was carried out using the mixed linear model (MLM) and of multiple regression stepwise. By the MLM it was possible to detect higher importance of significant marker in chromosomes 1 and 3 for the association with the traits DFM, DFF and AACUM. However, associations between days for male and female flourishing with SNP markers were also verified in the other chromosomes. With of multiple regression analysis of stepwise for DMF, DFF and AACUM, the complete models explained 79%, 93% and 56% of the variation for the genotypic values, respectively. The detected associations were also found to be related to the markers located predominantly in the chromosomes 1 and 3. The detection of similar and also different genomic regions for these traits, which are highly correlated, makes possible to raise the hypothesis of the importance of the genetic linkage and pleiotropy to explain the earliness in corn inbreds. In addition to this, the observation of the distinct effects of the alleles for the respective markers, which show association with these attributes, indicates the potential of the germplasm for the selection of inbred lines with the earliness required by the breeder. Finally, the obtained results are promising and the genomic regions associated with DMF, DFF and AACUM should be assessed in validation experiments, which will be useful in corn improvement programs.

Keywords: Linkage disequilibrium. Earliness. Grains maturation.

3.1 INTRODUÇÃO

O mercado de sementes de milho tem apresentado grandes mudanças, principalmente nas regiões produtoras do Sul do Brasil, em que as épocas de plantio têm sido antecipadas na safra de verão e também na de safrinha. Nesse contexto, os programas de melhoramento têm trabalhado o desenvolvimento de híbridos com elevado potencial produtivo, mas com maturação diferente dos que já vinham sendo comercializados até recentemente. Dessa forma, o conhecimento do germoplasma e o entendimento sobre o controle genético para maturação é de fundamental importância para otimizar a seleção de linhagens e agilizar o processo de desenvolvimento de híbridos competitivos.

A precocidade de uma linhagem ou híbrido de milho é determinada basicamente pelo número de dias para floração (LOPES; GALVÃO; CRUZ, 1995; LIMA et al., 2008; MARCONDES et al., 2015) e pela velocidade da perda de água dos grãos após a maturidade fisiológica (SCHMIDT; HALLAUER, 1966; GUISCHEM et al., 2002; FIORINI et al., 2015). O controle genético envolvido na determinação do número de dias para o florescimento em milho foi investigado em vários estudos, detectando-se diferentes magnitudes e tipos de ação gênica na expressão (WARNER, 1952; ROOD; MAJOR, 1981, LOPES; GALVÃO; CRUZ, 1995; LIMA et al., 2008), e regiões genômicas distribuídos em todos os grupos de ligação pela análise de QTLs (KOESTER; SISCO; STUBER, 1993; CHARDON et al., 2004; BUCKLER et al., 2009; SHER et al., 2012).

Já a velocidade de perda de umidade de grãos, por ser uma característica bastante trabalhosa e altamente influenciada pelas condições de ambiente, tem sido pouco estudada geneticamente, e sua determinação tem sido comumente realizada apenas em híbridos pré-comerciais e comerciais, visando possibilitar a orientação dos técnicos junto aos produtores de milho. Contudo, a perda de água do grão no campo é significativamente diferente para cada genótipo durante e após a maturação fisiológica (CROSS; KABIR, 1987; SALA et al., 2005; FILIPENCO et al., 2013), revelando a importância de fatores genéticos que determinam a maturação em germoplasma de milho. Assim, é de fundamental importância mapear os fatores genéticos e estimar os efeitos gênicos e interações para permitir a seleção baseada em informações genômicas (MEYER et al., 2013).

O uso da técnica de marcadores moleculares tem sido uma ferramenta rápida e eficaz no estudo dos genótipos, por detectar polimorfismo diretamente a nível molecular e não conter influência ambiental (FALEIRO, 2011). Eventos do desenvolvimento dos marcadores tipos SNP, genotipagem em larga escala a custos acessíveis e aumento da capacidade de análises

computacionais, permitiu o desenvolvimento de novos métodos de mapeamento genético, entre eles a genética de associação, que possibilita ao pesquisador mapear seu germoplasma sem necessidade de gerar os cruzamentos, utilizando-se da genética de associação (CRUZ et al., 2013).

Nessa estratégia de análise, a base do mapeamento ocorre no desequilíbrio de ligação da população não relacionada, em que se avalia estatisticamente o desequilíbrio de ligação entre o marcador e o QTL, que são variações geradas por mutações e ampliadas por recombinações durante a evolução das espécies (RESENDE JÚNIOR et al., 2013). A estratégia da genética de associação no melhoramento de plantas foi proposta inicialmente com a cultura do milho por Bernardo e Yu (2007), e apresenta resultados positivos no mapeamento de linhagens, que encontraram um conjunto de genes intimamente ligados ao florescimento (DURAND et al., 2012).

O objetivo desse trabalho foi identificar regiões genômicas para número de dias para o florescimento e perda de umidade após a maturidade fisiológica em linhagens de milho comum.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Germoplasma e Condições de Cultivo

O mapeamento associativo foi conduzido a partir de um painel de 72 linhagens elites do Programa de Melhoramento de Milho da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC).

O ensaio experimental para análise fenotípica foi realizado em delineamento em blocos incompletos com três repetições na safra agrícola 2014/15 na Fazenda Experimental, localizada em Cascavel/PR. A unidade experimental foi constituída de quatro ruas de quatro metros, com 20 plantas rua⁻¹ e o espaçamento entre linhas foi de 0,76 m. A bordadura lateral e entre os blocos foi semeada com híbrido comercial.

3.2.2 Fenotipagem e Análise dos Dados

O número de dias para florescimento feminino (DFF) e masculino (DFM) foi determinado no estágio R1 em parcela total, aferindo-se a data quando 50% + uma das plantas estavam com emissão de pólen e estilos-estigmas expostos.

As coletas das espigas para a determinação do teor de umidade iniciaram-se no momento que as linhagens mais precoces atingiram o estágio R6 (maturação fisiológica) e apresentavam em torno de 30% de umidade. Três espigas foram amostradas aleatoriamente nas observações, com umidade estabelecida em determinador de umidade automático tipo 999 ES Motomco®, com dial máximo de 35,8 %. As espigas foram coletas sem desprendimento da palha, colocadas em sacos plásticos de rede “tipo cebola”, etiquetadas e transportadas rapidamente a um ambiente protegido, para aferição da umidade. No total, sete coletas foram realizadas em intervalos de quatro dias, totalizando 28 dias de anotações para umidade de grãos. Os percentuais de umidade dos grãos para as sete amostragens realizadas foram tabuladas em gráfico visando estimar a área abaixo da curva de umidade (AACUM) empregando-se metodologia descrita por Shaner e Finney (1977).

Os dados de DFM, DFF e AACUM foram submetidos à análise genotípica pelo procedimento de REML/BLUP (máxima verossimilhança residual ou restrita/ melhor predição linear não viciada), que conduzem a estimação e predição mais precisas de parâmetros genéticos e valores genéticos, respectivamente (RESENDE, 2008). Todos os dados eram balanceados e por isso os efeitos do modelo não precisaram ser testados via testes F da Análise de Deviance.

A estimação dos parâmetros genéticos utiliza o valor fenotípico (y) conhecido, para a predição dos valores genéticos (VG) e dos valores genotípicos (VGp), que são variáveis aleatórias desconhecidas (RESENDE, 2002). O valor fenotípico pode ser expresso por $y = \mu + a + d + e$, em que y é o valor fenotípico temporário, μ é a média geral, a é o efeito aditivo, d é o efeito de dominância, e é o efeito de ambiente, $\mu + a$ é o valor genético aditivo, e $\mu + a + d = \mu + g$ é o valor genotípico.

Os parâmetros e valores genotípicos foram obtidos considerando o modelo 21 do software SELEGEN-REML/BLUP, adequado para seleção de genótipos com várias repetições e observações de médias, em único local, conforme modelo: $y = Xr + Zg + e$, em que y é o vetor de dados, r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral, g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios) e e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos (RESENDE, 2008).

3.2.3 Genotipagem

O DNA genômico das 72 linhagens do painel de associação foi obtido a partir de sementes utilizando-se o método descrito por McDonald (1994), sendo realizada a genotipagem com marcadores SNP com a Plataforma Axiom™ Genome-Wide Maize600 Array. Do total de 616.201 marcadores SNP contidos no Array, foram empregados 418.287 marcadores que apresentaram resultados de alta resolução, e polimórficos nas amostras utilizadas, para a realização das análises.

3.2.4. Análise da Estrutura Populacional

Para evitar associações espúrias entre marcadores SNPs e as características avaliadas, foi realizada inicialmente a análise de estrutura da população. A análise foi realizada utilizando o algoritmo markov chain monte carlo (MCMC) para o modelo bayesiano generalizado, empregando-se programa InStruct (GAO et al., 2007). O algoritmo implementado no programa InStruct não necessita da pressuposição de equilíbrio de Hardy-Weinberg na população.

