



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIZ JÚNIOR PERINI

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO E ANÁLISE DIALÉTICA
PARA CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS NA CULTURA
DO MILHO**

Londrina
2021

LUIZ JÚNIOR PERINI

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO E ANÁLISE DIALÉTICA
PARA CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS NA CULTURA
DO MILHO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL.

Perini, Luiz Júnior.

Mapeamento associativo e análise dialética para características nutricionais na cultura do milho / Luiz Júnior Perini. - Londrina, 2021. 77f.: il.

Orientador: Leandro Simões Azeredo Gonçalves.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021. Inclui bibliografia.

1. Milho - Tese. 2. Biofortificação - Tese. 3. GWAS - Tese. 4. Análise Dialética - Tese. I. Gonçalves, Leandro Simões Azeredo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

LUIZ JÚNIOR PERINI

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO E ANÁLISE DIALÉLICA PARA
CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS NA CULTURA DO MILHO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dr. Deoclécio Domingos Garbuglio
Instituto de Desenvolvimento Rural - IDR

Dra. Jéssica Delfini de Paula Iácono
Grupo Dom Mario – GDM Seeds

Prof. Dr. Josué Maldonado Ferreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de março de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Roberto Perini e Neuzira Costa Perini, e à minha irmã, Dra. Thaisa Paula Perini.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Luiz Roberto Perini e Neuzira Costa Perini, pelos valores e princípios ensinados, por me incentivarem a seguir a carreira científica e por todo sacrifício que fizeram em suas vidas para que eu pudesse ter uma educação de qualidade.

Agradeço à minha irmã, Dra. Thaisa Paula Perini, pelo incentivo, apoio e presença nos momentos de necessidade.

Ao estimado Professor Dr. Leandro Simões Azeredo, meus sinceros agradecimentos. Sou grato a ele pela excelente orientação. Agradeço por todo o conhecimento adquirido e pela amizade. E a toda equipe do LEBA da Universidade Estadual de Londrina (UEL), muito obrigado.

Aos Professores Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete e Dr. Claudemir Zucareli, que me acompanham deste o mestrado, agradeço pela amizade. Agradeço também a todos os Professores da UEL que contribuíram para minha formação na área científica.

À UEL e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEL, todos os alunos, professores, coordenadores e à secretária Weda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Ao meu avô, Antônio Perini, agradeço por todo apoio e incentivo. Agradeço também aos meus avós, Madalena Nobre, Maria Corghi e Oraci da Silva "*In memoriam*".

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Scapim e a sua equipe, pela parceria, colaboração e pelo fornecimento das sementes. Sem a ajuda do Prof. Carlos a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Professor Dr. Josué Maldonado Ferreira, agradeço pelos ensinamentos em genética e apoio durante a realização deste estudo.

Ao Dr. Deoclécio Domingos Garbuglio, agradeço pela ajuda em fornecer sementes de híbridos comerciais utilizados como testemunhas nos experimentos.

Às minhas amigas Dra. Ângela Beatriz da Costa e Dra. Heverly Moraes pela amizade, oportunidade e conhecimentos transmitidos na área de agrometeorologia.

Ao meu amigo Douglas Marini Zeffa, agradeço pela colaboração, aprendizado e parceria durante o doutorado.

À Dra. Jéssica Delfini, agradeço pelo auxílio durante a realização das análises.

Ao Nicholas Vieira, Antoni Wallace e Romário e Henrique, agradeço

pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Leonardo Bruno e toda equipe da fazenda pelo apoio na execução deste trabalho na Fazenda Escola.

Muito obrigado a todos que contribuíram de alguma forma para conclusão deste trabalho.

Não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz (Bill Gates).

PERINI, Luiz. Júnior. **Mapeamento associativo e análise dialélica para características nutricionais na cultura do milho**. 2021. 77f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2021.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais alimentos básicos empregados na dieta de milhões de pessoas na África e na América Latina. Nesse sentido, a biofortificação é considerada uma das principais estratégias para o fornecimento de nutrientes. O presente trabalho está dividido em dois capítulos. O capítulo I teve como objetivo identificar regiões genômicas associadas com conteúdo nutricional em um painel de 132 linhagens de milho grão e pipoca em 273775 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). O objetivo do capítulo II foi avaliar os efeitos gênicos e a capacidade de combinação de um conjunto de linhagens de milho tropical para rendimento de grãos e teores de Fe (ferro) e Zn (zinco) nos grãos. No capítulo I, o painel foi fenotipado para quatro nutrientes (cálcio - Ca, magnésio - Mg, Fe e Zn) em duas safras no município de Londrina, Paraná, Brasil. Para o estudo de associação genômica, foram utilizados cinco métodos multi-*loci* (FASTmrEMMA, FASTmrMLM, ISIS EM-BLASSO, mrMLM e pLARmEB). Com a finalidade de obter resultados mais precisos, apenas os QTNs (*Quantitative Trait Nucleotides*) que apresentaram repetibilidade, ou seja, detectados pelo menos três vezes por diferentes métodos ou ambientes, foram considerados verdadeiramente significativos e foram utilizados na busca por alelos superiores e genes candidatos. No capítulo II, foi avaliado um dialelo 10 x 10 de linhagens tropicais provenientes do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Esses híbridos foram avaliados em dois locais na segunda safra, em Dourados (2018) e Londrina (2018 e 2019) para rendimento de grãos, e em Dourados (2018) e Londrina (2019) para Fe e Zn. No capítulo I, foi observado uma ampla variabilidade para teores de nutrientes nos acessos avaliados, com valores de herdabilidade variando de 0,40 (Mg) a 0,52 (Zn). Um total de 637 QTNs foi detectado para os quatro nutrientes, sendo que destes, 39 apresentaram repetibilidade e foram utilizados para os demais estudos. Foram encontrados 11, 10, 10 e oito QTNs para Ca, Mg, Zn e Fe, respectivamente. O acúmulo de alelos superiores em um mesmo acesso revelou aumento gradual no teor de nutrientes no grão, indicando que essas marcas genéticas podem ser utilizadas em futuros programas de melhoramento visando a biofortificação do milho. Os *loci* identificados no presente trabalho serão importantes para o melhoramento de milho grão e pipoca de origem tropical no Brasil, para as características nutricionais estudadas. No capítulo II, com base na análise de variância, foi observado efeito significativo em todas as características para as fontes de variação genótipos (G), ambientes (A) e para a interação G x A, indicando uma ampla variabilidade dos genótipos e ambientes e desempenho diferenciado dos genótipos nos ambientes. Pelo desdobramento da análise de variância, foram observados efeitos significativos para capacidade geral e específica de combinação, indicando que efeitos aditivos e não aditivos estão envolvidos no controle genético dessas características, com predomínio dos efeitos não aditivos. Objetivando a seleção simultânea das características RG (rendimento de grãos), Fe e Zn, o híbrido L4 x L6 se mostrou o mais promissor, mostrando valores positivos de $\hat{\sigma}_{ij}$ em todos os ambientes avaliados.

Palavras-Chave: *Zea mays* L.; biofortificação; GWAS; SNP; QTL; capacidade de combinação.

PERINI, Luiz. Júnior. **Genome-wide association study and diallel analysis for nutritional traits in maize**. 2021. 77p. Thesis (Doctoral Degree in Agronomy) – Londrina State University, Londrina. 2021.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main staple foods for millions of people in Africa and Latin America. In this context, biofortification is considered one of the main strategies to supply nutrients. The present study is divided into two chapters. Chapter I aimed at identifying genomic regions associated with nutritional contents in a panel with 132 field and popcorn maize inbred lines and 273775 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Chapter II aimed at evaluating the genetic effects and combining ability in a set of tropical maize inbred lines for grain yield and Fe (iron) and Zn (zinc) contents in grains. In chapter I, the panel was phenotyped regarding four nutrients (calcium – Ca, magnesium – Mg, Fe, and Zn) in two crop seasons in Londrina, Paraná State, Brazil. For the genomic association study, five multi-loci methods (FASTmrEMMA, FASTmrMLM, ISIS EM-BLASSO, mrMLM, and pLARmEB) were applied. In order to obtain more accurate results, only the QTNs (Quantitative Trait Nucleotide) that showed repeatability, that is, detected at least three times by different methods or environments, were considered significant and were used to look for superior alleles and candidate genes. In chapter II, a 10 x 10 diallel of tropical inbred lines from Maringá State University (UEM) Maize Breeding Program was evaluated. These hybrids were assessed in two locations in the second crop season. They were evaluated in Dourados (2018) and Londrina (2018 and 2019) for grain yield, while Fe and Zn were evaluated in Dourados (2018) and Londrina (2019). In chapter I, wide variability of nutrient contents was observed in the evaluated accessions with heritability values ranging from 0,40 (Mg) to 0,52 (Zn). A total of 637 QTNs were detected regarding the four nutrients. From this total, 39 showed repeatability and were used to further studies. As for QTNs, 11, 10, 10, and eight were found for Ca, Mg, Zn, and Fe, respectively. The accumulation of superior alleles in the same accessions revealed a gradual increase in grain nutrient content, indicating that these genetic marks can be applied in future breeding programs aiming at maize biofortification. The *loci* identified in the present study will be important for tropical field and popcorn maize breeding in Brazil concerning the nutritional traits studied. In chapter II, according to the analysis of variance, all traits showed significant difference for the sources of variation genotypes (G), environments (E), and G x E interaction, indicating wide variability for genotypes and environments and differentiated performance of the genotypes in the environments. Unfolding the analysis of variance, significant effects were observed for general and specific combining ability, indicating that additive and non-additive effects are involved in the genetic control of these traits, with a predominance of non-additive effects. Aiming to simultaneously select GY (grain yield) and Fe and Zn contents, the hybrid L4 x L6 was the most promising, showing positive values of $\hat{\sigma}_{ij}$ in all evaluated environments.

Keywords: *Zea mays* L.; biofortification; GWAS; SNP; QTL; combining ability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Qualidade nutricional dos diferentes componentes do grão de milho.
Fonte: adaptado de PRASANNA *et al.*, 2020. 17
- Figura 2** – Cultivares de milho enriquecidas com pró-vitamina A e alto zinco desenvolvidas por meio do melhoramento convencional e seleção assistida por marcadores moleculares e lançadas para cultivo comercial na África Subariana, Ásia e América Latina. Fonte: LISTMAN *et al.*, 2019; PRASANNA *et al.*, 2020. 19
- Figura 1.1** – Dados diários da precipitação e temperatura máxima e mínima durante o período experimental em Londrina 2018 (A) e 2019 (B). 35
- Figura 1.2** – Distribuição de frequências para teor de magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), e zinco (Zn) em 132 linhagens de milho grão e pipoca de origem tropical, avaliadas na safra de 2018/2019 e segunda safra de 2019 em Londrina. 40
- Figura 1.3** – Análise de decaimento do desequilíbrio de ligação (*LD decay*) em função da distância física sem correção (r^2) (A) e corrigido pelo parentesco (*kinship*) (r^2_v) (B), estrutura populacional (r^2_s) (C) e estrutura populacional e parentesco (r^2_{sv}) (D). 43
- Figura 1.4** – Acúmulo de alelos favoráveis em relação às médias ajustadas (LSmeans) para teor de magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), e zinco (Zn) em linhagens de milho grão e pipoca de origem tropical, avaliadas na safra de 2018/2019 e segunda safra de 2019 em Londrina. 47
- Figura 2.1** – Dados diários da precipitação e temperatura máxima e mínima durante o período experimental em Londrina, 2018 (A), 2019 (B) e Dourados, 2018 (C). 58
- Figura 2.2** – Estimativas da capacidade geral de combinação para rendimento de grãos (RG), e teor de ferro (Fe) e zinco (Zn) no grão em dez linhagens de milho tropical destinadas à produção de grãos em três ambientes. 62

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 – Lista das linhagens de milho do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá, genotipadas por marcadores SNPs e utilizadas no estudo de GWAS..... | 33 |
| Tabela 1.2 – Análise de variância e estatística descritiva para diferentes teores de minerais detectados nos 132 acessos de milho avaliados em duas safras no município de Londrina, Paraná, Brasil | 39 |
| Tabela 1.3 – QTNs associados a teores de minerais no milho, detectados pelo menos três vezes via diferentes métodos no painel de milho grão e pipoca de origem tropical..... | 44 |
| Tabela 1.4 – Relação de potenciais genes candidatos localizados nas regiões genômicas subjacentes aos QTNs associados à variação dos teores de Ca, Mg, Fe e Zn em milho grão e pipoca de origem tropical | 49 |
| Tabela 2.1 – Origem e características dos genitores de milho tropical para produção de grãos utilizados nos cruzamentos dialélicos | 56 |
| Tabela 2.2 – Estimativas do quadrado médio de genótipos, capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e componentes quadráticos da CGC e CEC para rendimento de grãos (GY), teor de ferro (Fe) e teor de zinco (Zn) avaliados em milho de origem tropical destinado a produção de grãos, no ambiente de safrinha em Londrina e Dourados | 60 |
| Tabela 2.3 – Estimativas da capacidade específica de combinação para rendimento de grãos (RG) e teor de ferro (Fe) e zinco (Zn) em 45 híbridos de milho tropical destinadas à produção de grãos, avaliadas na segunda safra em 3 ambientes (A1: Londrina, 2018; A2: Londrina, 2019; A:3 Dourados, 2018) | 64 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 15 |
| 2.1. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DA CULTURA DO MILHO | 15 |
| 2.2. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO GRÃO DE MILHO | 17 |
| 2.3. MELHORAMENTO PARA CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS..... | 18 |
| 2.4. MARCADORES MOLECULARES | 19 |
| 2.4.1. Introdução aos marcadores moleculares | 19 |
| 2.4.2. Mapeamento genético | 21 |
| 2.4.3. Mapeamento associativo..... | 21 |
| 2.4.4. Mapeamento associativo para características nutricionais | 23 |
| 2.5. ANÁLISE DIALÉLICA PARA ESTUDOS GENÉTICOS DE CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS | 25 |
| 3 ARTIGO A: Estudo de associação genômica ampla para identificar polimorfismo de nucleotídeos únicos associados à concentração de minerais na cultura do milho | 27 |
| INTRODUÇÃO | 29 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| CONCLUSÕES | 51 |
| 4 ARTIGO B: Análise dialélica em milho tropical para rendimento de grãos e teores de ferro e zinco na segunda safra..... | 52 |
| INTRODUÇÃO | 54 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 60 |
| CONCLUSÕES | 65 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 67 |

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado e utilizado no mundo, apresentando importante papel socioeconômico e nutricional (BODDY, 2016), sendo uma fonte de calorias, proteínas, vitaminas e minerais na dieta de milhões de habitantes, principalmente, em regiões da África, América Latina e Ásia (SUWARNO *et al.*, 2015). Na safra 2020/2021, a produção mundial será de 1,134 bilhões de toneladas, sendo que 70-80% do total produzido é destinado para produção de ração animal. Além de ser amplamente utilizado na alimentação humana e animal, também é empregado na indústria para a produção de amidos, dextrinas, adesivos, papel, tecidos e etanol (LIN *et al.*, 2019). Os principais países produtores são Estados Unidos, China, Brasil e Argentina, que correspondem por, aproximadamente, 70% da produção mundial de milho (USDA, 2021).

Mesmo com números tão expressivos, a composição nutricional deste cereal é negligenciada, o que reflete na qualidade da matéria prima disponibilizada para a produção de ração ou indústria alimentícia (FLINT-GARCIA *et al.*, 2009). O grão de milho é uma fonte rica em carboidrato, principalmente na forma de amido, compondo, aproximadamente, 65-75% de seu peso total (GOLDMAN *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 2019; LIU, *et al.*, 2016; WILSON *et al.*, 2004).