Para se obter uma boa convergência dos dados, foram estimadas as frequências alélicas para cada número de subpopulações simuladas (k), e na sequência estimou-se a probabilidade da linhagem i pertencer a uma população k . Para esse fim, foi empregados burn-in de 5000 simulações com 50 mil repetições (run length periods), testando-se oito possibilidades de sub-

agrupamentos. O melhor número de **k** é o que apresenta o menor valor no critério de informação da deviance (DIC) entre todos os **k** simulados.

3.2.5. Análise de Associação

A análise de associação entre os marcadores SNPs e os caracteres de interesse, DFM, DFF e AACUM foi realizada pelo emprego do programa computacional TASSEL versão 5.2.12 (BRADBURY et al., 2007), utilizando-se modelo linear misto (MLM) e de regressão múltipla Stepwise pelo aplicativo computacional JMP (SAS, 1990)

O MLM é representado por $y = XB + Qv + Iu + e$, onde **y** é o vetor dos valores fenotípicos, **X** é o vetor que representa os valores genotípicos de SNP, **B** é o vetor dos efeitos fixos dos genótipos, **Q** é a matriz estimada com a análise de estrutura da população, **v** é o vetor de efeitos fixos decorrentes das populações, **I** é matriz identidade, **u** é o vetor de efeitos aleatórios relacionados ao background genético e **e** é o vetor de erros aleatórios.

A significância das associações entre os marcadores SNP e os atributos fenotípicos DFM, DFF e AACUM foi determinada por meio da identificação dos maiores valores de $-\text{Log}^{10}(P)$. O $-\text{Log}^{10}(P)$ foram utilizados para a obtenção dos gráficos do tipo Manhattan Plot. Marcadores SNPs significativos na análise MLM foram utilizados na análise de regressão múltipla (stepwise), empregando-se o aplicativo computacional JMP (SAS, 1990), para obter um modelo linear contendo apenas marcadores não redundantes. Os caracteres fenotípicos DFM, DFF e AACUM foram considerados como variáveis dependentes, enquanto os dados genotípicos foram tratados como independentes. A análise foi baseada no seguinte modelo: $Y = a + b_1m_1 + b_2m_2 + + b_jm_j + + b_nm_n + d + e$, na qual a variação na variável dependente (Y = média da linhagem para o atributo fenotípico) encontra-se associada a uma função linear para o conjunto de variáveis independentes m_j , representados por último pelos marcadores SNP. Além disso, no modelo encontram-se inseridos b_j , que representam os coeficientes de regressão parcial relacionado de maneira empírica entre **Y** e m_j , **d** é o desvio da regressão, enquanto que **e** é o erro aleatório.

Como critério de seleção das variáveis independentes para comporem a análise de regressão múltipla foram empregados os marcadores SNP significativos entre 0,1% e 0,5% de probabilidade para os diferentes caracteres, previamente analisados pela MLM.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise Fenotípica

As médias dos valores genotípicos para o número de dias para o florescimento masculino (DFM), número de dias para o florescimento feminino (DFF) e área abaixo da curva de umidade (AACUM) foram de 68,2, 69,4 e 836 respectivamente. Os coeficientes de variação experimental não ultrapassaram 2,3%, e a estimativa de acurácia do ensaio, que mede a correlação entre valores genéticos preditos e valores verdadeiros, foram superiores a 98% (Tabela 9). Ensaios com acurácia acima de 90% são considerados de excelente precisão experimental (RESENDE, 2008).

Tabela 9 - Valores genotípicos preditos e parâmetros genéticos para os caracteres dias para floração masculina (DFM), dias para floração feminina (DFF) e área abaixo da curva de umidade (AACUM) estimados pelo REML/BLUP (SELEGEN, Modelo 21) avaliados em germoplasma de milho comum (Cascavel/PR, safra 2014/15)

Linhagem	DFM	DFF	AACUM	Linhagem	DFM	DFF	AACUM	Linhagem	DFM	DFF	AACUM
CDL01	67,9	69,6	829,1	CDL25	64,7	69,9	800,2	CDL49	64,7	66	811,5
CDL02	69,3	69,6	856,9	CDL26	68	63,4	747,5	CDL50	70,2	70,6	880,3
CDL03	68,3	69,3	829,8	CDL27	65,1	68,6	825,1	CDL51	68,9	68,9	795,2
CDL04	64,1	64,8	811,9	CDL28	71,2	71,3	857,8	CDL52	61,5	63,4	687,5
CDL05	64,1	65,4	861,4	CDL29	69,6	70,2	819,7	CDL53	65	66,3	802,1
CDL06	66,3	65,8	800,6	CDL30	64,4	64,7	791,7	CDL54	64,1	64,7	717,6
CDL07	68	70,3	849,8	CDL31	69,6	69,6	871,4	CDL55	64,7	65,4	858,9
CDL08	62,1	63,4	606,8	CDL32	69,9	70,9	875	CDL56	67	67,3	812,7
CDL09	69,3	73,2	885,3	CDL33	69,3	69,6	843,1	CDL57	58,5	58,5	654,1
CDL10	68	71,6	807,2	CDL34	70,3	74,2	885,6	CDL58	75,1	75,8	935
CDL11	65,4	65,7	844,7	CDL35	69,6	70	839,4	CDL59	72,2	79,4	928,7
CDL12	69,9	67,4	891,5	CDL36	67,6	67	857,9	CDL60	76,4	78,4	976,7
CDL13	69,6	70	825,5	CDL37	71,2	74,9	906,9	CDL61	77,7	79,7	900,5
CDL14	62,8	64,4	755,2	CDL38	69,6	69,6	880,1	CDL62	68,3	68,3	837,8
CDL15	66,7	67	762,5	CDL39	69,2	68,6	847	CDL63	65	65,3	868
CDL16	67	68,4	808,7	CDL40	72,8	72,9	903,7	CDL64	67,3	67,7	830
CDL17	70,2	78,1	886,2	CDL41	70,2	73,5	905	CDL65	70,2	70,3	797,5
CDL18	68,9	69,6	839,7	CDL42	70,6	74,8	883	CDL66	64,4	64,8	805
CDL19	72,8	75,5	911,4	CDL43	70,2	70,3	904	CDL67	68	67,4	839,8
CDL20	69,6	73,2	931	CDL44	66	69	826,2	CDL68	70,6	69,6	874,8
CDL21	67,3	65,7	811	CDL45	70,2	70,3	874	CDL69	69,6	72,9	809,7
CDL22	61,5	61,5	736,5	CDL46	67,6	67,7	817,7	CDL70	70,2	70,9	855,3
CDL23	69,6	72,2	836,8	CDL47	70,2	72,6	813,7	CDL71	65,3	67,3	832,3
CDL24	68,9	66	867,8	CDL48	68	69	829,1	CDL72	65	63,4	679,6
Média	68,2	69,4	836	Vg	11,9	18,5	4240,8	h ²	0,97	0,97	0,97
IC	1,3	1,5	25,6	Ve	0,9	1,2	369,2	CVgi%	5	6,2	7,7
Acurácia	0,98	0,98	0,98	Vf	12,8	19,7	4613,6	CVe%	1,3	1,5	2,3

IC = intervalo de confiança; Vg = variância genotípica; Ve = variância residual; Vf = variância fenotípica; h² = herdabilidade; CVgi% = coeficiente de variação genotípica; CVe% = coeficiente de variação residual.

Os valores genotípicos para DFM variaram de 58,5 a 77,7 dias, com intervalo de confiança de 1,3 dias, sendo próximo ao obtido para DFF de 58,5 a 79,7 dias, com intervalo de confiança de 1,5 dias, e para AACUM a amplitude foi de 606,4 a 976,9, com intervalo de confiança de 25,6 (Tabela 9). De maneira geral, os valores genotípicos foram semelhantes às médias fenotípicas, às quais podem ser justificadas pela elevada acurácia do experimento e alta relação entre variação genética e residual (CV_{gi}/CV_e), denotando a predominância dos efeitos genéticos em relação aos de ambiente para a determinação desses caracteres.

3.3.2 Análise de Modelo Linear Misto (MLM)

Pela análise de associação baseada na abordagem de modelo linear misto (MLM), que leva em consideração as informações de parentesco (K) e estrutura populacional (Q), detectou-se que marcadores SNP estão associados com os valores genotípicos anotados para DFM, DFF e AACUM nas 72 linhagens elites de milho.

Dos 408.848 marcadores selecionados considerando uma FMA (frequência mínima dos alelos) de 0,05, e distribuídos nos 10 cromossomos ($n = 10$) do milho, foram identificadas 1217, 1004 e 62 associações com DFM, DFF e AACUM (Tabela 10), respectivamente, tendo como valor de probabilidade de 0,05% ou $[-\log^{10}(P\text{-valor})] \geq 3,3$. Em termos percentuais, o número de associações aumentou consideravelmente para AACUM, considerando probabilidades entre 0,05 a 0,1%. Já em relação aos caracteres DFM e DFF houve um incremento de 215 e 275 associações, respectivamente. Independentemente das probabilidades, ambas as abordagens têm sido consideradas adequadas para trabalhos com mapeamento por associação.