Além de amido, os grãos de milho apresentam vitaminas e minerais (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn). Em regiões que possuem uma dieta altamente dependente de produtos originados do milho, a população tende a apresentar deficiência de nutrientes importantes como vitamina A, ferro e zinco, o que resulta em desnutrição, com consequentes problemas de saúde (SALTZMAN *et al.*, 2013). Além disso, aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo sofrem com deficiência de micronutrientes. Entre as estratégias para solucionar esse problema, está a biofortificação.

A biofortificação é o processo de melhoria do conteúdo de nutrientes em uma cultura, sendo considerada uma estratégia sustentável e econômica para enfrentar o problema da desnutrição nos países subdesenvolvidos, porque visa alimentos básicos, que são consumidos diariamente (DWIVEDI *et al.*, 2012). Nesse sentido, promover a biofortificação na cultura com maior produção mundial, irá auxiliar na solução da desnutrição (BOHRA *et al.*, 2019; VELU *et al.*, 2018). A biofortificação

pode ser realizada por meio do manejo cultural, do enriquecimento com nutrientes durante o processamento industrial e do melhoramento genético.

Dentre as alternativas para obter alimentos biofortificados, o melhoramento genético é a que pode garantir os melhores resultados (RICACHENEVSKY *et al.*, 2019; SOFI *et al.*, 2009; VYN *et al.*, 1998). Para melhorar geneticamente uma cultura visando obter maior teor de nutrientes, é necessário identificar e selecionar genótipos que absorvam maior quantidade de nutrientes do solo e os acumulem nos grãos (HINDU, *et al.*, 2018; SALTZMAN *et al.*, 2013; SUWARNO *et al.*, 2015).

Diversos trabalhos com foco no melhoramento genético vêm sendo conduzidos, visando incrementar a qualidade nutricional em cereais como milho (HINDU *et al.*, 2018; MAQBOOL; BESHIR, 2019; SUWARNO *et al.*, 2015; WEN *et al.*, 2016), trigo (ALOMARI *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018; VELU *et al.*, 2018), arroz (DESCALSOTA *et al.*, 2018; PERERA *et al.*, 2019; PINSON *et al.*, 2015) e cevada (GYAWALI *et al.*, 2019; SHU; RASMUSSEN, 2014). Para a cultura do milho, os estudos genéticos têm sido relacionados com aumento dos níveis de carotenoides, que são precursores de vitamina A (AZMACH *et al.*, 2018; OWENS *et al.*, 2014; SUWARNO, *et al.*, 2015), vitamina E (FENTON *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2012), conteúdo de óleo (COOK *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013), proteína (COOK *et al.*, 2012), amido (COOK *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018) zinco (HINDU *et al.*, 2018; MAQBOOL; BESHIR, 2019) e ferro (HINDU *et al.*, 2018).

A concentração e composição de nutrientes são características quantitativas, ou seja, são controladas por muitos genes que são altamente influenciados pelo ambiente, o que dificulta as análises genéticas dessas características. A variação genética de características quantitativas é controlada pelo efeito coletivo dos *loci* de características quantitativas (QTL), interação entre QTLs (epistasia), interação entre ambiente e interação entre QTL e ambiente (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

Os estudos para QTL são realizados por métodos que associam o genótipo ao fenótipo. O mapeamento de ligação e estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide Association - GWAS*) são exemplos desses métodos (ELSHIRE *et al.*, 2011; GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018). Nesse sentido, empregar a seleção

assistida por marcadores visando a identificação e introgressão de QTLs em germoplasma elite, é uma ferramenta biotecnológica crucial para realizar o melhoramento genético de culturas agrícolas de maneira mais rápida (WANG *et al.*, 2017).

A tecnologia de sequenciamento de próxima geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) é uma das técnicas empregadas na seleção assistida por marcadores. Essa abordagem apresenta uma evolução significativa no poder de detecção de variantes genéticas em um único experimento, revolucionando essa área de estudo (STAPLEY *et al.*, 2010). A NGS tem sido aplicada para sequenciar o genoma completo de espécies e também para re-sequenciamento. Nos projetos de re-sequenciamento, vários indivíduos da mesma espécie têm seu genoma sequenciado com o intuito de descobrir um grande número de polimorfismos únicos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) para, finalmente, explorar a diversidade dentro da espécie, realizar a construção de mapas e estudos de associação genômica ampla (ELSHIRE *et al.*, 2011).

A tecnologia de NGS tem permitido que a técnica de genotipagem por sequenciamento (*Genotyping-by-Sequencing* - GBS) se torne viável para estudos de espécies com genoma amplo e de alta diversidade (ELSHIRE *et al.*, 2011). O GBS é uma técnica robusta, de alto rendimento, econômica e simples para obter milhares de marcadores de um grande número de indivíduos, no qual captura dados SNPs utilizando uma biblioteca de representação reduzida, ou seja, a partir de poucos indivíduos (ARIANI *et al.*, 2016; SCHRÖDER *et al.*, 2016). Estes SNPs são utilizados nos experimentos de GWAS. No GWAS é realizado o escaneamento de todo o genoma na busca de associações significativas entre os SNPs e um fenótipo desejável (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

Por ser uma abordagem vantajosa, o GWAS se tornou o método padrão para identificar QTL ou regiões genômicas em plantas, incluindo o milho (COAN *et al.*, 2018). Por exemplo, o GWAS tem sido aplicado com o intuito de explorar a variação alélica em *loci* gênicos associados à biossíntese de amido em milho (LIN *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2018).

A concentração e a composição de nutrientes nos grãos de milho é uma característica complexa sendo controlada por muitos genes. Diversos trabalhos

foram desenvolvidos com objetivo de identificar os genes que atuam no acúmulo de nutrientes nos grãos de milho (BOHRA *et al.*, 2019). Um estudo associativo realizado em um painel com 923 linhagens de milho para teor de zinco e ferro em grãos de milho identificou 20 SNPs para Zn e 26 SNPs para Fe, apontando novas regiões genômicas relacionadas ao teor desses nutrientes (HINDU *et al.*, 2018). No trabalho de Hindu e colaboradores (2018), o gene *GRMZM2G489070* localizado no cromossomo 9 (Zm09) foi identificado como comum para conteúdo de Zn e Fe em grãos de milho.

Há poucos relatos na literatura sobre o mapeamento associativo em germoplasma de milho tropical e pipoca. A maioria dos estudos tem sido realizada em milho temperado. Germoplasma de milho temperado possui base genética mais estreita quando comparado com milho tropical. Nesse sentido, a Identificação de QTL e mapeamento associativo em milho tropical pode revelar novos e potenciais genes ou regiões genômicas que contribuam para o aumento do teor de nutrientes. Nosso estudo utilizou a plataforma Illumina HiSeq 2000 para analisar um painel diverso de 129 linhagens de milho grão e pipoca de germoplasma tropical por meio de GBS para identificação de SNPs relacionados ao conteúdo de nutrientes nos grãos, na primeira e segunda safra (ambientes).

O objetivo geral deste trabalho foi mapear regiões genômicas e verificar os efeitos gênicos responsáveis pelo teor de nutrientes na cultura do milho. Especificamente, objetivou-se avaliar a diversidade genética entre as linhagens de milho para teor de nutrientes; identificar SNPs associados ao acúmulo de nutrientes via mapeamento associativo; analisar os efeitos gênicos associados à produtividade e ao acúmulo de ferro e zinco no milho por meio da análise dialélica; e, por fim, avaliar a capacidade de combinação de linhagens em combinações híbridas visando aumento da produtividade e do teor de ferro e zinco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DA CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado e utilizado no mundo, desempenhando um significativo papel socioeconômico (BODDY, 2016). Seus grãos

representam uma fonte de calorias, proteínas, vitaminas e minerais na dieta de milhões de habitantes em regiões da África, América Latina e Ásia (SUWARNO *et al.*, 2015). Além da participação na alimentação humana, este cereal também é amplamente utilizado na alimentação animal, bem como na indústria para a produção de amidos, dextrinas, adesivos, papel, tecidos e etanol (LIN *et al.*, 2019).

O milho é a cultura com a maior produção de grãos no mundo, e, no Brasil, ocupa o segundo lugar em volume de produção. Na safra 2020/2021, estima-se que a produção mundial será de 1,134 bilhões de toneladas. Do total produzido, 70-80% é destinado à produção de ração animal. Estados Unidos, China, Brasil e Argentina são os principais países produtores, sendo responsáveis por, aproximadamente, 70% da produção mundial de milho (USDA, 2021).

No Brasil, é previsto uma produção de 108,068 milhões de toneladas de milho para a safra 2020/2021. Os principais estados produtores são: Mato Grosso, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Esses cinco estados concentram cerca de 78% da produção nacional. O milho tem sido semeado em duas épocas: 1º safra - agosto a dezembro e 2º safra - janeiro a março. A 2º safra é responsável por, aproximadamente, 76% da produção brasileira de milho (CONAB, 2021).

Em 2021, estima-se que o valor bruto da produção (VBP) de milho no país seja por volta de R\$ 142,63 bilhões, com expressiva participação no valor gerado. Na safra anterior, o milho ocupou a 2ª posição em VBP com cerca de 18%, após a soja (49%) e seguido da cana-de-açúcar (8%). O milho é a principal matéria prima para a produção de ração animal. Assim, cerca de 50,97 milhões de toneladas serão utilizadas para alimentar aves, suínos e bovinos em 2021, sendo que a avicultura é responsável por 57% e a suinocultura por 27% do consumo. Nesse sentido, a previsão é que o VBP da pecuária seja de R\$ 383,47 bilhões em 2021, em que, aves (20%) e suínos (8%) representam cerca de R\$ 107,91 bilhões. Portanto, o milho tem uma relevância significativa na cadeia de produção de proteína animal, o que permite agregar valor a esse produto (ABIMILHO, 2021; CNA, 2021).

Além do emprego para produção de ração, o milho pode ser utilizado na produção de uma variedade de alimentos e produtos industriais como amido, adoçantes, óleo, bebidas, cola, álcool industrial e biocombustível. A produção de milho tem apresentado aumento discreto ao longo dos anos. No entanto, o consumo

humano permanece estável. Apesar disso, o milho ainda é um alimento básico para muitas pessoas, particularmente na África. Nesse sentido, o milho é um alimento ideal para se realizar a biofortificação, devido ao baixo custo de produção associado ao alto consumo de farinha e fubá de milho, especialmente em regiões em que a deficiência de micronutrientes é um problema de saúde pública (RANUM *et al.*, 2014).

2.2. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO GRÃO DE MILHO

As principais estruturas que compõem o grão de milho são endosperma, gérmen e pericarpo (Figura 1) (PRASANNA *et al.*, 2020). O endosperma representa, aproximadamente, 83% da massa seca dos grãos, sendo composto, principalmente, por amido (65 a 75 %) e proteínas de reserva (9%). O gérmen constitui cerca de 11% dos grãos de milho, concentrando lipídeos, proteínas, açúcares, minerais e vitaminas (LIN *et al.*, 2019; PAES, 2006; SALTZMAN *et al.*, 2013).

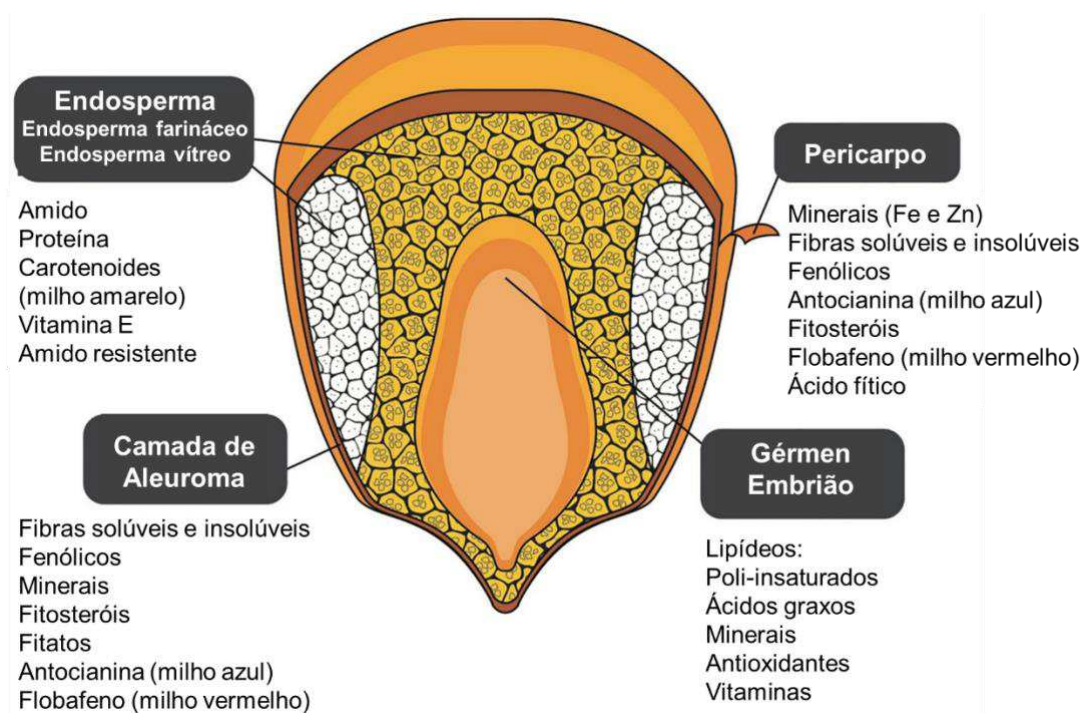


Figura 1 – Qualidade nutricional dos diferentes componentes do grão de milho. Fonte: adaptado de PRASANNA *et al.*, 2020.

O milho é uma das principais fontes diárias de carboidrato das pessoas que vivem em regiões da África, América Latina e Ásia. A maior parte do carboidrato presente nos grãos de milho está na forma de amido, compondo cerca de

65-75% do peso total de massa seca do grão, sendo que o amido é a principal fonte de calorias na dieta humana. Mais de 600 produtos comerciais são gerados a partir do amido para produção de itens alimentares e não alimentares (BALL *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 2019; SUWARNO *et al.*, 2015). De forma geral, dependemos do amido para nossa nutrição, exploramos suas propriedades únicas pela indústria, e o usamos na alimentação animal e produção de bioetanol (ZEEMAN *et al.*, 2010).

2.3. MELHORAMENTO PARA CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

A deficiência de micronutrientes afeta mais de 2 bilhões de pessoas no mundo todo. Pessoas que habitam regiões rurais e semiurbanas são mais vulneráveis a sofrer dessa carência. Uma das soluções para este problema é aumentar a composição nutricional das plantas. Dentre as espécies vegetais, os cereais representam a maior parte da produção de grãos no mundo. O milho é a cultura modelo para cereais e a maior fonte diária de carboidratos para a população de muitas regiões ao redor do mundo. Uma das estratégias para aumentar o teor de nutrientes nos alimentos é a biofortificação (CAKMAK *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009).

A biofortificação pode ser realizada adicionando nutrientes durante o processamento dos alimentos, por meio de práticas agronômicas ou da genética. Dentre as possíveis técnicas para esse fim, o melhoramento genético das plantas é uma ferramenta chave para a biofortificação das culturas agrícolas (BOHRA *et al.*, 2019; OWENS *et al.*, 2014; WURTZEL *et al.*, 2012).