Esses resultados revelam de maneira preliminar, que o caractere AACUM comparado com DFM e DFF, apesar de apresentarem forte correlação ($r_g=0,8$), apresenta comportamentos distintos quanto ao número e a distribuição nos diferentes cromossomos. Levando em consideração a probabilidade 0,05% para os caracteres avaliados (Tabela 10), as associações para DFM e DFF foram detectadas em todos os cromossomos, com predominância nos cromossomos 1 e 3. Para o caracteres AACUM as associações ocorreram predominantemente nos cromossomos 5 e 6, com demais grupos de ligação, excetuando os cromossomos 2, 4 e 8.

Com os valores estimados de $-\log^{10}(P\text{-valor})$ para cada marcador SNP associados aos caracteres DFF, DFM e AACUM, foram construídos gráficos denominados de Manhattan plot (Figura 3). Nesse gráfico, as coordenadas genômicas (marcadores SNP) encontram-se contidas no eixo X, com o $-\log^{10}(P\text{-valor})$ para cada SNP apresentado no eixo Y, o que significa que cada ponto do Manhattan plot refere-se a um SNP. Pelos resultados, contidos na Figura 3 e que já

foram descritos na Tabela 10, constata-se ampla variação de valores de probabilidade (P-valor), o que é de se esperar, pois o gráfico apresenta a informação para todos os marcadores SNP distribuídos em todas as regiões genômicas das 72 linhagens avaliadas.

Tabela 10 - Associações detectadas pelo método MLM nos diferentes cromossomos de milho e respectivas $[-\log^{10}(\text{P-valor})]$

Cromossomo	DFM		DFF		AACUM	
	> 3,3	3,3 a 3	> 3,3	3,3 a 3	> 3,3	3,3 a 3
1	437	80	281	172	6	22
2	31	22	19	14	0	9
3	615	45	609	20	6	66
4	7	5	8	3	0	0
5	34	21	29	31	25	20
6	2	0	1	4	16	13
7	5	2	5	0	2	3
8	12	13	5	15	0	0
9	63	26	30	16	1	4
10	17	1	17	0	6	4
Total	1217	215	1004	275	62	141

DFM = dias para floração masculina; DFF = dias para floração feminina; AACUM = área abaixo da curva de umidade.

Considerando um P-valor mínimo de 0,05%, destacado no gráfico por uma linha paralela ao eixo x, detecta-se visualmente uma tendência para associações nos diferentes cromossomos para todos os caracteres. Pela análise dos caracteres DFM e DFF (Figura 3), detecta-se uma elevada concentração de pontos nos cromossomos 1, 3 e 9, acima da linha de corte.

Os marcadores SNP que apresentam maior coeficiente de determinação (0,346 a 0,378) para DFM, encontram-se distribuídos predominantemente no cromossomo 3, seguido pelos cromossomos 1, 9 e 10 (Tabela 11). Com exceção dos alelos A e B do marcador SNP20067 (localizado no cromossomo 5), que promove redução e aumento do número de dias para o florescimento masculino, respectivamente, todos os demais alelos de marcadores associados com DFM, promovem acréscimo diferencial da magnitude para esse atributo fenotípico. Em relação aos marcadores do cromossomo 1 associados com DFM, constata-se que SNP30377, SNP30378 e SNP30379 localizam-se numa mesma região genômica. Além desse agrupamento, marcadores do cromossomo 3 podem ser distribuídos nos seguintes grupos: A) SNP205575, SNP205576 e SNP205577; B) SNP207624 e SNP207632; C) SNP208896, SNP208897, SNP208898, SNP208900, SNP208903 e SNP208911.

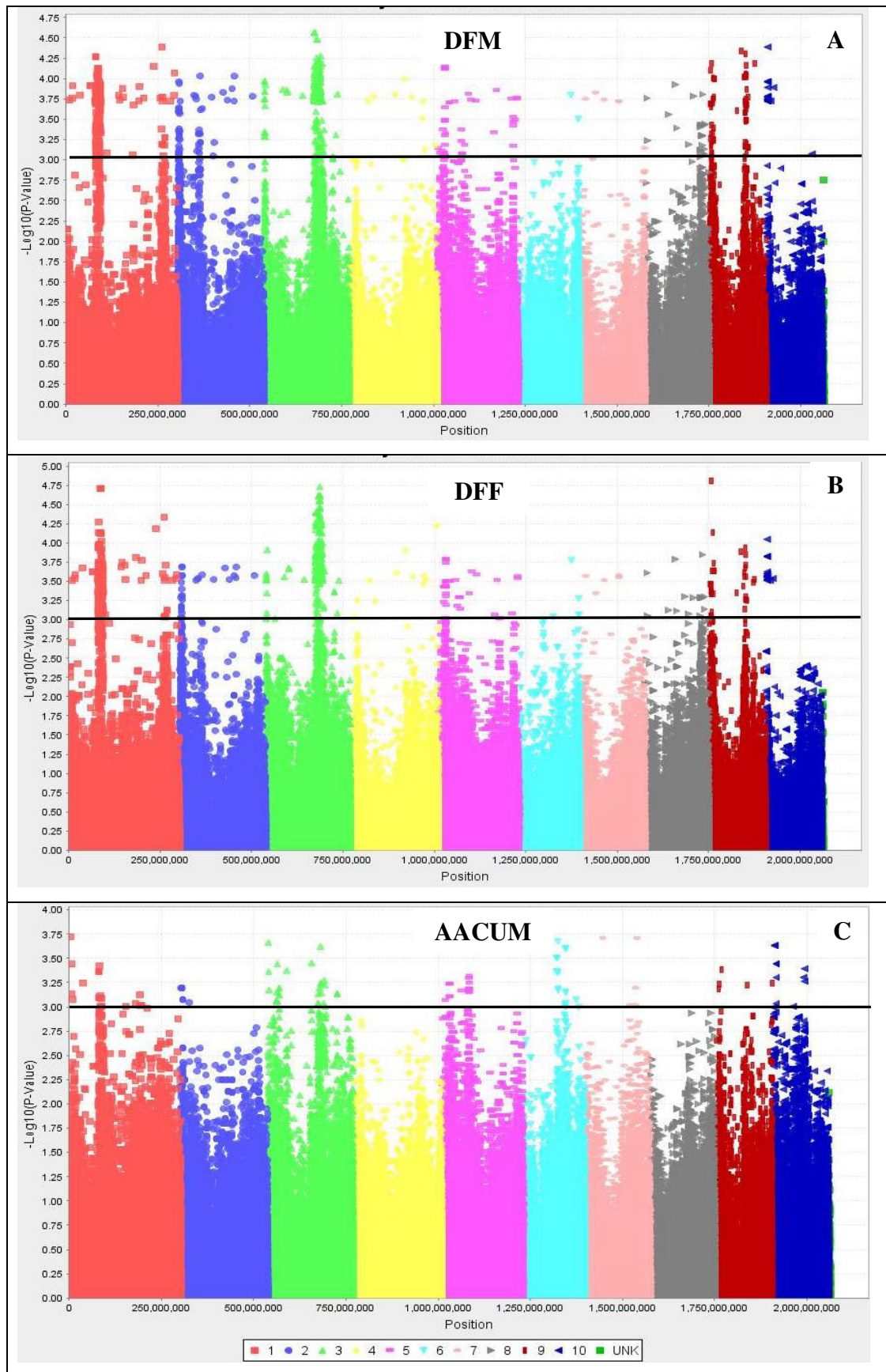


Figura 3 - Manhattan plot dos valores de significância das associações nos cromossomos de milho. (A) dias para o florescimento masculino (DFM), (B) dias para o florescimento feminino (DFF), e (C) área abaixo da curva de umidade (AACUM).