O emprego do melhoramento clássico é acompanhado de ganhos genéticos mais lentos. Uma alternativa é o emprego da engenharia genética que explora ganhos genéticos maiores e mais rápidos. Apesar dos benefícios, existem várias questões de segurança associadas a culturas geneticamente modificadas (GMs). Portanto, a aceitação de culturas GMs para o consumo humano é muito baixa. Nesse sentido, o emprego de técnicas de melhoramento convencional e moleculares (marcadores e mapeamento de QTLs) deve ser priorizado para acelerar a biofortificação (MAQBOOL; BESHIR, 2019).

Um estudo realizado por meio do mapeamento de QTL visando o

aumento do conteúdo de seis nutrientes em 269 acessos de trigo revelou que macronutrientes exibem maior herdabilidade do que os micronutrientes. Em que, o controle genético é independente para macro e micronutrientes (MANICKAVELU *et al.*, 2017). Tecnologias como a genotipagem de alta densidade aceleram os ganhos associados à variação natural do conteúdo de minerais disponíveis em cultivares antigas e selvagens. Novas técnicas moleculares permitem explorar a máxima variação para conteúdo de nutrientes, principalmente em relação a QTL de pequeno efeito. A utilização destas novas tecnologias no melhoramento genético para biofortificação pode melhorar a eficiência do processo de aumento do nível de nutrientes essenciais (BOHRA *et al.*, 2019).

Apesar dos esforços para desenvolver cultivares de milho biofortificadas, o número de cultivares comerciais para cultivo ainda é muito pequeno, como ilustrado na Figura 2.

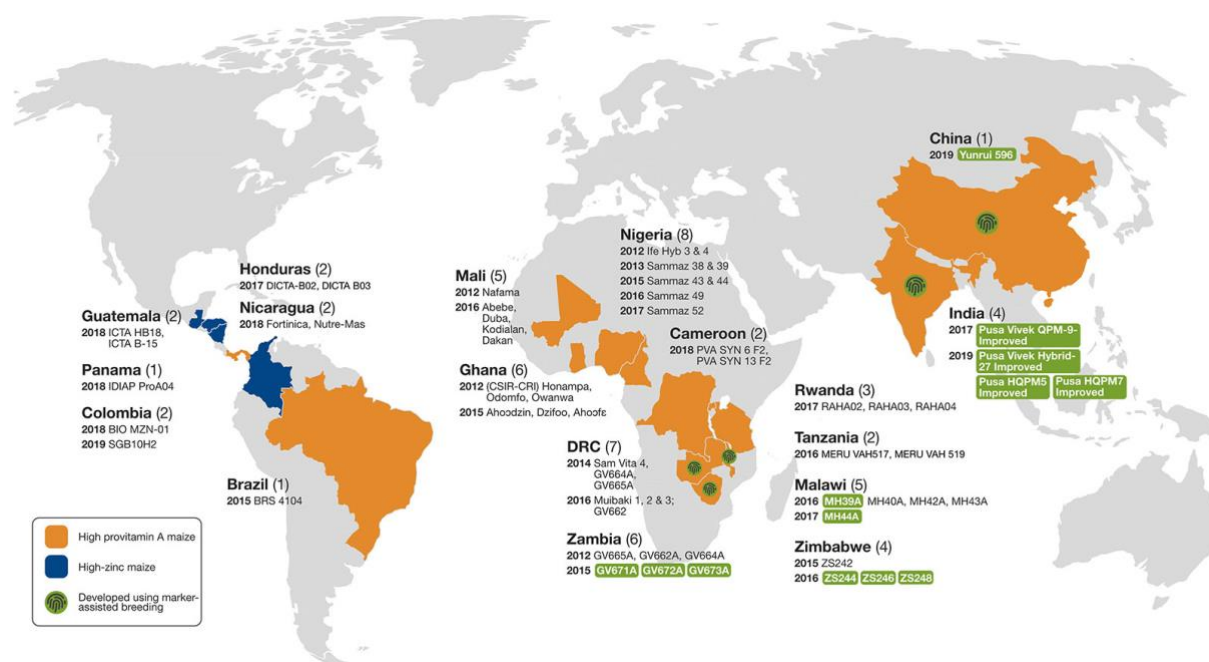


Figura 2 – Cultivares de milho enriquecidas com pró-vitamina A e alto zinco desenvolvidas por meio do melhoramento convencional e seleção assistida por marcadores moleculares e lançadas para cultivo comercial na África Subsariana, Ásia e América Latina. Fonte: LISTMAN *et al.*, 2019; PRASANNA *et al.*, 2020.

2.4. MARCADORES MOLECULARES

2.4.1. Introdução aos marcadores moleculares

Acessar e caracterizar as informações genéticas das plantas é de

suma importância para que toda a variabilidade genética disponível seja utilizada da melhor forma. A caracterização genética das plantas em nível molecular pode ser realizada por meio de marcadores moleculares. Diversos marcadores têm sido empregados nessa caracterização, como, por exemplo, os marcadores de polimorfismo no tamanho de fragmentos de DNA amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLPs), polimorfismo no tamanho de fragmentos de DNA amplificados ao acaso (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLPs), microssatélites (*Simple Sequence Repeats* - SSRs) e SNPs (SAIKI *et al.*, 1985; TAUTZ; RENZ 1984; VOS *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1998). Dentre os marcadores apresentados, atualmente os SNPs são os que têm sido mais utilizados.

No passado, a aplicação de marcadores SNPs para genotipagem apresentava os seguintes desafios: aumentar a velocidade no desenvolvimento dos testes, reduzir os custos e realizar múltiplos testes simultaneamente (KWOK, 2001). Com o advento da próxima geração de sequenciamento, os desafios na utilização dos SNPs foram superados. Hoje, o NGS permite que milhões de SNPs sejam identificados em poucas horas, o que tem revolucionado as abordagens em genômica e transcriptômica na biologia. O NGS tem sido uma ferramenta valiosa para o descobrimento, validação e avaliação de marcadores genéticos (DAVEY *et al.*, 2011).

A tecnologia de NGS tem permitido que a técnica de genotipagem por sequenciamento (*Genotyping-by-sequencing* - GBS) torne-se viável para estudos de espécies com genoma amplo e de alta diversidade (ELSHIRE *et al.*, 2011). Devido aos avanços promovidos pela NGS, a identificação e caracterização de SNPs foram facilitadas. O NGS reduziu o custo de sequenciamento do genoma em um nível onde a genotipagem por sequenciamento é considerada a ferramenta mais poderosa para investigar um grande número de variações genômicas (SNPs). O sucesso da plataforma de sequenciamento GBS se deve ao fato de ser simples, rápida e precisa. A plataforma GBS tem sido utilizada amplamente para grande número de SNPs em muitas culturas, incluindo o milho (SCHRÖDER *et al.*, 2016; ZAID *et al.*, 2017). Estes SNPs são aplicados em experimentos envolvendo GWAS. O estudo de associação genômica ampla escaneia todo o genoma, buscando associações significativas entre essas marcas genéticas (SNPs) e um fenótipo desejável (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

2.4.2. Mapeamento genético

Como dito anteriormente, o mapeamento de QTL busca encontrar uma associação entre marcadores genéticos e uma característica fenotípica mensurável. Os pesquisadores têm trabalhado do fenótipo para o genótipo, utilizando técnicas estatísticas para localizar regiões cromossômicas que contêm genes ou sequências que contribuem para a variação fenotípica de uma característica quantitativa em uma determinada população. A maioria das características de interesse no melhoramento de plantas mostra herança quantitativa, controlada por muitos genes, o que complica o processo de seleção, pois apenas parte do fenótipo reflete o valor genético dos indivíduos. Devido à distribuição contínua dos valores fenotípicos, em genética quantitativa, é preciso empregar métodos estatísticos para associar o fenótipo ao genótipo. O mapeamento de QTL é, frequentemente, a primeira etapa para identificar o gene associado a determinada característica (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

Dentre os métodos empregados na identificação de QTL está o mapeamento de ligação em populações biparentais. Esta abordagem apresenta como vantagem a necessidade de poucos marcadores para garantir uma cobertura de todo o genoma. Como desvantagem, requer o desenvolvimento de uma população de mapeamento e tem baixa resolução, devido à limitada ocorrência de recombinação durante o desenvolvimento da população. Além disso, somente dois alelos por loco podem ser estudados simultaneamente. Finalmente, a diversidade genética presente nos parentais da população segregante é limitada (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

2.4.3. Mapeamento associativo

O mapeamento associativo é um método de mapeamento de QTL que originalmente foi empregado para analisar doenças em humanos. No entanto, tem sido extensivamente utilizado nos estudos genéticos em plantas. Por meio do estudo de diferenças polimórficas entre nucleotídeos utilizando marcadores anônimos

distribuídos em todo o genoma, são realizados os estudos de associações entre os SNPs e um determinado fenótipo (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018). No estudo da associação genômica ampla, centenas e milhares de SNPs estão envolvidos, o que garante que os produtos do GWAS forneçam uma imagem completa da variação genética (BARRETT *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

O emprego do GWAS para o mapeamento de QTL, quando comparado com o mapeamento de ligação em populações biparentais, apresenta as seguintes vantagens: possibilidade de utilização de um painel pré-existente de materiais não relacionados, dispensando o desenvolvimento de populações via cruzamentos biparentais; a possibilidade de investigar, simultaneamente, um grande número de alelos por locus; e o aumento significativo na resolução de mapeamento. No entanto, o GWAS apresenta como desvantagem a necessidade de conhecimento aprofundado de SNPs e maior quantidade de marcadores (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

O GWAS tem sido aplicado em diversas culturas agrícolas como a soja (HWANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015) e em cereais como o arroz (HUANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2017), o trigo (LIU *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017), e o milho (KUMP *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016; REVILLA *et al.*, 2016; RIEDELSHEIMER *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2014; ZAIDI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Em milho, a linhagem B73 foi a primeira da espécie a ser genotipada via marcadores SNPs, tornando-se o genoma de referência para a cultura do milho (SCHNABLE *et al.*, 2009). A partir da linhagem B73, todos os SNPs identificados em outros germoplasmas de milho são comparados (alinhamento de sequências) com o genoma de referência (B73), com o objetivo de validar os SNPs em outros genótipos de milho. Diversos painéis de milho têm sido utilizados no GWAS, dentre estes, podemos citar painéis de milho temperado, tropical, milho grão e milho pipoca. Todos os painéis são comparados com o genoma de referência para o milho (GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018).

O GWAS em populações de milho apresenta como efeitos práticos a introgressão de alelos alvos favoráveis ou a eliminação de alelos deletérios para emprego no melhoramento, quando encontram-se, de forma robusta (repetitiva)

marcadores associados a características de interesse (BIAN; HOLLAND, 2017). Em estudo realizado com milho, por meio do emprego do mapeamento associativo, 28 QTLs associados a características de produtividade foram identificados (massa de 100 grãos, comprimento da espiga, diâmetro da espiga, diâmetro do sabugo, número de fileiras de grãos, número de grãos por fileira, massa da espiga e massa de grãos por planta) (SU *et al.*, 2017). Além da identificação de QTLs associados com a produtividade de grãos, QTLs para qualidade nutricional dos grãos se tornam cada vez mais importantes.

Devido às vantagens que apresenta, o GWAS se tornou o método padrão para identificação de QTL ou regiões genômicas em plantas, incluindo a cultura do milho (COAN *et al.*, 2018). Com o objetivo de elucidar o entendimento de genes-chave envolvidos na variação natural do conteúdo de amido, o GWAS tem sido empregado para explorar a variação alélica em *loci* gênicos previamente associados com a biossíntese de amido em milho (LIN *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2018).

2.4.4. Mapeamento associativo para características nutricionais

A expressão de características como concentração e composição de nutrientes é proveniente de *loci* quantitativos (QTL). Estas características apresentam maior complexidade quando comparadas às qualitativas. Muitos genes estão envolvidos no controle de características quantitativas. Estes genes são influenciados pelo ambiente, o que dificulta as análises genéticas. Dessa forma, o processo para seleção de características com herança quantitativa é mais complexo, pois apenas uma parte do desempenho do fenótipo é proveniente dos efeitos genéticos. A variação genética de características quantitativas é controlada pelo efeito coletivo dos QTLs, interação entre QTL (epistasia), interação entre ambiente e interação entre QTL e ambiente. Como dito anteriormente, os estudos para QTLs são realizados por métodos que associam o genótipo ao fenótipo, como, por exemplo, o mapeamento de ligação e estudos de associação genômica ampla (ELSHIRE *et al.*, 2011; GLOWINSKI; FLINT-GARCIA, 2018). Nesse sentido, o emprego de seleção assistida por marcadores (SAM) para identificar e introgridir QTLs em germoplasma elite, é uma ferramenta biotecnológica crucial para acelerar o melhoramento genético das

culturas agrícolas (WANG *et al.*, 2017).

Dentre as técnicas empregadas na SAM, as tecnologias de sequenciamento de próxima geração estão revolucionando os estudos genéticos e o desenvolvimento de marcadores moleculares, aumentando exponencialmente o número de variantes genéticas que podem ser descobertas em um único experimento (STAPLEY *et al.*, 2010). Essa tecnologia tem sido utilizada para o sequenciamento do genoma integral de espécies e também para projetos de re-sequenciamento, onde o genoma de vários indivíduos da mesma espécie é sequenciado para descobrir um grande número de polimorfismos únicos com a finalidade de explorar a diversidade dentro da espécie, construir mapas e realizar estudos de associação genômica ampla (ELSHIRE *et al.*, 2011).

A concentração e a composição do amido nos grãos de milho são características complexas, sendo controladas por muitos genes. Diversos trabalhos foram desenvolvidos com objetivo de identificar os genes que atuam na biossíntese de amido no grão de milho. Por meio de marcadores microssatélites, genes como *ae1* e *sh1* se mostraram significativamente associados com o nível de amido em grãos de milho (WILSON *et al.*, 2004). Em um estudo realizado em um painel de 282 linhagens utilizando marcadores SNPs, foram identificados 21 QTLs associados ao conteúdo de amido nos grãos de milho (COOK *et al.*, 2012). Além disso, recentemente, pesquisadores genotiparam 149 linhagens de milho utilizando SNPs e identificaram um SNP significativo na região *GRMZM5G852704_T01*, localizada no QTL maior *Qsta9.1* no cromossomo 9, controlando o conteúdo de amido nos grãos de milho (LIN *et al.*, 2019).

Além de aumentar o conteúdo de amido nos grãos de milho, é importante promover em conjunto o aumento do teor de micronutrientes essenciais (BOHRA *et al.*, 2019). Hindu e colaboradores (2018) realizaram um estudo associativo com 923 linhagens de milho para teor de zinco e ferro nos grãos e identificaram 20 SNPs para Zn e 26 para Fe. Nesse trabalho, novas regiões genômicas foram identificadas para teor de Zn e Fe (HINDU *et al.*, 2018). O gene *GRMZM2G489070*, localizado no cromossomo 9, foi identificado como comum para conteúdo de Zn e Fe em grãos de milho.

2.5. ANÁLISE DIALÉLICA PARA ESTUDOS GENÉTICOS DE CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS

A análise dialélica é empregada nos programas de melhoramento de milho para identificação de combinações superiores e estimação de parâmetros genéticos. Esta metodologia permite estimar a capacidade de combinação dos parentais em avaliação, bem como inferir sobre o tipo de ação gênica para diversas características, como produtividade de grãos e teores nutricionais, auxiliando os melhoristas na seleção (HIREMATH *et al.*, 2013). De acordo com Hallauer *et al.* (2010), a análise dialélica é definida como cruzamento realizado em pares para n parentais, onde o mesmo indivíduo pode ser utilizado como parental masculino ou feminino nos cruzamentos. É um método amplamente utilizado para investigar as propriedades genéticas dos parentais. A análise dialélica pode ser utilizada na escolha de populações para melhoramento intrapopulacional, estudos detalhados da heterose em híbridos, efeitos genéticos envolvidos no controle de características de importância para o melhoramento e na escolha de parentais para hibridação.