Tabela 11 - Associação de marcadores SNP com dias para florescimento masculino (DFM) que apresentam os vinte maiores coeficientes de determinação genotípicos

Marcador	Crom.	Posição	Distância (kb)	F	Prob.	R ²	Efeito alelo A	Efeito alelo B
SNP30377	1	80501096	0	11,55	0,005	0,35	9,27	12,67
SNP30378	1	80501147	0,1	11,55	0,005	0,35	12,67	9,27
SNP30379	1	80501166	0,1	11,55	0,005	0,35	9,27	12,67
SNP205575	3	137387675	0	12,49	0,003	0,378	9,56	12,83
SNP205576	3	137388596	0,9	12,49	0,003	0,378	9,56	12,83
SNP205577	3	137388601	0,9	12,49	0,003	0,378	9,56	12,83
SNP207359	3	143412818	6025,1	11,52	0,006	0,349	9,37	7,04
SNP207624	3	144339824	6952,1	12,23	0,003	0,37	9,49	11,84
SNP207632	3	144385393	6997,7	12,23	0,003	0,37	9,49	11,84
SNP208896	3	148280723	10893	11,41	0,006	0,346	11,77	9,46
SNP208897	3	148280762	10893,1	11,41	0,006	0,346	11,77	9,46
SNP208898	3	148280846	10893,2	11,41	0,006	0,346	9,46	11,77
SNP208900	3	148281005	10893,3	11,41	0,006	0,346	9,46	11,77
SNP208903	3	148281122	10893,4	11,41	0,006	0,346	9,46	11,77
SNP208911	3	148296482	10908,8	11,41	0,006	0,346	11,77	9,46
SNP208969	3	148540244	11152,6	11,42	0,006	0,346	9,45	11,62
SNP210573	3	154593697	17206	11,59	0,005	0,351	11,86	9,47
SNP320067	5	19450686	0	11,6	0,005	0,351	-3,66	1,77
SNP550493	9	87081218	0	11,78	0,005	0,357	7,84	7,31
SNP574797	10	2255084	0	11,94	0,004	0,362	8,88	8,89

Crom. = cromossomo; kb = kilobase; F = valor tabelado de F; Prob. = probabilidade; R² = coeficiente de regressão.

Com a seleção arbitrária dos cinco marcadores com maior R² em cada cromossomo, e tendo um P-valor máximo de 0,05%, verificou-se uma melhor distribuição das marcas em relação à identificação das associações, sem levar em consideração a localização cromossômica (Tabela 12), reduzindo a redundância da informação.

Mesmo com o aumento da abrangência de exploração da informação associada com esse atributo fenotípico, nos diferentes cromossomos, houve o predomínio das associações que promovem aumento do número de dias para o florescimento masculino. Contudo, foram identificados os marcadores SNP99996 (R²=0,321) e SNP140194 (R²=0,313), mapeados no cromossomo 2, que influenciam esse caractere pela diminuição do número de dias para o florescimento masculino. Já os alelo A dos marcadores SNP320067 (cromossomo 5; R²=0,351), SNP426703 (cromossomo 6; R²=0,22) e SNP553215 (cromossomo 9; R²=0,326) tem efeito no sentido de reduzir a magnitude de DFM, e o alelo B para aumentar o número de dias para o florescimento masculino (Tabela 12).

Tabela 12 - Associação de marcadores SNP com dias para o florescimento masculino (DFM) que apresentam os maiores coeficientes de determinação genotípicos nos diferentes cromossomos

Marcador	Crom.	Posição	Distância (kb)	F	Prob.	R ²	Efeito alelo A	Efeito alelo B
SNP30377	1	80501096	0	11,55	0,005	0,35	9,27	12,67
SNP30378	1	80501147	0,05	11,55	0,005	0,35	12,67	9,27
SNP30379	1	80501166	0,07	11,55	0,005	0,35	9,27	12,67
SNP31857	1	86453728	5952,6	11,1	0,008	0,336	10,05	7,75
SNP72564	1	237745765	157244,7	11,19	0,007	0,339	9,58	11,46
SNP99996	2	5683041	0	10,6	0,011	0,321	-7,75	-2,01
SNP100782	2	7002411	1319,4	10,53	0,012	0,319	6,19	8,13
SNP121034	2	63666312	57983,3	10,82	0,009	0,328	8,4	9,62
SNP140194	2	150627595	144944,6	10,33	0,013	0,313	-2,77	-7,66
SNP141716	2	156518238	150835,2	10,8	0,009	0,327	9,42	7,64
SNP205575	3	137387675	0	12,49	0,003	0,378	9,56	12,83
SNP205576	3	137388596	0,9	12,49	0,003	0,378	9,56	12,83
SNP205577	3	137388601	0,9	12,49	0,003	0,378	9,56	12,83
SNP207624	3	144339824	6952,1	12,23	0,003	0,37	9,5	11,84
SNP207632	3	144385393	6997,7	12,23	0,003	0,37	9,5	11,84
SNP257243	4	52260631	0	9,87	0,019	0,299	9,84	9,56
SNP260782	4	66936094	14675,5	10,06	0,016	0,305	8,26	8,13
SNP273546	4	125546880	73286,2	10,12	0,016	0,306	9,56	10,35
SNP279360	4	150464779	98204,1	10,71	0,01	0,324	10,54	9,06
SNP285500	4	170713249	118452,6	10,02	0,017	0,304	10,28	9,56
SNP320067	5	19450686	0	11,6	0,005	0,351	-3,66	1,77
SNP340876	5	83513348	64062,7	10,15	0,015	0,308	8,49	8,58
SNP358393	5	159520691	140070	10,28	0,014	0,311	9,21	10,15
SNP379755	5	214848833	195398,1	9,98	0,017	0,302	9,57	9,97
SNP380227	5	215517075	196066,4	10	0,017	0,303	9,6	10,36
SNP417963	6	144895218	0	10,08	0,016	0,305	9,62	9,09
SNP426703	6	164852725	19957,5	14,53	0,032	0,22	-4,39	0
SNP433301	7	15213713	0	9,95	0,018	0,301	9,6	8,7
SNP440379	7	42883819	27670,1	10,18	0,015	0,308	8,73	8,39
SNP444921	7	65689807	50476,1	9,93	0,018	0,301	9,59	9,13
SNP453829	7	105857557	90643,8	9,86	0,019	0,299	9,56	9,69
SNP453992	7	106382234	911685	9,87	0,019	0,299	9,56	9,37
SNP481205	8	6857610	0	9,98	0,017	0,302	10,19	9,51
SNP494051	8	64651755	57794,1	9,37	0,028	0,284	8,02	8,23
SNP498571	8	83936006	77078,4	10,5	0,012	0,318	8,28	9,59
SNP511931	8	132602495	125744,9	10,06	0,016	0,305	8,19	8,29
SNP521229	8	158091356	151233,7	10,12	0,016	0,307	8,75	9,85
SNP550493	9	87081218	0	11,78	0,005	0,357	7,84	7,31
SNP552273	9	93444892	6363,7	10,77	0,01	0,326	5,97	7,48
SNP553215	9	96668547	9587,3	10,77	0,01	0,326	-0,95	5,7
SNP554195	9	99848965	12767,7	10,77	0,01	0,326	7,1	9,61
SNP561432	9	124312989	37231,8	11,3	0,007	0,342	5,99	7,61
SNP574777	10	2250507	0	10,62	0,011	0,322	9,23	10,44
SNP574782	10	2251882	1,3	10,62	0,011	0,322	10,44	9,23
SNP574784	10	2252206	1,6	10,62	0,011	0,322	9,23	10,44
SNP574797	10	2255084	4,5	11,94	0,004	0,362	8,88	8,89
SNP579132	10	17680625	15430,1	10,39	0,013	0,315	9,7	8,45

Crom. = cromossomo; kb = kilobase; F = valor tabelado de F; Prob. = probabilidade; R² = coeficiente de regressão.

Com a seleção dos vinte marcadores com maior estimativa para o coeficiente de determinação (variação de 0,372 a 0,385) para DFF (Tabela 13), constata-se que todos promovem o aumento da expressão do caractere, isto é, estão envolvidos com aumento do número de dias para o florescimento, apresentando diferentes magnitudes conforme o alelo para o respectivo marcador SNP. Do total selecionado, dezessete pertencem ao cromossomo 3, e os remanescentes ao cromossomo 1. Com uma análise mais detalhada constata-se que os marcadores SNP31857, SNP31858 e SNP31859, localizam-se na mesma região genômica do cromossomo 1 e com efeitos semelhantes para o caractere DFM. No cromossomo 3 foi possível distribuir os marcadores com base em sua localização nos seguintes grupos: A) SNP207624 e SNP7632; B) SNP208896, SNP208897, SNP208898, SNP208900 e SNP208903; C) SNP208911, SNP208912, SNP208914, SNP208915, SNP208917 e SNP208919; D) SNP208940, SNP208942 e SNP208944.

Tabela 13 - Associação de marcadores SNP com dias para o florescimento feminino (DFF) que apresentam os vinte maiores coeficientes de determinação genotípicos

Marcador	Crom.	Posição	Distância (kb)	F	Prob.	R ²	Efeito alelo A	Efeito alelo B
SNP31857	1	86453728	0	12,99	0,002	0,383	13,88	9,39
SNP31858	1	86453849	0,1	12,99	0,002	0,383	13,88	9,39
SNP31859	1	86453885	0,1	12,99	0,002	0,383	9,39	13,88
SNP207624	3	144339824	0	12,65	0,002	0,373	12,38	15,55
SNP207632	3	144385393	45,6	12,65	0,002	0,373	12,38	15,55
SNP208896	3	148280723	3940,9	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208897	3	148280762	3940,9	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208898	3	148280846	3941	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09
SNP208900	3	148281005	3941,2	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09
SNP208903	3	148281122	3941,3	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09
SNP208911	3	148296482	3956,7	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208912	3	148300603	3960,8	13,06	0,002	0,385	12,28	16,45
SNP208914	3	148322156	3982,3	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09
SNP208915	3	148322197	3982,4	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208917	3	148350247	4010,4	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09
SNP208919	3	148369517	4029,7	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208924	3	148386495	4046,7	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09
SNP208940	3	148398036	4058,2	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208942	3	148399520	4059,7	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208944	3	148399889	4060,1	12,64	0,002	0,372	12,28	16,09

Crom. = cromossomo; kb = kilobase; F = valor tabelado de F; Prob. = probabilidade; R² = coeficiente de regressão.

Com a seleção arbitrária dos cinco marcadores com maior R^2 em cada cromossomo, e tendo um P-valor máximo de 0,05%, verificou-se uma melhor distribuição das marcas associadas com DFF (Tabela 14), ou melhor, reduzindo a redundância da informação. Continuou tendo predomínio de marcadores afetando o DFF, por meio do aumento da magnitude do atributo fenotípico conforme o alelo considerado. Contudo, por essa estratégia de exploração de resultados foi possível detectar outros marcadores que promovem a redução do número de dias para o florescimento feminino, o SNP140194 (cromossomo 2; $R^2 = 0,278$), SNP307771 (cromossomo 4; $R^2 = 0,337$) e SNP523409 (cromossomo 8; $R^2 = 0,254$), e seus respectivos alelos. Já o alelo A do marcador SNP320067 (cromossomo 5; $R^2=0,292$) tem efeito no sentido de reduzir a magnitude de DFF e o alelo B para aumentar o número de dias para o florescimento.

Os resultados de associação para os caracteres e DFM (Tabela 11) e DFF (Tabela 13), pelo método MLM, revelam a importância de regiões genômicas dos cromossomos 1 e 3 que encontram-se associadas com o aumento do número de dias para o florescimento masculino e feminino. Além disso, os resultados permitem detectar a existência de marcadores comuns (SNP207624, SNP207632, SNP208896, SNP208897, SNP208898, SNP208900, SNP208903 e SNP208911) para ambos os caracteres, sendo possível aventar a existência de pelo menos um QTL putativo comum para florescimento masculino e feminino. A existência de regiões genômicas com associação para esses atributos (BUCKLER et al., 2009; SALVI; CASTELLETTI; TUBEROSA, 2010) têm como uma provável explicação a coevolução, isto é, a interdependência desses atributos da planta como forma de garantir a perpetuação da espécie. O milho é uma espécie monoica, e a fecundação cruzada é um dos mecanismos empregados como força para evitar os efeitos da depressão endogâmica (GOODMAN; SMITH, 1987; MAGALHÃES; DURÕES, 2008). Contudo, a existência de considerável taxa de autofecundação (FANCELLI, 2002), revela a importância da sincronia do florescimento masculino e feminino como forma de garantir a produção de novas progênes. Além disso, a existência de regiões genômicas distintas pode evidenciar a importância de mecanismos genéticos como a pleiotropia, em que a herança de dois ou mais “produtos primários distintos” são provenientes de um mesmo gene e responsáveis por diferentes fenótipos (GRUNEBERG, 1938; STEARNS, 2010).

Tabela 14 - Associação de marcadores SNP com dias para o florescimento feminino (DFF) que apresentam os maiores coeficientes de determinação genotípicos nos diferentes cromossomos

Marcador	Crom.	Posição	Distância (kb)	F	Prob.	R ²	Efeito alelo A	Efeito alelo B
SNP30894	1	82635267	0	11,58	0,005	0,341	11,45	5,98
SNP31857	1	86453728	3818,5	12,99	0,002	0,383	13,88	9,39
SNP31858	1	86453849	3818,6	12,99	0,002	0,383	13,88	9,39
SNP31859	1	86453885	3818,6	12,99	0,002	0,383	9,39	13,88
SNP72564	1	237745765	155110,5	11,31	0,006	0,333	12,58	15,27
SNP121034	2	63666312	0	9,66	0,026	0,279	11,73	12,65
SNP134362	2	125714019	62047,7	9,75	0,021	0,287	12,43	11,14
SNP140194	2	150627595	86961,3	9,44	0,026	0,278	-5,8	-10,79
SNP141716	2	156518238	92851,9	9,77	0,02	0,288	12,5	11
SNP158103	2	205845705	142179,4	9,45	0,026	0,278	12,54	13,47
SNP207624	3	144339824	0	12,65	0,002	0,373	12,38	15,55
SNP207632	3	144385393	45,56	12,65	0,002	0,373	12,38	15,55
SNP208896	3	148280723	3940,9	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208897	3	148280762	3940,9	12,64	0,002	0,372	16,09	12,28
SNP208912	3	148300603	3960,8	13,06	0,002	0,385	12,28	16,45
SNP273546	4	125546880	0	9,54	0,024	0,281	12,55	13,51
SNP279360	4	150464779	24917,9	10,44	0,012	0,308	13,7	11,69
SNP285500	4	170713249	45166,4	9,39	0,027	0,277	13,34	12,57
SNP296920	4	201542878	75995,9	9,43	0,026	0,278	11,9	12,67
SNP307771	4	235008648	109461,8	11,43	0,006	0,337	-9,52	-8,62
SNP320067	5	19450686	0	9,92	0,018	0,292	-5,78	0,08
SNP342628	5	90974458	71523,8	9,59	0,023	0,283	13,45	12,61
SNP345736	5	103661654	84210,9	9,47	0,026	0,279	12,03	12,89
SNP379755	5	214848833	195398,1	9,4	0,027	0,277	12,59	13,38
SNP380227	5	215517075	196066,4	9,32	0,029	0,275	12,58	11,96
SNP417963	6	144895218	0	10,02	0,017	0,295	12,79	11,56
SNP433301	7	15213713	0	9,41	0,027	0,277	12,54	13,86
SNP440379	7	42883819	27670,1	8,75	0,045	0,258	10,16	10,16
SNP444921	7	65689807	50476,1	9,25	0,031	0,272	12,59	12,64
SNP453829	7	105857557	90643,8	9,43	0,026	0,278	12,53	13,67
SNP453992	7	106382234	91168,5	9,36	0,028	0,276	12,65	13,32
SNP481205	8	6857610	0	9,53	0,024	0,281	13,67	12,47
SNP498571	8	83936006	77078,4	10,09	0,016	0,297	10,88	12,58
SNP505018	8	110246395	103388,8	13,49	0,050	0,199	8,52	0
SNP521229	8	158091356	151233,7	10,25	0,014	0,302	10,94	13,36
SNP523409	8	163582607	156724,9	8,61	0,05	0,254	-0,15	-6,42
SNP530783	9	6299512	0	21,9	0,002	0,323	5,5	0
SNP533008	9	12721563	6422,1	9,90	0,018	0,292	10,92	12,47
SNP550493	9	87081218	80781,7	10,36	0,013	0,305	9,32	8,07
SNP554195	9	99848965	93549,5	10,26	0,014	0,302	9,68	12,66
SNP554300	9	100233143	93933,6	9,82	0,02	0,289	11,59	12,84
SNP574777	10	2250507	0	10,2	0,015	0,3	12,05	13,6
SNP574782	10	2251882	1,3	10,2	0,015	0,3	13,6	12,05
SNP574784	10	2252206	1,6	10,2	0,015	0,3	12,05	13,6
SNP574797	10	2255084	4,5	10,87	0,009	0,32	10,68	10,9
SNP574810	10	2257612	7,1	9,57	0,024	0,282	13,3	12,13

Crom. = cromossomo; kb = kilobase; F = valor tabelado de F; Prob. = probabilidade; R² = coeficiente de regressão.

Tabela 15 - Associação de marcadores SNP com área abaixo da curva de umidade (AACUM) que apresentam os vinte maiores coeficientes de determinação genotípicos

Marcador	Crom.	Posição	Distância (kb)	F	Prob.	R ²	Efeito alelo A	Efeito alelo B
SNP2920	1	6782564	0	9,02	0,036	0,213	-2,69	-63,19
SNP15630	1	38006781	31224,2	8,45	0,056	0,2	151,12	177,8
SNP30377	1	80501096	73718,5	8,79	0,043	0,208	140,32	183,38
SNP30378	1	80501147	73718,6	8,79	0,043	0,208	183,38	140,32
SNP30379	1	80501166	73718,6	8,79	0,043	0,208	140,32	183,38
SNP30902	1	82698127	75915,6	8,97	0,038	0,212	139,86	180,64
SNP170876	3	2383952	0	8,79	0,043	0,207	171,24	145,4
SNP185609	3	51165913	48781,9	8,84	0,042	0,209	175,64	142,81
SNP200433	3	118908827	116524,9	9,06	0,035	0,214	-34	-74,07
SNP207297	3	143113099	140729,1	9,56	0,024	0,226	149,43	186,35
SNP207624	3	144339824	141955,9	8,45	0,056	0,2	140,54	166,28
SNP207632	3	144385393	142001,4	8,45	0,056	0,2	140,54	166,28
SNP210324	3	153765908	151381,9	8,53	0,053	0,201	160,21	134,01
SNP210592	3	154627927	152243,9	8,4	0,059	0,198	171,08	144,09
SNP337562	5	71853037	0	8,61	0,05	0,203	93,1	38,4
SNP337578	5	71898318	45,2	9,82	0,02	0,232	65,95	116,78
SNP401360	6	95460203	0	9,73	0,021	0,23	74,07	24,86
SNP550493	9	87081218	0	8,38	0,06	0,198	101,06	85,07
SNP595323	10	86757710	0	8,49	0,055	0,2	0,24	47,04
SNP595325	10	86765879	8,1	8,88	0,041	0,209	-39,09	10,19

Crom. = cromossomo; kb = kilobase; F = valor tabelado de F; Prob. = probabilidade; R² = coeficiente de regressão.