Diversos métodos de análise dialélica têm sido propostos, sendo Hayman (1954), Griffing (1956) e Gardner e Eberhart (1966), os mais utilizados. O método de Hayman visa identificar os efeitos genéticos de aditividade e de dominância, enquanto o método de Gardner e Eberhart tem como foco a heterose e seus componentes. Por sua vez, o método de Griffing tem como objetivo avaliar o desempenho dos parentais em combinações híbridas, por meio da capacidade geral e específica de combinação (CGC e CEC, respectivamente).

O modelo da análise dialélica pode ser completo (modelo I, II, III e IV de Griffing 1956), incompleto, parcial ou circulante. No modelo completo, todos os cruzamentos (híbridos) são incluídos, os parentais e recíprocos são facultativos. O modelo incompleto é semelhante ao modelo completo, no entanto, ocorrem perdas de cruzamentos específicos. Já no modelo parcial, os parentais são divididos em grupos distintos e os cruzamentos são realizados entre os grupos. Finalmente, no modelo circulante, n parentais são avaliados em k combinações híbridas.

Os métodos propostos por Griffing podem variar em relação à inclusão dos parentais e/ou cruzamentos recíprocos. Quatro métodos podem ser aplicados, conforme o exemplo a seguir: Método I - inclui todos os possíveis cruzamentos (F_1 e

recíprocos) e os parentais (n), sendo avaliados n^2 genótipos; Método II - envolve o conjunto de parentais e seus cruzamentos, sem incluir os recíprocos, avaliando um total de $n(n+1)/2$ genótipos; Método III - todos os cruzamentos são incluídos (F_1 's e recíprocos), ficando de fora os parentais, totalizando $n(n-1)$ genótipos para avaliação; e Método IV - apenas um conjunto de $n(n-1)/2$ cruzamentos é incluído, excluindo os parentais e os cruzamentos recíprocos.

Sprague e Tatum (1942) propuseram o termo capacidade geral e específica de combinação. Através da análise dialélica, é possível verificar a CGC e a CEC, além dos efeitos genéticos para uma determinada característica, como efeitos aditivos (CGC), de dominância e epistasia (CEC) para determinado grupo de linhagens ou população.

Desde que a análise dialélica foi proposta, milhares de trabalhos têm empregado tal método no melhoramento do milho. Osorno e Carena (2008), por meio de cruzamentos dialélicos, avaliaram o conteúdo de amido entre 10 populações de milho adaptadas aos Estados Unidos. Os autores verificaram efeitos significativos de CGC e CEC, sendo que os efeitos de CEC foram mais significativos para conteúdo de amido, indicando maior importância dos efeitos não-aditivos. Long *et al.* (2004) avaliaram cruzamentos dialélicos entre 14 linhagens adaptadas ao sul da África para concentração de zinco e ferro nos grãos e verificaram que a CGC foi mais importante do que a CEC, indicando que a avaliação *per se* de linhagens pode indicar linhagens promissoras.

3 ARTIGO A: Estudo de associação genômica ampla para identificar polimorfismo de nucleotídeos únicos associados à concentração de minerais na cultura do milho

Luiz Júnior Perini¹, Douglas Mariani Zeffa², Jéssica Delfini¹, Antoni Wallace Marcos¹, Filipe Augusto Bengosi Bertagna², Carlos Alberto Scapim² e Leandro Simões Azeredo Gonçalves^{1*}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil

²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil

*Autor de Correspondência:

E-mail: leandrosag@uel.br

RESUMO. O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais alimentos básicos empregados na dieta de milhões de pessoas na África e América Latina. Com o objetivo de melhorar o conteúdo de nutrientes no grão de milho, o presente estudo teve como objetivo identificar regiões genômicas associadas ao conteúdo nutricional em um painel de 132 linhagens de milho grão e pipoca utilizando 273775 SNPs. O painel foi fenotipado para quatro nutrientes (cálcio - Ca, magnésio - Mg, ferro - Fe e zinco - Zn) em duas safras agrícolas no município de Londrina, Paraná, Brasil. Para o estudo de associação genômica foram utilizados cinco métodos multi-*loci* (FASTmrEMMA, FASTmrMLM, ISIS EM-BLASSO, mrMLM e pLARmEB). Com a finalidade de obter resultados mais precisos, apenas os QTNs (*Quantitative Trait Nucleotide*) que apresentaram repetibilidade, ou seja, que foram detectados pelo menos três vezes por diferentes métodos ou ambientes, foram considerados verdadeiramente significativos e foram utilizados na busca por alelos superiores e genes candidatos. Foi observada uma ampla variabilidade para os teores de nutrientes nos acessos avaliados, com valores de herdabilidade variando de 0,40 (Mg) a 0,52 (Zn). Um total de 637 QTNs foram detectados para os quatro nutrientes, sendo que destes, 39 apresentaram repetibilidade e foram utilizados para os demais estudos. O número de QTNs encontrado foi 11, 10, 10 e oito para Ca, Mg, Zn e Fe, respectivamente. O acúmulo de alelos superiores em um mesmo acesso revelou aumento gradual no teor de nutrientes no grão, indicando que essas marcas genéticas podem ser utilizadas em futuros programas de melhoramento visando a biofortificação do milho. Os *loci* identificados no presente trabalho serão importantes para o melhoramento de milho grão e pipoca de origem tropical no Brasil para as características nutricionais estudadas.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; biofortificação; GWAS; alelos favoráveis.

ABSTRACT. Maize (*Zea mays* L.) is one of the main staple foods for millions of people in Africa and Latin America. In order to improve nutrient content in maize, the present study aimed to identify genomic regions associated with nutritional contents in a panel with 132 field and popcorn maize inbred lines and 273775 SNPs. The panel was phenotyped for four nutrients (calcium – Ca, magnesium – Mg, iron – Fe, and zinc – Zn) in two crop seasons in Londrina, Paraná State, Brazil. For the genomic association study, five multi-loci methods (FASTmrEMMA, FASTmrMLM, ISIS EM-BLASSO, mrMLM, and pLARmEB) were applied. In order to obtain more accurate results, only the QTNs (*Quantitative Trait Nucleotide*) that showed repeatability, in other words, that were detected at least three times by different methods or environments, were considered significant and were used to look for superior alleles and candidate genes. A wide variability for nutrient content was observed in the evaluated accessions, with heritability values ranging from 0,40 (Mg) to 0,52 (Zn). A total of 637 QTNs were detected for the four nutrients, in which 39 showed repeatability and were utilized for further studies. The numbers of QTNs found were 11,10,10, and eight for Ca, Mg, Zn, and Fe, respectively. The accumulation of superior alleles in the same accession revealed a gradual increase in grain nutrient content, indicating that these marks can be applied in future breeding programs aiming at maize biofortification. The *loci* identified in the present study will be important for tropical field corn and popcorn breeding in Brazil concerning the nutritional traits studied.

Keywords: *Zea mays* L.; biofortification; GWAS; favorable alleles.

INTRODUÇÃO

O grão de milho (*Zea mays* L.) é uma importante fonte de carboidratos, o qual compõe 65-75% do seu peso total (LIU *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2019; WILSON *et al.*, 2004). O milho e seus produtos constituem por volta de 30% do suprimento alimentar nas Américas, 38% na África e 6,5% na Ásia, sendo uma importante fonte de segurança alimentar e desenvolvimento econômico (PRASANNA *et al.*, 2020). No entanto, em regiões em que a população tem uma dieta altamente dependente de produtos derivados do milho, pessoas tendem a apresentar deficiências para importantes nutrientes como vitamina A, ferro (Fe) e zinco (Zn), o que desencadeia problemas graves de saúde (SALTZMAN *et al.*, 2013; PALACIOS-ROJAS *et al.*, 2020; PRASANNA *et al.*, 2020). Aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo sofrem com problemas de deficiência de micronutrientes (BOUIS; SALTZMAN, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Dentre as diferentes estratégias para enriquecer a dieta humana com micronutrientes, a biofortificação é considerada a abordagem mais viável e econômica (BOUIS; SALTZMAN, 2017). A biofortificação consiste em aumentar a concentração de vitaminas e minerais em uma cultura por meio do manejo cultural e/ou melhoramento genético de plantas (método convencional ou engenharia genética) (DELFINI *et al.*, 2020). Na cultura do milho, diversos trabalhos vêm sendo conduzidos visando o desenvolvimento de cultivares biofortificadas como, por exemplo, com alta qualidade de proteína (QPM) (COOK *et al.*, 2012; TANDZI *et al.*, 2010) e enriquecidas com pró-vitamina A (AZMACH *et al.*, 2018; OWENS *et al.*, 2014; SUWARNO *et al.*, 2015), vitamina E (FENTON *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2012), zinco (HINDU *et al.*, 2018; MAQBOOL; BESHIR, 2019) e ferro (HINDU *et al.*, 2018).

Para Fe e Zn, diversos estudos têm demonstrado uma ampla variabilidade genética para a cultura do milho (CHEN *et al.*, 2007; HINDU *et al.*, 2018; MALLIKARJUNA *et al.*, 2015; MAZIYA-DIXON *et al.*, 2010; PIXLEY *et al.*, 2011), indicando um potencial considerável para aumento dessas características via melhoramento de plantas. No entanto, o controle genético para os teores desses nutrientes nos grãos é complexo, sendo características reguladas por muitos genes que são influenciados por diversos fatores, tais como condições ambientais,

mobilização do nutriente no solo, aquisição pela raiz, translocação, redistribuição dentro da planta e deposição na semente (HINDU *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2013; MALLIKARJUNA *et al.*, 2020).

O estudo de associação genômica ampla (GWAS) possibilita a investigação da enorme diversidade genética do milho para desvendar os mecanismos moleculares de características complexas como a absorção de minerais e seu acúmulo nos grãos (HINDU *et al.*, 2018). O método usa numerosas recombinações históricas em uma grande população natural que oferece potencial para localizar características genéticas efetivamente determinantes em uma região mais estreita. Além disso, a aplicação do polimorfismo do nucleotídeo único (SNP) em estudo de GWAS fornece uma ampla cobertura do genoma, ajudando a identificar variações funcionais que governam a característica (CORTES *et al.*, 2021; GUPTA *et al.*, 2019; KORTE; FARLOW, 2013).

O avanço das tecnologias de NGS permitiu também o progresso de técnicas que visam identificar marcadores SNPs. Com essa finalidade, a técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS) tem sido amplamente utilizada em plantas (NADEEM *et al.*, 2018; RASHEED *et al.*, 2017). Nessa abordagem, empregam-se enzimas de restrição para reduzir a complexidade dos genomas. Assim o sequenciamento se limita às regiões que circundam o sítio de corte dessas enzimas. Além disso, adaptadores específicos são ligados às extremidades dos fragmentos de DNA, permitindo a multiplexação de amostras para o sequenciamento em uma mesma reação, o que reduz drasticamente o custo da genotipagem (ELSHIRE *et al.*, 2011).

Um ponto importante para os estudos de GWAS é o modelo matemático aplicado para a associação do marcador com a característica alvo. Com o avanço da genética quantitativa molecular, vários métodos de mapeamento por associação têm sido desenvolvidos para a dissecação genética das características complexas. A maioria dos trabalhos desenvolvidos para a cultura do milho utiliza modelos de GWAS *single-locus*, como, por exemplo, os modelos lineares gerais (*General linear model* – GLM) e mistos (*Mixed linear models* – MLM). Esses modelos testam a significância da associação marcador-característica de um marcador por vez, resultando em associações significativas baseadas em uma correção rigorosa para múltiplos testes (por exemplo, Bonferroni e FDR – *False Discovery rate*). Devido a

esse rigor de alta significância, esses métodos só detectam *Quantitative Trait Nucleotides* (QTN) de grande efeito, deixando de identificar poligenes de pequeno efeito para características complexas (LAN *et al.*, 2020).

Métodos alternativos multi-*loci* têm sido propostos para solucionar esse problema, com a grande vantagem de que não é utilizada a correção de Bonferroni para múltiplos testes. Alguns desses métodos são FASTmrEMMA (WEN *et al.*, 2018), FASTmrMLM (TAMBA; ZHANG, 2018), ISIS EM-BLASSO (TAMBA *et al.*, 2017), mrMLM (WANG *et al.*, 2016) e pLARmEB (ZHANG *et al.*, 2017). Essas abordagens diferem dos outros métodos multi-*loci* pelo fato de possuírem duas etapas. A primeira etapa considera o efeito do SNP como aleatório e todos os marcadores potencialmente associados são selecionados por um modelo MLM de efeito aleatório do SNP (*random-SNP-effect*; MLM) com uma correção modificada de Bonferroni para o teste de significância. Na segunda etapa, todos os marcadores são colocados em um único modelo e todos os efeitos diferentes de zero são detectados por um teste de razão de verossimilhança para identificação de QTNs (CHANG *et al.*, 2018).

Há poucos relatos na literatura sobre o mapeamento associativo em germoplasma de milho tropical e pipoca, sendo que grande parte dos estudos tem sido realizada com milho temperado. Germoplasma de milho temperado possui base genética mais estreita em relação ao milho tropical. Nesse contexto, identificar QTLs e realizar o mapeamento associativo em milho tropical pode revelar novos genes ou regiões genômicas que atuam no aumento do teor de nutrientes. Nosso estudo utilizou a plataforma Illumina HiSeq 2000 para realizar a genotipagem de um painel diverso de 132 linhagens de milho grão e pipoca de germoplasma tropical por meio de GBS e descobrir SNPs associados ao conteúdo de nutrientes no grão.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Um painel com 132 linhagens de milho (Tabela 1.1), formado por 77 acessos de milho grão e 55 de milho pipoca adaptados às condições tropicais, foi avaliado em condições de campo, na safra 2018/2019 e segunda safra de 2019. Este painel é proveniente do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá.