No gráfico de Manhattan plot, para o caractere AACUM (Figura 3) detecta-se uma grande concentração de pontos no cromossomo 3, seguido por aqueles dos 1, 5, 10, 6 e 9, em ordem decrescente. Pela análise dos marcadores SNP com maior significância para esse atributo fenotípico (Tabela 15), todos os marcadores e respectivos alelos, com exceção do SNP2920, SNP200433 e SNP595325, promovem aumento do número de dias para o florescimento. Os alelos A e B dos marcadores SNP2920 e SNP200433, mapeados nos cromossomos 1 e 3, respectivamente, promovem a redução da umidade de grãos. Já para o marcador SNP595325, localizado no cromossomo 10, os alelos A e B estimulam a maior e a menor perda de umidade, respectivamente. Diferente do que foi detectado nos caracteres DFM e DFF, os marcadores associados com AACUM apresentaram maior distribuição pelo genoma, isto é, menor número de grupos de marcadores para uma mesma região genômica. Contudo, os marcadores SNP30377, SNP30378 e SNP30379, pertencentes ao cromossomo 1, e os marcadores SNP207624 e SNP207632 pertencentes ao cromossomo 3, foram agrupados por estarem em mesma região genômica e apresentarem efeito para menor perda de umidade de grãos.

Tabela 16 - Associação de marcadores SNP com área abaixo da curva de umidade (AACUM) que apresentam os maiores coeficientes de determinação genotípicos nos diferentes cromossomos

Marcador	Crom.	Posição	Distância (kb)	F	Prob.	R ²	Efeito alelo A	Efeito alelo B
SNP2920	1	6782564	0	9,02	0,036	0,212	-2,69	-63,19
SNP30377	1	80501096	73718,5	8,79	0,043	0,207	140,32	183,38
SNP30378	1	80501147	73718,6	8,79	0,043	0,207	183,38	140,32
SNP30379	1	80501166	73718,6	8,79	0,043	0,207	140,32	183,38
SNP30902	1	82698127	75915,6	8,97	0,038	0,211	139,86	180,64
SNP170356	3	1560323	0	15,4	0,022	0,181	-114,97	0
SNP170876	3	2383952	823,6	8,79	0,043	0,207	171,24	145,4
SNP185609	3	51165913	49605,6	8,84	0,042	0,208	175,64	142,81
SNP200433	3	119000000	117439,7	9,06	0,035	0,213	-34	-74,07
SNP207297	3	143000000	141439,7	9,56	0,024	0,225	149,43	186,35
SNP337493	5	71718465	0	16,36	0,015	0,192	-54,02	0
SNP337495	5	71718818	0,3	16,36	0,015	0,192	54,02	0
SNP337499	5	71719108	0,6	16,36	0,015	0,192	54,02	0
SNP337562	5	71853037	134,5	8,61	0,05	0,203	93,1	38,40
SNP337578	5	71898318	179,8	9,82	0,02	0,231	65,95	116,78
SNP401360	6	95460203	0	9,73	0,021	0,229	74,07	24,86
SNP407896	6	116000000	20539,8	15,1	0,025	0,178	-50,08	0
SNP407914	6	116000000	20539,8	15,1	0,025	0,178	-50,08	0
SNP407922	6	116000000	20539,8	15,1	0,025	0,178	50,08	0
SNP407925	6	116000000	20539,8	15,1	0,025	0,178	50,08	0
SNP441618	7	47581826	0	15,67	0,019	0,184	-48,4	0
SNP463961	7	141000000	93418,2	15,66	0,02	0,184	-56,21	0
SNP534511	9	17232436	0	13,91	0,041	0,164	44,27	0
SNP575592	10	4896397	0	15,22	0,023	0,179	45,11	0
SNP575595	10	4896514	0,1	15,22	0,023	0,179	45,11	0
SNP576935	10	9466318	4569,9	14,22	0,036	0,167	-48,64	0
SNP576942	10	9471660	4575,3	14,22	0,036	0,167	-48,64	0
SNP595325	10	86765879	81869,5	8,88	0,041	0,209	-39,09	10,19

Crom. = cromossomo; F = valor tabelado de F; Prob. = probabilidade; R² = coeficiente de regressão.

Pela seleção dos marcadores com os maiores valores para os coeficientes de determinação por cromossomo (Tabela 16), e que apresentam P-valor máximo de 0,005% associados com AACUM, verificou-se agrupamento de marcadores com associação numa mesma região genômica dos cromossomos 1 (SNP30857, SNP30858 e SNP30859), 5 (SNP337493, SNP337495 e SNP337499), 6 (SNP407914, SNP407922 e SNP407925) e em duas do cromossomo 10 (SNP575592 e SNP575595; SNP576935 e SNP576942). Esse resultado evidência a ocorrência de redundância de marcadores dentro do mesmo grupo de desequilíbrio de ligação.

Em relação aos efeitos dos marcadores dos SNPs (Tabela 16), constatou-se que, diferente do que foi detectado nos resultados das análises de MLM para os atributos DFM e DFF, houve a predominância por associações do alelo A para aumento ou para redução da expressão da AACUM, com o alelo B em efeito nulo. A redução da magnitude dos valores de AACUM é desejável, pois permite a colheita antecipada, e a identificação desses marcadores é de fundamental importância para fins de seleção genômica, visando o desenvolvimento de linhagens precoces. Nesse contexto, verificou-se que ambos os alelos dos marcadores SNP2920 e SNP200433, mapeados respectivamente nos cromossomos 1 e 3, influenciam a expressão fenotípica por meio do aumento da perda umidade, isto é, para redução dos valores de AACUM. Já os alelos de marcadores distribuídos nos cromossomos 3 (SNP170356), 5 (SNP337493), 6 (SNP407896 e SNP407914), 7 (SNP441618 e SNP463961) e 10 (SNP576935, SNP576942) promovem o aumento da perda de umidade em um dos alelos, e de efeito nulo no outro.

Os marcadores SNP207624 e SNP207632, localizados em mesma região genômica do cromossomo 3 (Tabela 15), associados com o aumento da magnitude para AACUM também foram significativos para o aumento do número de dias de florescimento masculino (Tabela 11) e feminino (Tabela 13). Além disso, o marcador SNP550493, mapeado no cromossomo 9 (Tabela 15) para AACUM, também encontra-se associado com o aumento do número de dias para o florescimento masculino (Tabela 11) e feminino (Tabela 14). Resultados que podem levantar a hipótese da existência de um QTL putativo comum para esses caracteres altamente correlacionados.

Outros autores encontraram outras regiões cromossômicas ligadas ao florescimento, mas todos citam QTLs associados ao cromossomo 1 e/ou ao 3. Pela técnica de mapeamento por intervalo, para o florescimento feminino, QTLs foram encontrados nos cromossomos 1 e 9 (RAGOT et al., 1995), e nos 1, 8 e 9 (KOZUMPLIK et al., 1997). E considerando a média de floração, QTLs foram encontrados nos cromossomos 1, 3, 8 e 10 (CHARDON et al., 2005). Ribaut et al. (1996) estudaram a seleção de genótipos de milho tolerantes a seca, e identificaram QTLs envolvidos na expressão do florescimento sob seca distribuídos nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 8, 9 e 10.

3.3.3 Análise de Stepwise

Com o intuito de diminuir a redundância de informação das associações detectadas pela análise de MLM (Tabela 10), foram utilizados os marcadores SNP com diferentes significâncias para DFM (P-valor >0,02%), DFF (P-valor > 0,05%) e AACUM (P-valor > 0,5%) e submetidas

à análise de regressão de stepwise pelo programa JMP (SAS, 1990). Segundo Schuster e Cruz (2004), por esse método estatístico, testa-se o modelo que melhor explique a variação de cada caractere, incluindo variáveis principais associadas, sem redundantes. A primeira variável a ser considerada na análise de regressão, é aquela de mais alto coeficiente de correlação, e a seleção da sequência de entrada dos preditores na equação exploratória é feita estatisticamente, que seleciona os SNPs que estão associados com o fenótipo por meio da adição e teste F do SNP no modelo base. A explicação para adoção dessa estratégia de análise refere-se ao número de marcadores significativos associados aos atributos fenotípicos de interesse e pela limitação de 1000 marcas que podem ser analisadas pelo programa JMP.

Com o modelo completo ($R^2=0,79$) obtido a partir da análise de stepwise para o caractere DFM (Tabela 17) foi possível verificar a inclusão de marcadores mapeados nos cromossomos 3, 1 e 2, em ordem decrescente em relação ao número. No cromossomo 3, os alelos A dos marcadores SNP205683 e SNP208896 encontram-se associados com o aumento do número de dias para o florescimento masculino, enquanto que os alelos B para a sua redução. Já para o alelo A do marcador SNP197155, também pertencente ao cromossomo 3, o efeito é para redução da expressão do atributo fenotípico, e o seu alelo alternativo encontra-se associado com o aumento da magnitude do atributo fenotípico. Em relação aos marcadores do cromossomo 1, os alelos A dos marcadores SNP30378 e SNP7453, promove aumento e redução, respectivamente, para número de dias para o florescimento masculino. Pela comparação dos marcadores incluídos no modelo completo de stepwise e a análise individual das marcas pelo MLM, constata-se a concordância para SNP30378 e SNP208896, revelando a importância dessas marcas para explicação relacionada ao florescimento masculino.

Para o caractere DFF (Tabela 17), constata-se que os marcadores incluídos no modelo completo ($R^2=0,93$) encontram-se mapeados nos cromossomos 1 e 3. Os alelos A dos marcadores SNP33060, SNP205762, SNP210455, SNP209980, SNP33130 e SNP208477, aumentam o número de dias para o florescimento feminino, enquanto que o alelo alternativo para os respectivos marcadores promovem a redução. Já para o efeito do alelo A do marcador SNP207314 detectou-se redução e para o alelo B o aumento do número de dias para florescimento feminino. Dos marcadores selecionados pelo modelo não houve concordância com aqueles marcadores significativos pelo MLM, empregando-se uma abordagem univariada, isto é, considerando os marcadores individualmente.

Tabela 17 - Denominação e posição dos marcadores SNP nos respectivos cromossomos, efeito e porcentagem da variância fenotípica explicada pelos marcadores (R^2) baseado na análise de regressão múltipla stepwise para DFM, DFF e AACUM

Característica	Marcador	Posição	Cromossomo	Efeito	Probabilidade	R^2 Acumulado
DFM	SNP205683	137683421	3	-1,51	0,0003	0,24
	SNP30378	80501147	1	-1,94	0,0001	0,45
	SNP197155	105353101	3	1,39	0,0012	0,56
	SNP208896	148280723	3	-0,93	0,0004	0,67
	SNP7453	17510426	1	0,63	0,0006	0,75
	SNP101841	9360726	2	0,49	0,0047	0,79
DFF	SNP33060	90789962	1	-0,125	0,0001	0,53
	SNP207314	143167952	3	2,92	0,0031	0,66
	SNP205762	138121855	3	-4,13	0,0013	0,77
	SNP210455	154091253	3	-0,231	0,0003	0,87
	SNP209980	151942945	3	-0,72	0,0007	0,92
	SNP33130	90955306	1	-1,67	0,0029	0,93
	SNP208477	147010907	3	-0,6	0,0029	0,93
AACUM	SNP207297	143113099	3	21,55	0,0147	0,14
	SNP180097	31332458	3	22,6	0,0345	0,23
	SNP587139	55518826	10	78,53	0,0159	0,34
	SNP30378	80501147	1	-33,5	0,0221	0,43
	SNP170876	2383952	3	-16,84	0,0475	0,49
	SNP534511	17232436	9	-16,66	0,0296	0,56

DFM = dias para floração masculina; DFF = dias para floração feminina; AACUM = área abaixo da curva de umidade.

Pela análise de stepwise para AACUM (Tabela 17), constata-se que três dos seis marcadores incluídos no modelo completo ($R^2=0,79$) encontram-se mapeados no cromossomo 3, e os demais nos cromossomos 1, 9 e 10. Os alelos A dos marcadores SNP207297, SNP180097 e SNP587139 encontram-se associados com a redução da expressão para esse atributo, e os respectivos alelos alternativos com sua redução. Já os efeitos dos alelos A para os marcadores SNP30378, SNP170876 e SNP534511 com aumento da magnitude desse caractere, isto é, com a menor perda de umidade. Pela comparação dos resultados, baseado nos critérios estabelecidos para ambas às metodologias, os marcadores SNP207297, SNP30378, SNP170876 e SNP534511 foram concordantes quanto à importância na determinação da AACUM.

Em relação aos marcadores significativos pela análise de stepwise nos diferentes cromossomos (Tabela 17), detecta-se a existência de duas regiões genômicas do cromossomo 1 envolvidas na determinação desses caracteres relacionados a maturação de grãos em milho. Os alelos do marcador SNP7453, que se encontra associado à DFM, representa uma das regiões genômicas. Já na outra região genômica do cromossomo 1, observa-se a existência do marcador SNP30378, que foi significativo para DFM e AACUM, e dos marcadores SNP33060 e SNP33130 muito próximos (165,3 kilobases), e que os seus respectivos alelos, se encontram associados com DFF. Para o cromossomo 3, observa-se duas regiões genômicas envolvidas na

determinação da AACUM e representada pelos marcadores SNP170876 e SNP180097; uma terceira associada com DFM (marcador SNP197155); e uma quarta região genômica ampla que têm influência sobre todos os atributos fenotípicos avaliados. Dentre os marcadores dessa região genômica ampla, constata-se que os marcadores SNP205683 e SNP205762, envolvidos na determinação do DFM e DFF, respectivamente, encontram-se relativamente próximos, ou melhor, distam um do outro em 438,4 kb. Além desses, os marcadores SNP207314 e SNP207297, mapeados também no cromossomo 3 e ainda mais próximos (54,9 kb), encontram-se associados com DFF e AACUM, respectivamente.

A utilização da análise de regressão de stepwise é geralmente limitada pelo grande número de SNPs (CANTOR; LANGE; SINSHEIMER, 2010), mas a sua aplicação associada com metodologia que filtre marcadores, pode reduzir os efeitos com falsos positivos e na estimação dos erros (MOTYER et al., 2011; FERNANDO; GARRICK, 2013). Pela análise preliminar da metodologia de MLM e uso desses marcadores significativos na análise de stepwise, verificou-se que houve concordância dos resultados (Tabelas 11, 13 e 15), permitindo confirmar a importância de regiões genômicas pertencentes aos cromossomos 1 e 3. Assim, torna possível levantar a hipótese de que a elevada correlação genética positiva encontra-se fortemente associada com ligação gênica, que segundo Falconer (1987), representa a tendência de genes serem transmitidos conjuntamente durante a meiose, sendo uma causa transitória para correlação. Contudo, não se pode descartar a hipótese de pleiotropia, que é uma propriedade em que genes afetam mais de um caractere, sendo uma causa permanente de correlação (GRIFFITHS, 1967). Com isso, o conhecimento do grau de associação existente entre os caracteres agronômicos e/ou marcadores moleculares são de importância para o melhorista, porque a seleção sobre determinado caractere pode alterar o comportamento do outro.

3.4 CONCLUSÕES

As linhagens de milho apresentam ampla variabilidade genética para florescimento e perda de umidade de grãos.

O número de associações significativas é dependente da natureza genética do atributo fenotípico e da abundância de regiões genômicas com polimorfismo.

A seleção arbitrária de marcadores significativos por cromossomo permite aumentar a eficiência na identificação de regiões genômicas de interesse pela redução da redundância de informação.

A maturidade em milho é determinada provavelmente por QTLs, localizados em regiões específicas do genoma, e que ligação gênica e/ou pleiotropia sejam as causas de correlação genética.

As regiões genômicas associadas com floração e perda de umidade de grãos podem aumentar ou reduzir a magnitude desses atributos, ou até mesmo ter efeito nulo, indicando o potencial de uso de marcadores significativos na obtenção de germoplasma com a maturidade requerida pelo melhorista.