Tabela 1.1 – Lista das linhagens de milho do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá, genotipadas por marcadores SNPs e utilizadas no estudo de GWAS

| Número | Genotipagem BID | Grupo | Número | Genotipagem BID | Grupo | Número | Genotipagem BID | Grupo |
|--------|---------------------|--------|--------|----------------------|--------|--------|----------------------|--------|
| 1 | 100-P7-2-3 | Pipoca | 23 | 136-TORK-53H20.2 | Grão | 45 | 162-P1780 | Pipoca |
| 2 | 102-PREMIUM-28H13.2 | Grão | 24 | 137-POP203-56.1 | Grão | 46 | 163-POP102-91.2 | Grão |
| 3 | 103-CML19 | Grão | 25 | 138-POP102-166.5 | Grão | 47 | 164-30-11 | Grão |
| 4 | 104-P1-3 | Pipoca | 26 | 139-A2560-62H23.2 | Grão | 48 | 165-POP101-197.1 | Grão |
| 5 | 105-DKB747-45H17.5 | Grão | 27 | 140-POP101-195.2 | Grão | 49 | 167-29-154 | Grão |
| 6 | 106-ANGELA-L70 | Pipoca | 28 | 141-P9-1-3 | Pipoca | 50 | 16-FORT-87H6.4-248 | Grão |
| 7 | 107-GP11-1 | Pipoca | 29 | 142-FLASH-22H11.1 | Grão | 51 | 170-DKB747-40H17.3 | Grão |
| 8 | 108-FORT-85H6.2-242 | Grão | 30 | 144-P9-11-1 | Pipoca | 52 | 171-FORT-86H6.3 | Grão |
| 9 | 109-DKB747-29H17.3 | Grão | 31 | 145-BEIJAFLOL-L76 | Pipoca | 53 | 174-A2560-176 | Grão |
| 10 | 111-AG8080-8H3.2-6 | Grão | 32 | 147-P8-1-5-5 | Pipoca | 54 | 175-A2560-164 | Grão |
| 11 | 115-DKB747-37H17.2 | Grão | 33 | 148-P9-8-1 | Pipoca | 55 | 176-DKB747-41-101 | Grão |
| 12 | 117-GP14 | Pipoca | 34 | 149-TORK-55H20.3 | Grão | 56 | 177-DKB747-47-121 | Grão |
| 13 | 119-VlcOSA-L77 | Pipoca | 35 | 14-P8-1-1 | Pipoca | 57 | 17-P1-9 | Pipoca |
| 14 | 11-DKB350-78H30.1 | Grão | 36 | 151-FORT-84H6.1 | Grão | 58 | 183-P9-2-3 | Pipoca |
| 15 | 121-ANGELA-L71 | Pipoca | 37 | 152-P8-1-5-13 | Pipoca | 59 | 185-P9-1-6 | Pipoca |
| 16 | 122-30F33-70H23.1 | Grão | 38 | 153-CD303-91.H4.4 | Grão | 60 | 189-DKB440-73-H28.1 | Grão |
| 17 | 126-30F98-75H29.2 | Grão | 39 | 155-DAS2C599-95H34.4 | Grão | 61 | 18-P11-1 | Pipoca |
| 18 | 127-ANGELA-L66 | Pipoca | 40 | 156-CML12 | Grão | 62 | 190-Premium-29-h13.3 | Grão |
| 19 | 128-P3-1-2 | Pipoca | 41 | 157-GP12 | Pipoca | 63 | 192-DAS2C595-95 | Grão |
| 20 | 12-DKB747-50H17.6 | Grão | 42 | 15-P20 | Pipoca | 64 | 193-DAS2C599-93 | Grão |
| 21 | 131-CD303-90H4.3 | Grão | 43 | 160-SPEED-81H33.1 | Grão | 65 | 195-BEIJAFLOL-L55 | Pipoca |
| 22 | 134-P9-5-3 | Pipoca | 44 | 161-P6-11 | Pipoca | 66 | 199-PRO23-245-1 | Grão |
| 67 | 19-P3-3T | Pipoca | 96 | 56-DKB747-36H17.2 | Grão | 125 | 89-30-29 | Grão |
| 68 | 1-GP1 | Pipoca | 97 | 58-P9-5-1 | Pipoca | 126 | 8-P7-L7-1 | Pipoca |
| 69 | 200-URUG298-98-2 | Pipoca | 98 | 59-POP202-177.1 | Grão | 127 | 90-POP103-81.4 | Grão |

(Continuação da Tabela 1.1)

| Número | Genotipagem BID | Grupo | Número | Genotipagem BID | Grupo | Número | Genotipagem BID | Grupo |
|--------|--------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|------------------|--------|
| 70 | 206-CHZM13134-66-2 | Grão | 99 | 5-T5-AVANT-14H5.5 | Grão | 128 | 92-POP202-76.1 | Grão |
| 71 | 207-SAM274-2 | Pipoca | 100 | 60-FLASH-20H11.1 | Grão | 129 | 96-P19 | Pipoca |
| 72 | 20-T1-P8-2 | Pipoca | 101 | 61-DAS422-80H31.2 | Grão | 130 | 97-DKB350-19H9.1 | Grão |
| 73 | 25-30F33-69H26.1 | Grão | 102 | 62-P8-2-2-5 | Pipoca | 131 | 98-AVANT-13H5.4 | Grão |
| 74 | 26-P1-12 | Pipoca | 103 | 64-P8-1-5-10 | Pipoca | 132 | 99-W57 | Grão |
| 75 | 27-GP13 | Pipoca | 104 | 65-P9-1-2 | Pipoca | | | |
| 76 | 28-P9-1 | Pipoca | 105 | 66-30-23 | Grão | | | |
| 77 | 29-P7-2-4 | Pipoca | 106 | 67-POP201-198.4 | Grão | | | |
| 78 | 2-GP4 | Pipoca | 107 | 68-A2560-66H23.4 | Grão | | | |
| 79 | 30-DKB747-43H17.4 | Grão | 108 | 69-TORK-54H20.3 | Grão | | | |
| 80 | 31-CD303-89H4.2 | Grão | 109 | 6-POP103-88.1 | Grão | | | |
| 81 | 33-P9-4-5 | Pipoca | 110 | 71-31-88 | Grão | | | |
| 82 | 36-P6-1 | Pipoca | 111 | 72-P7-4-5 | Pipoca | | | |
| 83 | 38-AVANT-10H5.1 | Grão | 112 | 74-P9-12-1 | Pipoca | | | |
| 84 | 39-DKB747-41H17.3 | Grão | 113 | 76-POP102-90.1 | Grão | | | |
| 85 | 3-P9-4-6 | Pipoca | 114 | 77-29-14 | Grão | | | |
| 86 | 40-P8-1-5-9 | Pipoca | 115 | 78-31-97 | Grão | | | |
| 87 | 41-P1-19 | Pipoca | 116 | 79-POP202-88.2 | Grão | | | |
| 88 | 42-P18 | Pipoca | 117 | 7-30F33-71H26.2 | Grão | | | |
| 89 | 43-DKB350-76H30.1 | Grão | 118 | 80-30-15 | Grão | | | |
| 90 | 46-P4-4 | Pipoca | 119 | 81-T3-P9-3-2 | Pipoca | | | |
| 91 | 47-P8-2-2-2 | Pipoca | 120 | 82-POP201-192.1 | Grão | | | |
| 92 | 49-AVANT-12H5.3 | Grão | 121 | 83-29-92 | Grão | | | |
| 93 | 4-AG8080-7H3.1 | Grão | 122 | 84-POP203-51.2 | Grão | | | |
| 94 | 51-P8-2-MULT | Pipoca | 123 | 86-CML13 | Grão | | | |
| 95 | 54-GP10 | Pipoca | 124 | 88-POP103-80.5 | Grão | | | |

Condição experimental

Os experimentos foram conduzidos na área experimental da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (23°20'23"S, 51°12'32"O, 532 m de altitude), na safra 2018/2019 e segunda safra de 2019 (representando dois ambientes). O solo da área experimental da UEL é classificado como Latossolo Vermelho eutroférico. O clima é classificado como subtropical úmido mesotérmico - Cfa, segundo classificação de Köppen. Os dados de precipitação, temperatura máxima e mínima foram obtidos do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IDR-PR (Figura 1.1).

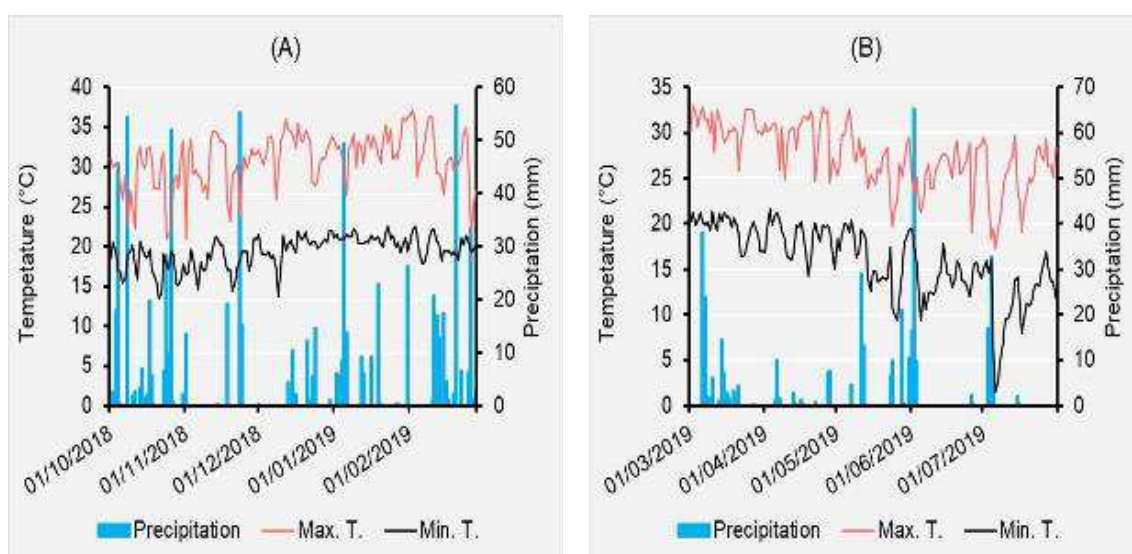


Figura 1.1 – Dados diários da precipitação e temperatura máxima e mínima durante o período experimental em Londrina 2018 (A) e 2019 (B).

As análises químicas do solo (0-20 cm) foram realizadas anteriormente à instalação dos experimentos, apresentando os seguintes resultados para safra 2018/2019 e segunda safra 2019, respectivamente: $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 5,2$ e $5,2$; $\text{P} = 9,42$ e $9,33 \text{ mg dm}^{-3}$; $\text{K}^+ = 2,43$ e $2,43 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{Ca}^{+2} = 5,18$ e $5,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{Mg}^{+2} = 2,12$ e $2,12 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $\text{CTC} = 9,74$ e $10,36 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. Com base nos resultados da análise química, aplicou-se 300 Kg ha^{-1} no sulco de semeadura do formulado 04-30-10. Além da adubação nitrogenada de semeadura, realizaram-se duas aduções de N em cobertura (nas fases V3 e V6), totalizando $240 \text{ Kg de N ha}^{-1}$ disponibilizado para a cultura.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos completos ao acaso com três repetições e 132 tratamentos. As parcelas foram constituídas

por 1 linha de 3 m de comprimento, com espaçamento de 0,45 m entre linhas e 3,2 sementes por metro linear. Os experimentos foram implantados manualmente nas duas safras. Foram semeadas duas sementes por cova com desbaste após a emergência, garantindo uma população final de 71.111 plantas ha^{-1} . A área útil das parcelas foi definida como 2 m centrais da linha, retirando 0,5 m de cada extremidade. Durante o ciclo da cultura, as plantas foram irrigadas e foram adotadas práticas de manejo recomendadas para a cultura. O manejo de plantas daninhas, pragas e doenças foi realizado com base nas recomendações técnicas para o milho.

Fenotipagem

As seguintes características foram avaliadas: conteúdo de cálcio, magnésio, ferro e zinco. Para a quantificação de nutrientes nos grãos, após a maturidade fisiológica, foi efetuada a colheita de cada parcela experimental, retirando-se uma amostra de 100 g de sementes sem danos físicos ou danos causados por insetos e livres de doenças, as quais foram armazenadas em câmara fria com temperatura de 5,6 °C e 33% de umidade, até a realização das análises laboratoriais.

Para determinação do conteúdo de micronutrientes, as amostras de cada parcela foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para estufa com ventilação forçada a 65 °C até peso constante. Em seguida, as amostras foram moídas e homogeneizadas. Os nutrientes foram quantificados pelo método de Silva (2009). Inicialmente foi realizada uma digestão nitroperclórica com solução de $HNO_3:HClO_4$, na proporção 3:1, de 0,5 g da farinha de cada amostra em um tubo digestor de 80 mL. A concentração foi determinada por fotometria de chama e espectrofotometria de absorção atômica.

Análise dos dados fenotípicos

A análise de variância dos dados foi realizada por meio do software SAS (SAS INSTITUTE, 2000), empregando a função PROC GLM e o modelo estatístico: $Y_{ijk} = \mu + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + \epsilon_{ijk}$, em que: Y_{ijk} : representa o i -ésimo genótipo no j -ésimo ambiente e no k -ésimo bloco; μ : é a média geral;

G_i : é o efeito do i -ésimo genótipo; B/A_{jk} : corresponde ao bloco dentro de ambiente no j -ésimo ambiente e no k -ésimo bloco; A_j : é o efeito do j -ésimo ambiente; GA_{ij} : é o efeito da interação do i -ésimo genótipo com o j -ésimo ambiente; ε_{ijk} : é o efeito do erro experimental. As médias ajustadas para cada genótipo em cada ambiente e as médias dos ambientes foram obtidas por meio da ferramenta LSmeans do procedimento GLM. A herdabilidade (h^2) foi estimada por meio da equação $h^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_F$, em que, as variâncias genotípicas (σ^2_G) e fenotípicas (σ^2_F) foram estimadas pelas seguintes equações: $\sigma^2_G = (QM_G - QM_E)/ra$ e $\sigma^2_F = QM_G/ra$, em que, QM_G é o quadrado médio de genótipos; QM_E é o quadrado médio do erro, r é o número de repetições e a o número de ambientes. As representações gráficas como histograma, correlação de Pearson e box plot foram obtidas por meio do software R (R PROGRAM, 2020).

DNA genômico e descoberta de SNPs por GBS

Os procedimentos da extração de DNA, genotipagem e processamento de dados foram realizados no *Institute of Genomic Diversity* na *Cornell University*, conforme descrito por Coan *et al.* (2018).

Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs foi estimado utilizando o pacote “LDcorSV” (DESROUSSEAU *et al.*, 2017) do software R. Esse pacote corrige o LD de vieses causados devido à estrutura populacional e parentesco. Além do r^2 convencional, foram calculados o r^2 corrigido pela estrutura populacional (r^2_s), r^2 considerando o parentesco (*kinship*) (r^2_v) e, por fim, r^2 incluindo estrutura populacional e parentesco (r^2_{vs}). Como estrutura populacional, foi utilizado o resultado do software STRUCTURE para $K=2$ e a matriz de parentesco foi calculada utilizando o pacote “rrBLUP” (ENDELMAN, 2011) do R. O *LD decay* foi calculado por um método não linear (HILL; WEIR, 1988) e ajustado com a função *n/s* no programa R.

Estudo de associação genômica ampla

Foram utilizados cinco métodos multi-*loci* de GWAS implementados no software mrMLM.GUI 4.0 (YA-WEN *et al.*, 2019), a fim de detectar QTNs significantes para as características alvo, sendo eles FASTmrEMMA, FASTmrMLM, ISIS EM-BLASSO, mrMLM e pLARmEB. Para minimizar falsos positivos e aumentar o poder da análise, a estrutura populacional (Q) e a matriz de *kinship* (K) foram incluídas no modelo. O resultado do software Structure k=2 foi utilizado para Q e a matriz de *kinship* foi calculada pelo software mrMLM.GUI 4.0. Os parâmetros utilizados foram os padrões, e o valor crítico para associações significativas foi $LOD \geq 3$ para todos os métodos. Os dados fenotípicos utilizados para GWAS foram as médias ajustadas de cada um dos dois ambientes e a média geral ajustada (2018, 2019 e LSmeans). Com a finalidade de obter resultados mais precisos, apenas os QTNs que apresentaram repetibilidade, ou seja, que foram detectados pelo menos três vezes por diferentes métodos ou ambientes, foram considerados verdadeiramente significativos e foram utilizados na busca por alelos superiores e por genes candidatos.

Identificação de alelos superiores

Para cada QTN, todos os acessos do painel foram, primeiramente, divididos em dois grupos baseados no genótipo do QTN e foram identificados os alelos que causam efeito positivo no fenótipo, ou seja, que aumentam o teor de minerais. Foi identificado, então, o número de alelos superiores ou favoráveis em cada acesso, bem como verificado se o acúmulo desses alelos superiores em um mesmo acesso resulta em teores nutricionais superiores.

Busca por genes candidatos

Potenciais genes candidatos foram buscados em torno dos QTNs que foram detectados por múltiplos métodos. O raio de busca (distância física) foi determinado de acordo com o ponto no qual ocorre a metade do decaimento (*half decay*) do LD corrigido pela estrutura populacional e parentesco (r^2_{vs}). Os genes presentes na região de associação foram identificados

baseando-se na anotação do genoma de referência do milho *Zea mays* publicado no website Phytozome v10.3 (<http://phytozome.net>). Em seguida, os genes com funções putativas conhecidas, de acordo com a anotação de Ontologia Genética (GeneOntology; GO, <http://www.geneontology.org/>) relacionadas às características de interesse, foram selecionados como genes candidatos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Nutricional

Foram determinados os teores de quatro minerais (Ca, Mg, Fe e Zn) nos grãos das linhagens de milho (grão e pipoca) do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá (UEM) em duas safras (2018/2019 e 2019). Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 1.2 e a Figura 1.2 traz as distribuições de frequência do conteúdo desses minerais em cada uma das safras.

Tabela 1.2 – Análise de variância e estatística descritiva para diferentes teores de minerais detectados nos 132 acessos de milho avaliados em duas safras no município de Londrina, Paraná, Brasil

| Fonte de variação | Quadrado Médio ^{1/} | | | |
|-----------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Mg (mg kg ⁻¹) | Ca (mg kg ⁻¹) | Fe (mg kg ⁻¹) | Zn (mg kg ⁻¹) |
| Rep/Amb | 0,02 | 0,15 | 108,50 | 17,86 |
| Ambientes (A) | 0,62** | 62,44** | 24555,01** | 3888,23** |
| Genótipos (G) | 0,15** | 0,38** | 260,41** | 170,24** |
| G × A | 0,14** | 0,42** | 235,63** | 190,76** |
| Resíduo | 0,09 | 0,20 | 132,44 | 80,42 |
| CV (%) | 24,18 | 51,72 | 23,97 | 18,95 |
| <i>h</i> ² | 0,40 | 0,47 | 0,49 | 0,52 |
| Média 2018 | 1273 | 923 | 48,96 | 47,59 |
| Média 2019 | 1310 | 1290 | 56,61 | 50,57 |

^{1/} * e ns = significativo e não significativo ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste F.

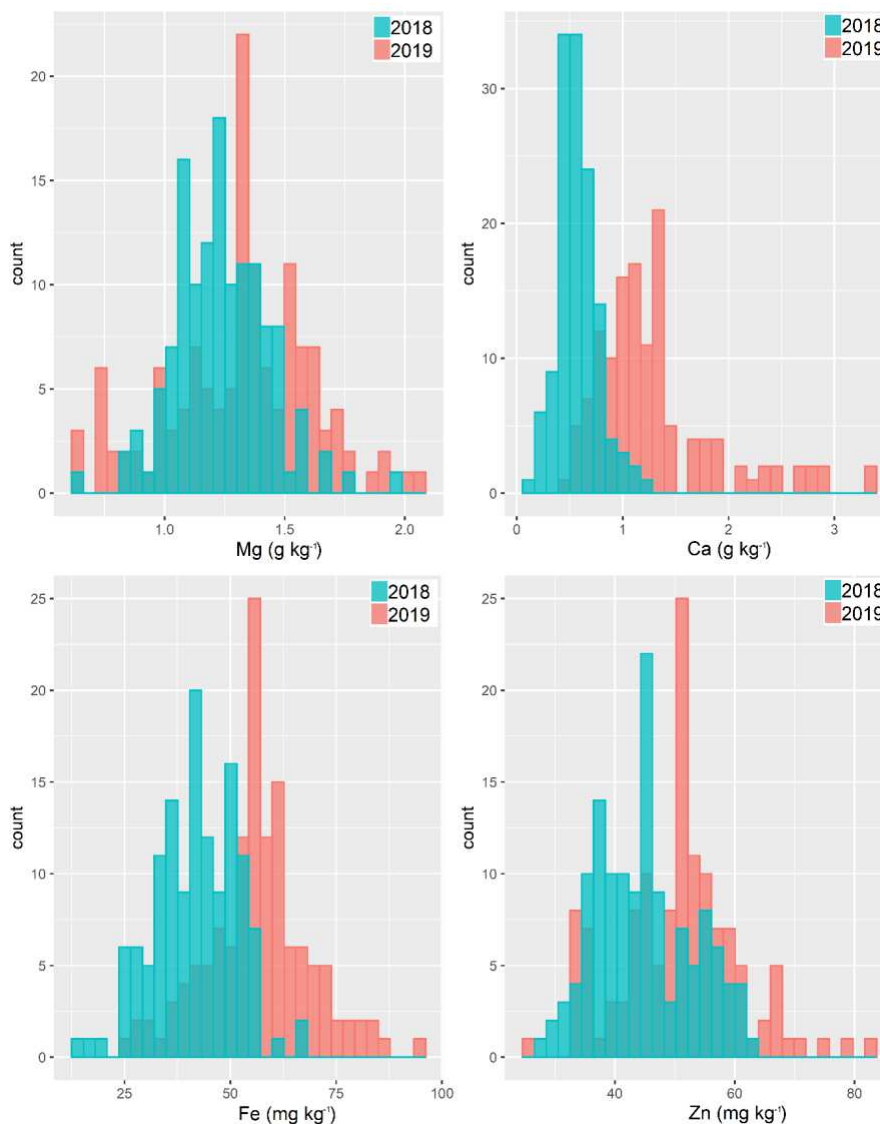


Figura 1.2 – Distribuição de frequências para teor de magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), e zinco (Zn) em 132 linhagens de milho grão e pipoca de origem tropical, avaliadas na safra de 2018/2019 e segunda safra de 2019 em Londrina.

Pela ANOVA, foi observado efeito significativo para todos os nutrientes avaliados para as fontes de variação genótipos (G), ambientes (A), e interação G x A, indicando uma ampla variabilidade dos genótipos e das safras avaliadas. Os coeficientes de variação foram 24,18% (Mg), 51,72% (Ca), 23,97% (Fe) e 18,95% (Zn), apresentando boa qualidade experimental, enquanto os valores de herdabilidade (h^2) foram 0,40 (Mg), 0,47 (Ca), 0,49 (Fe) e 0,52 (Zn). Para estimativas de herdabilidade, Šimić *et al.* (2009) avaliaram 294 famílias F_4 de linhagens de milho oriundas do cruzamento entre B84 x Os6-2 na Croácia e encontraram valores de h^2 de 0,46 para Fe e 0,59 para Zn, sendo similares às

estimativas deste estudo. No entanto, variações podem ocorrer devido a interação genótipo ambiente.

Os teores médios dos nutrientes (Mg, Ca, Fe e Zn) foram maiores na safra de 2019. Para esses nutrientes os valores médios obtidos foram de 1273, 923, 48,96 e 47,59 mg ha⁻¹, respectivamente, para 2018, enquanto para 2019, foram de 1310, 1290, 56,61 e 50,57 mg ha⁻¹, respectivamente. Para teores de Fe e Zn, Bänziger e Long (2000), avaliando mais de 1400 linhagens e 400 variedades locais de milho em diferentes ambientes no México e Zimbábue, verificaram valores entre 9,6 a 63,2 mg Kg⁻¹ para Fe e 12,9 a 57,6 mg Kg⁻¹ para Zn. Em outro estudo, Maziya-Dixon *et al.* (2020) avaliaram 120 linhagens de milho na Nigéria e observaram valores variando de 13,6 a 159 mg Kg⁻¹ para Fe e 11,6 a 95,6 mg Kg⁻¹ para Zn. Por meio de análises de concentração de Fe e Zn em mais de 1000 genótipos de milho melhorados e 400 *landraces* oriundas do CIMMYT cultivados em diferentes ambientes, Ortiz-Monasterio *et al.* (2007) encontraram valores de Fe que variaram de 20 a 39 e Zn de 25 a 47.

Essas variações podem estar relacionadas às características genéticas dos materiais e ao efeito ambiental, como, por exemplo, o tipo do solo e o conteúdo e disponibilidade do nutriente no solo (AKHTAR *et al.*, 2018; JOY *et al.*, 2015; WHITE; BROADLEY, 2008; ZHAO *et al.*, 2020). A disponibilidade do Fe e Zn é altamente dependente do pH do solo, sendo que, no presente estudo, o pH foi de 5,2. Esse pH mais ácido favorece a disponibilidade de micronutrientes, incluindo o Fe e o Zn (CAMARGO *et al.*, 1982).

Para teores de Ca e Mg, Menkir (2008) avaliou 278 linhagens de milho em diferentes ambientes e verificou uma variação de 40 a 69 mg Kg⁻¹ para Ca e 1137 a 1216 mg Kg⁻¹ para Mg. Esses valores de Ca estão muito abaixo dos números encontrados no presente trabalho. Por outro lado, segundo Fornasieri (2007), os valores de referência nos grãos de cultivares de milho híbrido são de 2900 mg Kg⁻¹ para Ca e 8300 mg Kg⁻¹ para Mg. Esses resultados corroboram os obtidos neste trabalho, uma vez que, a absorção e acúmulo de nutrientes em linhagens de milho é menor quando comparado com híbridos.

Correlação

Pela análise de correlação de Pearson, associações de baixa magnitude foram observadas entre Mg e Ca (0,29, $p < 0,01$), Mg e Zn (0,21, $p = 0,018$) e Ca e Fe (0,18, $p = 0,037$). Por sua vez, para Fe e Zn, a correlação foi moderada (0,44, $p < 0,01$). Diversos pesquisadores têm reportado uma correlação significativa ($r = 0,37$ a $0,52$) entre Fe e Zn em grãos de milho em diferentes ambientes (BAXTER *et al.*, 2014; LUNG'AHU *et al.*, 2011; MALLIKARJUNA *et al.*, 2015; QIN *et al.*, 2012; THAKUR *et al.*, 2015). Essas correlações podem ser influenciadas por diversos fatores ambientais e genéticos e podem ser atribuídas à ligação ou efeitos pleiotrópicos dos genes. Os fatores genéticos incluem vários genes que codificam proteínas transportadoras de metal no milho ou a presença de transportadores comuns para alguns minerais (AKTAR *et al.*, 2018; HINDU *et al.*, 2018; QIN *et al.*, 2012).

Desequilíbrio de ligação

A análise de desequilíbrio de ligação foi realizada para todos os cromossomos simultaneamente e individualmente (Figura 1.3). Considerando todos os cromossomos, as diferenças entre o r^2 convencional ($r^2 = 0,16$; LD *half decay* = 1,41 kb) e corrigido pela estrutura populacional ($r^2_s = 0,15$; LD *half decay* = 1,27 kb) foram pequenas. Por outro lado, o r^2 foi afetado pelas correções da matriz *kinship* ($r^2_v = 0,07$; LD *half decay* = 0,89 kb) e matriz *kinship* mais estrutura populacional ($r^2_{vs} = 0,07$; LD *half decay* = 0,89 kb), apresentando resultados semelhantes. Segundo Remington *et al.* (2001), o emprego do LD nos estudos de associação genômica permitem uma alta resolução na identificação dos genes que podem contribuir para a variação genética. Esses autores analisaram 102 linhagens de milho representativas da diversidade ao redor do mundo utilizada pelos programas de melhoramento de milho e reportaram que o LD intragênico decai rapidamente com o distanciamento ($r^2 < 0,1$ 1.5 kb), mas entre genes a taxa de declínio é muito variável. Este rápido declínio provavelmente reflete o nível alto e eficiente de recombinação dentro de genes em grandes populações durante a evolução do milho. YAN *et al.* (2009) estimaram o LD de uma coleção de milho global por meio de marcadores SNPs, demonstrando que a distância de decaimento de LD difere entre cromossomos, variando entre 1 a 10 kb.

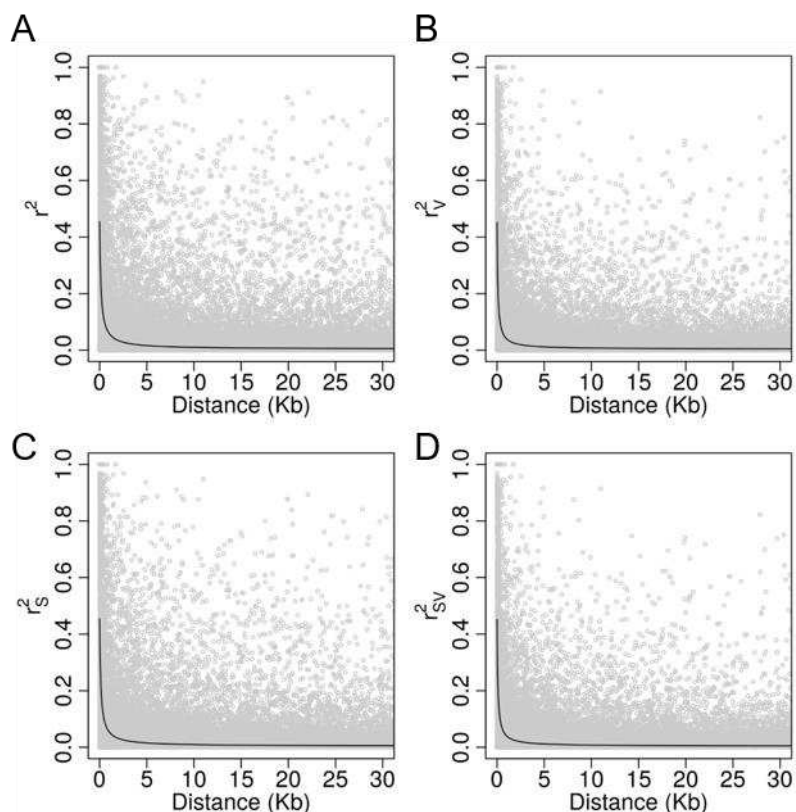


Figura 1.3 – Análise de decaimento do desequilíbrio de ligação (*LD decay*) em função da distância física sem correção (r^2) (A) e corrigido pelo parentesco (*kinship*) (r^2_v) (B), estrutura populacional (r^2_s) (C) e estrutura populacional e parentesco (r^2_{sv}) (D).

Estudo de associação genômica ampla

Ao todo, 637 QTNs foram identificados para os quatro minerais (Ca, Mg, Fe e Zn) nos grãos das linhagens de milho (grão e pipoca). Destes, 39 QTNs foram detectados por pelo menos três métodos dos cinco empregados, sendo esses utilizados para o estudo de associação (Tabela 1.3). O número de QTNs variou entre os minerais, sendo verificados 11, 10, 8 e 10 QTNs para Ca, Mg, Fe e Zn, respectivamente. Hindu *et al.* (2018), em um estudo de associação genômica ampla para teores de Fe e Zn na cultura do milho, identificaram 20 SNPs associados aos teores de Fe e 26 ao Zn.