A estratégia de análise, combinando-se modelo linear misto com a de regressão múltipla de stepwise, possibilita aumentar a eficiência no processo de identificação de marcadores relevantes, e descarte dos que apresentam informação redundante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNARDO, R.; YU, J. M. Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 1082-1090, 2007.
- BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D. E.; CASSTEVENS, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Oxford Journals Science & Mathematics Bioinformatics**, Okfords, v. 23, n. 19, p. 2633-2635, 2007.
- BUCKLER, E. S.; HOLLAND, J. B.; BRADBURY, P. J.; ACHARYA, C. B.; BROWN, P. J.; BROWNE, C.; ERSOZ, E.; FLINT-GARCIA, S.; GARCIA, A.; GLAUBITZ, J. C.; GOODMAN, M. M.; HARJES, C.; GUILL, K.; KROON, D. E.; LARSSON, S.; LEPAK, N. K.; LI, H.; MITCHELL, S. E.; PRESSOIR, G.; PEIFFER, J. A.; ROSAS, M. O.; ROCHEFORD, T. R.; ROMAY, M. C.; ROMERO, S.; SALVO, S.; VILLEDA, H. S.; SILVA, S.; SUN, Q.; TIAN, F.; UPADYAYULA, N.; WARE, D.; YATES, H.; YU, J.; ZHANG, Z.; KRESOVICH, S.; MCMULLEN, M. D. The genetic architecture of maize flowering time. **Science**, Washington, v. 325, p. 714-718, 2009.
- CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. Prioritizing GWAS results: a review of statistical methods and recommendations for their application. **The American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 86, n. 1, p. 6-22, 2010.
- CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; BENIN, G. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento vegetal**. Pelotas: UFPel, 2004. 142p.
- CHARDON, F.; HOURCADE, D.; COMBES, V.; CHARCOSSET, A. Mapping of a spontaneous mutation for early flowering time in maize highlights contrasting allelic series at two-linked QTL on chromosome. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 1, p. 1-11, 2005.
- CHARDON, F.; VIRLON, B.; MOREAU, L.; FALQUE, M.; JOETS, J.; DECOUSSET, L.; MURIGNEUX, A.; CHARCOSSET, A. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and syteny conservation with the rice genome. **Genetics**, Baltimore, v. 168, p. 2169-2185, 2004.
- CHURATA, B. G. M.; AYALA-OSUNA, J. T. Correlações genotípicas, fenotípicas e de ambiente e análise de trilha em caracteres avaliados no composto de milho (*Zea mays*) arquitetura. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 43, n. 249, p. 628-636, 1996.
- CROSS, H. Z.; KABIR, K. M. Evaluation of field dry-down rates in early maize. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 1, p. 54-58, 1987.
- CRUZ, E. M.; CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; TOMÉ, L. G. O. Análise genômica. In: CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; BHERING, L. L. (Eds.). **Genômica aplicada**. Viçosa, UFV, 2013, cap. 1, p. 1-30.
- DURAND, E.; BOUCHET, S.; BERTIN, P.; RESSAYRE, A.; JAMIN, P.; CHARCOSSET, A.; DILLMANN, C.; TENAILLON, M. I. Flowering time in maize: linkage and epistasis at a major effect locus. **Genetics**, Baltimore, v. 190, p. 1574-1562, 2012.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.

FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Eds). **Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2011. Cap 3, p. 55-120.

FANCELLI, A. L. **Ecofisiologia e fenologia**. Tecnologia da produção de milho (CAD - cursos de atualização à distância). Modulo1. Piracicaba: Aldeia Norte, 2002. 51 p.

FERNANDO, R. L.; GARRICK, D. Bayesian methods applied to GWAS. In: **Genome Wide Association Studies and Genomic Prediction**. Springer, 2013, p. 237- 274.

FILIPENCO, A.; MANDACHE, V.; VALSAN, G.; IVAN, F.; CIOCAZANU, I. Inheritance of grain dry-down in corn (*Zea mays* L.). **Bulletin of University of Agricultural Sciences Veterinary, Medicine and Agriculture**, Cluj-Napoca, v. 70, n.1, p. 223-226, 2013.

FIORINI, F. V. A.; PINHO, R. G. V.; CAMARGOS, R. B.; SANTOS, A. O.; FIORINI, I. V. A. Relação entre perda de água dos grãos e características agronômicas de híbridos de milho. **Revista Brasileira de Sorgo e Milho**, Sete Lagoas, v. 14, n. 1, p. 88-100, 2015.

GAO, H. et al. Systematic review and evaluation of physiological track and trigger warning systems for identifying at-risk patients on the ward. **Intensive Care Medicine**, Brussels, v. 33, n. 4, p. 667-6679, 2007.

GOODMAN, M. M.; SMITH, J. S. C. Botânica. In PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 1, p. 39-78.

GRIFFITHS, R. B. Correlations in ising ferromagnets. II. External magnetic fields, **Journal Mathematical Physics**, California, v. 8, p. 484-489, 1967.

GRUNEBERG, H. An analysis of the “pleiotropic” effects of a new lethal mutation in the rat (mus norvegicus). **Proceeding of the Royal Society**, Londres, v. 125, n. 3, p. 123-144, 1938.

GUISCHEM, J. M.; BICUDO, S. J.; NAKAGAWA, J.; ZANOTTO, M. D.; SANSÍGOLO, C.; ZUCARELLI, C.; MATEUS, G. P. Características morfológicas e fisiológicas do milho que influenciam a perda de água do grão. **Revista Brasileira de Sorgo e Milho**, v. 1, n. 2, p. 28-37, 2002.

KOESTER, R. P.; SISCO, P. H.; STUBER, C. W. Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenics lines of maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 6, p. 1209-1216, 1993.

KOZUMPLIK, V.; PEJIC, I.; PAVLINA, R.; SENIOR, L.; STUBER, C. W.; GRAHAM, G. Molecular makers for QTL detection in segregating maize populations derived from exotic germplasm. **Maydica**, Bergamo, v. 41, n. 3, p. 211-217, 1996.

LIMA, J. L.; SOUZA, J. C.; MACHADO, J. C.; RAMALHO, M. A. P. Controle genético da exigência térmica para o início do florescimento em milho. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 127-131, 2008.

LOPES, U. V.; GALVÃO, J. D.; CRUZ, C. D. Inheritance of the flowering time in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 10, p.1267-1271, 1995.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Ecofisiologia**. In: CRUZ, J. C. (Ed). Cultivo do milho. 2010. (Manual Técnico).

MARCONDES, M. M.; FARIA, M. V.; MENDES, M. C.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, J. F.; CAVALLIN, I.; WALTER, A. L. B. Desempenho agrônomo de linhagens S4 de milho em cruzamentos top crosses. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 1, p. 145-154, 2015.

McDONALD, M. B.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, P. M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, Madison, v. 22, p.171-176, 1994.

MEYER, A. S.; LEANDRO, R. A.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; SOUZA, A. P. Uma abordagem bayesiana para mapear QTL e detectar efeitos epistáticos em uma população de milho. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 558-581, 2013.

MOTYER, A. J.; MCKENDRY, C.; GALBRAITH, S.; WILSON, S. R. LASSO model selection with post-processing for a genome-wide association study data set. **Bio Med Central Proceedings**, London, v. 5, n. 9, p. 24, 2011.

RAGOT, M.; SISCO, P. H.; HOISINGTON, D. A.; STUBER, C. W. Molecular-marker-mediated characterization of favorable exotic alleles at quantitative trait loci in maize. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 5, p. 1306-1315, 1995.

RESENDE JÚNIOR, M. F. R.; ALVES, A. A.; SÁNCHEZ, C. F. B.; RESENDE, M. D. V.; CRUZ, C. D. Seleção genômica ampla. In: CRUZ, C. D.; SALGADO, C. C.; BHERING, L. L. (Eds.). **Genômica aplicada**. Viçosa, UFV, 2013, cap. 10, p. 375-424.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa, 2002. 975 p.

RESENDE, M. D. V. **Genômica quantitativa e seleção no melhoramento de plantas perenes e animais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. A.; DEUTSCH, J. A.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, n. 5, p. 905-914, 1996.

ROOD, S. B.; MAJOR, D. J. Inheritance of tillering and flowering-time in early maturing maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 30, p. 327-334, 1981.

SALA, R. G.; ANDRADE, F. H.; CAMADRO, E. L.; CERONO, J. C. Quantitative trait loci for grain moisture at harvest and field grain drying rate in maize (*Zea mays*, L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 3, p. 462-471, 2005.

SALVI, S.; CASTELLETTI, S.; TUBEROSA, R. An updated consensus map flowering time QTLs in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 54, p. 501-512, 2009.

SAS Institute, Inc. SAS user's guide; statistics, version 6.0. 3th Third Edition. Vol. 2. Cary, NC. 1990. 329 p.

SCHMIDT, J. L.; HALLAUER, A. R. Estimating harvest date of corn in the field. **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 3, p. 227-231, 1966.

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

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow - mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 67, n. 8, p. 1051- 1056, 1977.

SHER, H.; IQBAL, M.; KHAN, K.; YASIR, M.; RAHMAN, H. Genetic analysis of maturity and flowering characteristics in maize (*Zea mays* L.). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapura, v. 2, n. 8, p. 621-626, 2012.

STEARNS, F. W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. **Genetics**, Baltimore, v. 186, n. 3, p. 767-773, 2010.

WARNER, J. N. A method of estimating heritability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 44, p. 427-430, 1952.

4 CONCLUSÕES GERAIS

A variabilidade genética para caracteres relacionados à maturação de grãos e aos componentes do rendimento revela a possibilidade de ganho genético.

O emprego do mapeamento por desequilíbrio de ligação para florescimento e perda de umidade de grãos pode ser uma estratégia eficiente na seleção de genótipos com a maturidade requerida.