Tabela 1.3 – QTNs associados a teores de minerais no milho, detectados pelo menos três vezes via diferentes métodos no painel de milho grão e pipoca de origem tropical

| Característica | SNP | Chr | Posição (bp) | Efeito QTN ¹ | LOD score ² | PVE (%) ³ | MAF ⁴ | Gen | Amb ⁵ | Métodos ⁶ |
|----------------|---------------|-----------|---------------|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------|-----|------------------|----------------------|
| Ca | S1_101182292 | 1 | 101182292 | -0.42 ~ -0.06 | 3.32 ~ 6.38 | 0.59 ~ 10.29 | 0.3417 | G | 2,3 | 1,2,5 |
| | S1_265252993 | 1 | 265252993 | -0.15 ~ -0.02 | 3.39 ~ 5.07 | 0.44 ~ 5.19 | 0.375 | G | 3 | 1,2,5 |
| | S1_268405350 | 1 | 268405350 | -0.43 ~ -0.22 | 5.94 ~ 9.45 | 0.32 ~ 9.25 | 0.05 | G | 2 | 2,3,5 |
| | S1_272518892 | 1 | 272518892 | -0.45 ~ -0.06 | 3.60 ~ 9.83 | 1.39 ~ 8.43 | 0.1917 | C | 2,3 | 1,2,3,5 |
| | S3_1210743260 | 3 | 156529389 | -0.07 ~ -0.07 | 5.50 ~ 19.24 | 1.44 ~ 3.47 | 0.0709 | T | 1 | 2,3,5 |
| | S4_1765150915 | 4 | 240773849 | 0.13 ~ 0.16 | 7.74 ~ 11.3 | 0.80 ~ 6.16 | 0.4083 | C | 2 | 2,3,5 |
| | S5_917370584 | 5 | 81116338 | 0.02 ~ 0.04 | 3.05 ~ 10.05 | 0.10 ~ 1.44 | 0.1181 | C | 1 | 2,3,5 |
| | S6_384062469 | 6 | 69420162 | -0.21 ~ -0.11 | 3.31 ~ 9.99 | 0.19 ~ 5.61 | 0.1417 | G | 2 | 2,3,5 |
| | S6_477501590 | 6 | 162859283 | 0.02 ~ 0.12 | 3.51 ~ 13.81 | 1.21 ~ 8.42 | 0.3622 | A | 1 | 1,2,5 |
| | S7_664526101 | 7 | 5098266 | -0.18 ~ -0.13 | 4.64 ~ 10.10 | 0.36 ~ 5.54 | 0.0917 | C | 2,3 | 2,3,5 |
| S10_31884101 | 10 | 23912226 | -1.04 ~ -0.02 | 3.90 ~ 19.22 | 0.72 ~ 3.64 | 0.2756 | A | 1 | 2,3,5 | |
| Mg | S1_151492001 | 1 | 151492001 | -0.17 ~ -0.02 | 3.32 ~ 8.66 | 0.63 ~ 4.92 | 0.2 | C | 2,3 | 1,2,3,5 |
| | S1_228726702 | 1 | 228726702 | 0.04 ~ 0.11 | 10.45 ~ 13.93 | 3.38 ~ 7.38 | 0.3937 | G | 1 | 1,3,5 |
| | S1_279964480 | 1 | 279964480 | -0.09 ~ -0.07 | 4.75 ~ 9.49 | 3.42 ~ 5.57 | 0.0709 | A | 1 | 2,3,5 |
| | S3_1056360724 | 3 | 2146853 | 0.06 ~ 0.12 | 3.69 ~ 8.34 | 1.07 ~ 4.08 | 0.0667 | A | 2,3 | 2,3,5 |
| | S3_1073933077 | 3 | 19719206 | 0.02 ~ 0.06 | 4.21 ~ 13.39 | 0.65 ~ 8.54 | 0.4833 | T | 3 | 2,3,5 |
| | S4_1710162776 | 4 | 185785710 | -0.12 ~ -0.03 | 3.03 ~ 9.49 | 0.69 ~ 3.79 | 0.4 | A | 2 | 1,2,3,5 |
| | S5_1025357924 | 5 | 189103678 | -0.19 ~ -0.05 | 4.13 ~ 12.95 | 2.74 ~ 7.8 | 0.3333 | G | 2,3 | 1,2,5 |
| | S6_461051376 | 6 | 146409069 | -0.08 ~ -0.05 | 5.28 ~ 8.59 | 1.72 ~ 3.3 | 0.2583 | G | 2 | 2,3,5 |
| | S8_655855593 | 8 | 171805350 | 0.07 ~ 0.11 | 7.10 ~ 18.81 | 3.10 ~ 7.57 | 0.0709 | T | 1 | 2,3,5 |
| S9_309636884 | 9 | 152032705 | 0.03 ~ 0.04 | 4.72 ~ 8.14 | 1.33 ~ 3.29 | 0.2677 | C | 1 | 2,3,5 | |

(Continuação da Tabela 1.3)

| Característica | SNP | Chr | Posição (bp) | Efeito QTN ¹ | LOD score ² | PVE (%) ³ | MAF ⁴ | Gen | Amb ⁵ | Métodos ⁶ |
|----------------|---------------|-----|--------------|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------|-----|------------------|----------------------|
| Fe | S1_192137501 | 1 | 192137501 | 1.48 ~ 2.40 | 3.44 ~ 10.33 | 2.78 ~ 7.3 | 0.3521 | A | 3 | 2,4,5 |
| | S3_1115927315 | 3 | 61713444 | -5.03 ~ -4.49 | 4.7 ~ 4.90 | 3.40 ~ 4.27 | 0.0756 | A | 2 | 2,3,5 |
| | S5_838442523 | 5 | 2188277 | 3.06 ~ 3.15 | 3.06 ~ 4.74 | 1.70 ~ 1.80 | 0.0472 | T | 1 | 2,3,5 |
| | S7_820906184 | 7 | 161478349 | 3.39 ~ 6.17 | 3.78 ~ 8.13 | 5.18 ~ 7.49 | 0.3445 | G | 2 | 1,2,3 |
| | S8_501429977 | 8 | 17379734 | -3.93 ~ -2.69 | 9.73 ~ 10.98 | 4.77 ~ 10.13 | 0.2047 | C | 1 | 2,3,5 |
| | S9_200224791 | 9 | 42620612 | 2.31 ~ 8.60 | 4.36 ~ 5.73 | 2.24 ~ 7.77 | 0.1181 | A | 1 | 1,2,3,5 |
| | S10_148366593 | 10 | 140394718 | -6.98 ~ -1.82 | 3.1 ~ 6.19 | 1.98 ~ 7.27 | 0.443 | G | 2,3 | 1,2,4 |
| | S10_79162693 | 10 | 71190818 | 1.44 ~ 1.80 | 4.15 ~ 8.13 | 2.06 ~ 3.25 | 0.4565 | T | 1 | 2,4,5 |
| Zn | S3_1064152968 | 3 | 9939097 | 0.89 ~ 2.49 | 3.29 ~ 5.09 | 0.50 ~ 2.12 | 0.3622 | G | 1 | 1,2,5 |
| | S4_1725381242 | 4 | 201004176 | -2.96 ~ -2.05 | 3.58 ~ 7.29 | 2.64 ~ 5.51 | 0.2167 | C | 2 | 2,3,5 |
| | S6_418316209 | 6 | 103673902 | 1.80 ~ 2.47 | 8.97 ~ 15.56 | 2.02 ~ 8.24 | 0.3465 | T | 1 | 2,3,5 |
| | S6_458689822 | 6 | 144047515 | -4.82 ~ -3.35 | 5.45 ~ 9.01 | 3.16 ~ 6.55 | 0.0833 | G | 2 | 2,3,5 |
| | S7_665937558 | 7 | 6509723 | 1.01 ~ 4.32 | 3.41 ~ 12.17 | 2.05 ~ 10.70 | 0.4322 | T | 2,3 | 2,3,4,5 |
| | S7_792350857 | 7 | 132923022 | -2.52 ~ -1.67 | 4.84 ~ 10.28 | 1.27 ~ 3.47 | 0.1024 | G | 1 | 2,3,5 |
| | S8_553157915 | 8 | 69107672 | -5.29 ~ -2.25 | 4.32 ~ 7.97 | 2.34 ~ 6.42 | 0.0667 | A | 2,3 | 2,3,5 |
| | S9_203809059 | 9 | 46204880 | 1.99 ~ 3.92 | 4.15 ~ 6.40 | 1.42 ~ 5.48 | 0.1017 | C | 2 | 2,4,5 |
| | S10_136744250 | 10 | 128772375 | -8.70 ~ -1.87 | 3.13 ~ 4.33 | 1.16 ~ 6.28 | 0.0932 | A | 2 | 1,2,4 |
| | S10_22279751 | 10 | 14307876 | 0.97 ~ 1.61 | 3.87 ~ 4.42 | 1.46 ~ 4.00 | 0,2119 | G | 3 | 2,4,5 |

¹Efeito *Quantitative trait nucleotide*; ²LOD score, o limiar significativo para o *P-valor* transformado; ³PVE (%): *Phenotypic variation explained*; ⁴Minor allele frequency; ⁵Ambientes: 1-2018, 2-2019, 3-LSmeans; ⁶Métodos: 1-FASTmrEMMA, 2-FASTmrMLM, 3-ISIS EM-BLASSO, 4-mrMLM e 5-pLARmEB.

Os QTNs foram identificados em nove dos 10 cromossomos do milho, sendo que apenas no cromossomo 2 (Zm02) não foram detectados QTNs para os nutrientes avaliados. O maior número de QTNs foi constatado no cromossomo 1 (8 QTNs), seguido dos cromossomos 3, 6 e 10 com 5 QTNs cada. A variação fenotípica (PVE) explicada pelos diferentes QTNs foi desde valores muito baixos (próximos de zero) até 10,70%. Valores próximos de zero também foram verificados para os efeitos dos QTNs, em que, os efeitos variaram de -8,70 a 8,60. O grande número de QTNs identificados confirmam a natureza complexa do acúmulo e transporte de nutrientes nos grãos, sendo essas características governadas por inúmeros genes ou família de genes, cada um com pequeno efeito (HINDU *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2013; PRASANNA *et al.*, 2020).

Referente a todos os QTNs detectados, o método FASTmrMLM detectou o maior número de SNPs significativos, seguido por pLARmEB, ISI-EM-BLASSO, FASTmrEMMA e mrMLM. Por outro lado, considerando apenas os QTNs que apresentaram repetibilidade, o método FASTmrMLM se destacou por apresentar uma eficiência de 97%, ou seja, quase todos os SNPs detectados por este método apresentaram repetibilidade, seguido por pLARmEB (92%), ISIS EM-BLASSO (72%), FASTmrEMMA (33%) e mrMLM (18%). O ambiente de safra 2018 foi o que inicialmente apresentou o maior número de SNPs significativos, seguido por LSmeans e safra 2019. Por outro lado, considerando apenas SNPs promissores, o ambiente safra 2019 se destacou, seguido por safra 2018 e LSmeans.

Alelos Superiores

Os alelos favoráveis foram identificados para cada um dos QTNs que mostraram repetibilidade (ou seja, alelos associados ao aumento do conteúdo do mineral), seguido por uma análise para saber se o acúmulo desses alelos refletia no aumento do conteúdo de nutrientes das linhagens (Figura 1.4).

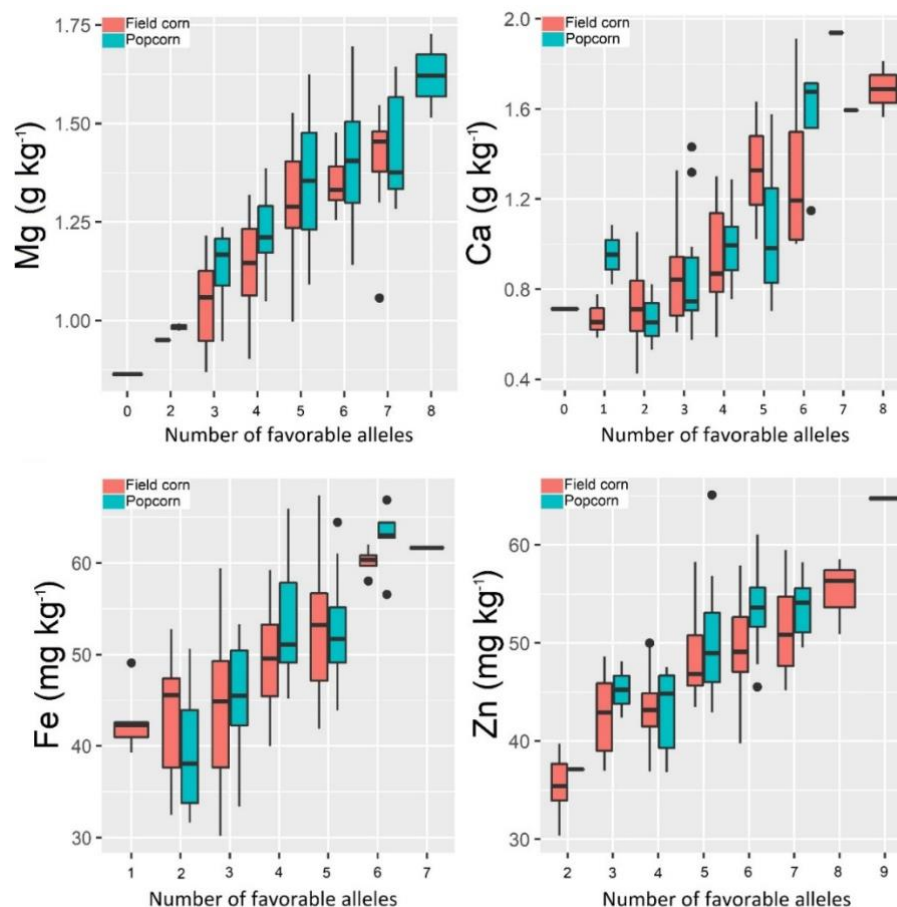


Figura 1.4 – Acúmulo de alelos favoráveis em relação às médias ajustadas (LSmeans) para teor de magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), e zinco (Zn) em linhagens de milho grão e pipoca de origem tropical, avaliadas na safra de 2018/2019 e segunda safra de 2019 em Londrina.

Foi possível observar o aumento gradual dos teores dos nutrientes avaliados (Mg, Ca, Fe e Zn) nos grãos do milho à medida que o número de alelos favoráveis aumentou nas linhagens, tanto para milho grão quanto para pipoca. Nesse contexto, esses QTNs podem ser utilizados em programas de melhoramento via seleção assistida visando o aumento da biodisponibilidade dos teores dos nutrientes nos grãos (HANG *et al.*, 2018). Delfini e colaboradores (2021), avaliando um painel de acessos de feijão brasileiro para o conteúdo mineral no grão, também verificaram o incremento dos teores dos nutrientes com o incremento dos alelos favoráveis, exceto para Fe e cobre (Cu).

Apesar dos QTNs identificados no presente estudo apresentarem pequeno efeito, esses poderiam ser utilizados para a seleção genômica (HE *et al.*, 2019a). Em modelos de seleção genômica, ao invés de usar um painel completo de SNPs aleatórios, o uso de marcadores associados à característica de interesse pode diminuir o número de marcadores e, conseqüentemente, os custos de genotipagem

de grandes populações. Além disso, o uso de marcadores associados a características específicas em modelos de seleção genômica pode melhorar a precisão da seleção (HE *et al.*, 2019b; ALI *et al.*, 2020).

Genes candidatos

Pela análise de LD, determinou-se a região genômica em torno do QTN para busca dos genes localizados nessas regiões. A partir da anotação GO, os genes foram agrupados em três categorias funcionais relacionadas a componentes celulares, processos biológicos e função molecular. Na categoria de componente celular, as principais funções identificadas foram relacionadas à membrana e seus componentes integrais, enquanto na categoria de processos biológicos, as funções de processos de metabolismo celular, desenvolvimento multicelular do organismo, transcrição e *DNA-templated*, processos metabólicos primários e resposta ao estresse. Na classe função molecular, as principais funções dos genes encontrados foram: atividade catalítica, atividade transferase, *ATP binding*, *nucleotide binding*, *nucleic acid binding* e *DNA binding*. Foram identificados para todos os minerais, genes candidatos com função relacionada ao nutriente e ao QTN que foi associado (Tabela 1.4). Para Ca, foram identificados oito genes, enquanto para magnésio, ferro e zinco, foram encontrados sete, seis e seis genes, respectivamente.

Tabela 1.4 – Relação de potenciais genes candidatos localizados nas regiões genômicas subjacentes aos QTNs associados à variação dos teores de Ca, Mg, Fe e Zn em milho grão e pipoca de origem tropical

| Característica | QTN | Gene Candidato | Anotação Funcional |
|-----------------------|---------------|--|--|
| Ca | S1_268405350 | GRMZM2G127521 | <i>Plasma membrane</i> |
| | S1_272518892 | GRMZM2G089118 | <i>Signaling receptor binding</i> |
| | S4_1765150915 | GRMZM2G010372 | <i>Cation transport</i> |
| | | GRMZM2G010372 | <i>Ion transmembrane transport</i> |
| | | GRMZM2G010280 | <i>Nitrate transmembrane transporter activity</i> |
| | | GRMZM2G010280 | <i>Nitrate transport</i> |
| | S5_917370584 | GRMZM2G010280 | <i>Transmembrane transport</i> |
| | | GRMZM2G010372 | <i>Transmembrane transporter activity</i> |
| | | GRMZM2G104425 | <i>ATP binding</i> |
| | S6_384062469 | GRMZM2G104425 | <i>Integral component of membrane</i> |
| | | GRMZM2G104425 | <i>Signaling</i> |
| | S6_477501590 | GRMZM2G177726 | <i>ATP binding</i> |
| | S7_664526101 | GRMZM5G872417 | <i>Transferase activity</i> |
| | | GRMZM2G011858 | <i>Copper ion binding</i> |
| | | GRMZM2G011858 | <i>Electron transporter, transferring electrons within the noncyclic electron transport pathway of photosynthesis activity</i> |
| GRMZM2G011858 | | <i>Ferredoxin-NADP+ reductase activity</i> | |
| GRMZM2G011858 | | <i>NADP binding</i> | |
| Mg | S1_228726702 | GRMZM2G011858 | <i>Photosynthetic electron transport in photosystem I</i> |
| | S1_228726702 | GRMZM2G093951 | <i>MAPK cascade</i> |
| | S3_1056360724 | GRMZM2G169951 | <i>Anion transport</i> |
| | | GRMZM2G169951 | <i>Transmembrane transport</i> |
| | S8_655855593 | GRMZM2G169951 | <i>Transmembrane transporter activity</i> |
| | | GRMZM2G066885 | <i>Ferric-chelate reductase activity</i> |
| | | GRMZM2G066851 | <i>Zinc ion binding</i> |
| | S9_309636884 | GRMZM2G434363 | <i>ATP binding</i> |
| | | GRMZM2G434363 | <i>Iron ion transport</i> |
| | | GRMZM2G434363 | <i>MAPK cascade</i> |
| | | GRMZM2G434363 | <i>Nitrate transport</i> |
| | S9_309636884 | GRMZM2G009808 | <i>ATP binding</i> |
| | | GRMZM2G009770 | <i>ATP binding</i> |
| | | GRMZM2G009808 | <i>Cellular iron ion homeostasis</i> |
| | | GRMZM2G009808 | <i>Copper ion binding</i> |

(Continuação da Tabela 1.4)

| Característica | QTN | Gene Candidato | Anotação Funcional |
|----------------|---------------|--|---|
| Fe | S1_192137501 | AC197246.3_FG001 | <i>Pollen tube growth</i> |
| | | AC197246.3_FG001 | <i>Pollen tube tip</i> |
| | | AC197246.3_FG001 | <i>Regulation of pollen tube growth</i> |
| | | AC197246.3_FG001 | <i>Response to cadmium ion</i> |
| | S10_148366593 | GRMZM2G129169 | <i>Transport</i> |
| | | GRMZM2G129147 | <i>Transport</i> |
| | S10_79162693 | GRMZM2G008209 | <i>Coenzyme A biosynthetic process</i> |
| | S5_838442523 | GRMZM2G085320 | <i>Oxidation-reduction process</i> |
| GRMZM2G085320 | | <i>Oxidoreductase activity</i> | |
| GRMZM2G085460 | | <i>Transmembrane transport</i> | |
| Zn | S10_22279751 | GRMZM2G106622 | <i>Embryo development ending in seed dormancy</i> |
| | | GRMZM2G106622 | <i>Regulation of seed germination</i> |
| | | GRMZM2G106622 | <i>Seed germination</i> |
| | S3_1064152968 | GRMZM2G100349 | <i>Metal ion binding</i> |
| | S4_1725381242 | GRMZM2G080519 | <i>Transport</i> |
| | S6_418316209 | GRMZM2G122172 | <i>aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity</i> |
| | | GRMZM2G080519 | <i>Transporter activity</i> |
| | S7_665937558 | GRMZM2G087575 | <i>Intracellular transport</i> |
| | | GRMZM2G087585 | <i>Phosphorylation</i> |
| | S9_203809059 | GRMZM2G087585 | <i>Reproductive process</i> |
| | | GRMZM2G151414 | <i>Antiporter activity</i> |
| | | GRMZM2G151414 | <i>Coenzyme A biosynthetic process</i> |
| | GRMZM2G151414 | <i>Proton transmembrane transporter activity</i> | |

Os autores Mallikarjuna *et al.* (2020), ao realizar uma análise de transcriptoma para deficiência de Fe e Zn em milho, também identificaram genes com anotação funcional de *cation transmembrane transporter* (GRMZM2G036908; GRMZM5G862882), *ferric-chelate reductase* (GRMZM2G157263) e *proton transporter* (GRMZM2G104418). No entanto, os genes identificados pelos autores são diferentes dos identificados no presente trabalho. Hindu *et al.* (2018) avaliaram 923 linhagens de milho representando o germoplasma do CIMMYT para regiões genômicas influenciando as concentrações de Zn e Fe em grãos de milho e identificaram genes envolvidos na absorção, transporte e localização de Fe e Zn nas plantas.

CONCLUSÕES

Os acessos de milho grão e pipoca empregados neste estudo de associação genômica apresentaram variabilidade ampla para os nutrientes avaliados. Os QTNs identificados e o acúmulo de alelos superiores em um mesmo acesso levou a um aumento gradual no teor de nutrientes no grão, indicando que essas marcas genéticas podem ser utilizadas em futuros programas de melhoramento visando a biofortificação do milho. Os *loci* identificados no presente trabalho serão importantes para o melhoramento de milho grão e pipoca de origem tropical no Brasil para as características nutricionais estudadas.

4 ARTIGO B: Análise dialéctica em milho tropical para rendimento de grãos e teores de ferro e zinco na segunda safra

Luiz Júnior Perini¹, Douglas Mariani Zeffa², Nicholas Vieira de Souza¹, Antoni Wallace Marcos¹, Romário Fortunato de Lima¹, Liliam Silvia Candido³, Filipe Augusto Bengosi Bertagna², Carlos Alberto Scapim², Leandro Simões Azeredo Gonçalves^{1*}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil

²Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil

³Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

*Autor de Correspondência:

E-mail: leandrosaq@uel.br

RESUMO. Um terço da população mundial é afetado por deficiência de ferro (Fe) e zinco (Zn), principalmente em países subdesenvolvidos, onde predomina uma dieta à base de cereais. Nesse sentido, a biofortificação é considerada uma das principais estratégias para o fornecimento de micronutrientes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos gênicos e a capacidade de combinação de um conjunto de linhagens de milho tropical para as características rendimento de grãos (RG) e teores de Fe e Zn nos grãos. Foi avaliado um dialelo 10 x 10 de linhagens tropicais provenientes do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Esses híbridos foram avaliados em dois locais na segunda safra, sendo que foram avaliados em Dourados (2018) e Londrina (2018 e 2019) para rendimento de grãos, enquanto para Fe e Zn, as avaliações foram feitas em Dourados (2018) e Londrina (2019). Com base na análise de variância, foi observado efeito significativo em todas as características para as fontes de variação genótipos (G), ambientes (A) e interação G x A, indicando uma ampla variabilidade dos genótipos e ambientes. Pelo desdobramento da análise de variância, efeitos significativos foram encontrados para capacidade geral e específica de combinação, mostrando que efeitos aditivos e não aditivos estão envolvidos no controle genético dessas características, com predomínio dos efeitos não aditivos. Objetivando a seleção simultânea das características RG, Fe e Zn, o híbrido resultante do cruzamento das linhagens L4 e L6 se mostrou o mais promissor, mostrando valores positivos de $\hat{\sigma}_{ij}$ em todos os ambientes avaliados.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; melhoramento de plantas; micronutrientes; capacidade geral e específica de combinação; biofortificação.

ABSTRACT. One-third of the world population is affected by iron (Fe) and Zinc (Zn) deficiency, mainly in underdeveloped countries where a cereals diet is predominant. In this context, biofortification is considered one of the main strategies to supply micronutrients. The present study aimed at evaluating the genetic effects and combining ability in a set of tropical maize inbred lines for grain yield (GY) and grain Fe and Zn contents. A diallel 10 x 10 tropical inbred lines from Maringá State University (UEM) Breeding Program was evaluated. These hybrids were assessed in two locations in the second crop season in Dourados (2018) and Londrina (2018 and 2019) for grain yield, while Fe and Zn were evaluated in Dourados (2018) and Londrina (2019). According to the analysis of variance, all traits showed significant difference for the sources of variation genotypes (G), environments (E), and G x E interaction, indicating wide variability for genotypes and environments. Unfolding the analysis of variance, significant effects were observed for general and specific combining ability, indicating that additive effects and non-additive are involved in the genetic control of these traits, with a predominance of non-additive effects. Aiming at simultaneous selection of GY, Fe, and Zn, the hybrid derived from the crossing L4 x L6 was the most promising, showing positive values of $\hat{\sigma}_{ij}$ in all environments evaluated.

Keywords: *Zea mays* L.; plant breeding; micronutrients; general and specific combining ability; biofortification.

INTRODUÇÃO

Globalmente, um terço da população é afetado pela deficiência de ferro (Fe) e zinco (Zn), principalmente em países subdesenvolvidos, onde predominam as dietas à base de cereais (BAILEY *et al.*, 2015). Esses micronutrientes são essenciais para todos os organismos vivos, atuando como cofatores de várias enzimas que estão envolvidas em inúmeros processos metabólicos. A ingestão inadequada de Fe causa a incapacidade de manter a temperatura corporal, aumenta a mortalidade de gestantes e recém nascidos, diminui a trabalhabilidade e a aptidão física e aumenta a suscetibilidade a doenças infecciosas (BOCCIO; IYENGAR, 2003). Por sua vez, a deficiência de Zn resulta em crescimento retardado, anorexia e hipogeusia em crianças, em problemas de gravidez e várias doenças crônicas em adultos (BROWN *et al.*, 2002; PRASAD, 2001).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para enriquecer a dieta humana com micronutrientes, incluindo a suplementação (por exemplo, na forma de pílulas), fortificação industrial e a biofortificação (DELFINI *et al.*, 2020). Dentre essas, a biofortificação é considerada a principal abordagem para o fornecimento de micronutrientes essenciais em populações que têm acesso limitado à diversificação da dieta (BOUIS; SALTZMAN, 2017). A biofortificação consiste em aumentar a concentração de vitaminas e minerais em uma cultura por meio do melhoramento genético ou práticas agrônômicas, sendo a biofortificação genética a mais economicamente viável em longo prazo (DE VALENÇA *et al.*, 2017).

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo, exercendo um papel significativo no fornecimento total de calorias em diversos países de baixa e média renda, como países da Ásia, África e América Latina e da região do Caribe (FLINT-GARCIA, 2017; PALACIOS-ROJAS *et al.*, 2019). Nesse contexto, a biofortificação do milho pode melhorar a saúde e o bem-estar de muitas populações desfavorecidas em todo o mundo (HINDU *et al.*, 2018). Progressos significativos têm sido verificados no desenvolvimento, teste e distribuição de milho biofortificado, especialmente milho com alta qualidade de proteína (QPM) (TANDZI *et al.*, 2010) e milho enriquecido com pró-vitamina A (PIXLEY, 2013). Para os micronutrientes Fe e Zn, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de implementar a biofortificação associada ao rendimento de grãos (GUPTA *et al.*, 2015; LONG *et al.*,

2004; LUNG'AHU *et al.*, 2011; MALLIKARJUNA *et al.*, 2015; MESSIAS *et al.*, 2015; MAQBOOL; BESHIR, 2018).

O controle genético para os teores de Fe e Zn nos grãos é complexo, sendo regulado por muitos genes envolvidos em processos de mobilização, captação, translocação e acumulação (HINDU *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2013; MALLIKARJUNA *et al.*, 2020). Em relação a ação gênica para o acúmulo desses micronutrientes, diversos estudos têm indicado que os efeitos aditivos são mais importantes que os não aditivos (ARNOLD; BAUMAN, 1976; BRKIC *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 2004). A determinação desses efeitos é de suma importância para direcionar os programas de melhoramento visando o aumento dos teores de Fe e Zn nos grãos associados ao rendimento de grãos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos gênicos e a capacidade de combinação de um conjunto de linhagens de milho tropical do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá (UEM) para as características rendimento de grãos e teores de Fe e Zn nos grãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Dez linhagens de milho tropical do Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Estadual de Maringá (UEM) foram cruzadas em um dialelo completo, sem recíprocos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Origem e características dos genitores de milho tropical para produção de grãos utilizados nos cruzamentos dialélicos

| Linhagens | Origem | Número | Empresa | GM | Tipo |
|----------------------|---------------|---------------|----------------|-----------|-------------|
| 131-CD303-90H4.3 | CD303 | 1 | COODETEC | Não GM | Milho grão |
| 4-AG8080-7H3.1 | AG8080 | 2 | Monsanto | Não GM | Milho grão |
| 5-T5-AVANT-14H5.5 | Avant | 3 | Syngenta | Não GM | Milho grão |
| FORT 84.86.1-239 | Fort | 4 | Syngenta | Não GM | Milho grão |
| 140-POP101-195.2 | POP101 | 5 | - | Não GM | Milho grão |
| 146-A2560-63H23.2 | A2560 | 6 | Bayer | Não GM | Milho grão |
| 188-DKB350-77-H30.1 | DKB350 | 7 | Monsanto | Não GM | Milho grão |
| 122-30F33-70H23.1 | P30F33 | 8 | Pioneer | Não GM | Milho grão |
| AG 9090 58.H21.2-158 | AG9090 | 9 | Monsanto | Não GM | Milho grão |
| 30-DKB747-43H17.4 | DKB 747 | 10 | Monsanto | Não GM | Milho grão |

COODETEC: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola; GM: Geneticamente modificado.

Condição experimental e características avaliadas

Os 45 híbridos resultantes do dialelo foram avaliados em duas localidades e três ambientes. Ambiente 1: segunda safra de 2018 no município de Dourados – MS; Ambiente 2: segunda safra de 2018 no município de Londrina – PR; Ambiente 3: segunda safra de 2019 no município de Londrina – PR. A seguir é apresentada a descrição edafoclimática para cada localidade: i) Dourados – MS: Fazenda Experimental de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) localizada na Região Centro-Oeste do Estado (coordenadas geográficas: 22°13'15' S e 54°48'21" W), com altitude média de 430 m. O solo é caracterizado como Latossolo vermelho distroférico (LVdf) (EMBRAPA, 2006), o clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cwa (clima mesotérmico úmido, verões quentes e invernos secos). ii) Londrina – PR: Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL) localizada na região Norte do Estado (coordenadas geográficas: 23°20'23"S, 51°12'32"O), com altitude média de 532 m. O solo da área experimental da UEL é classificado como Latossolo Vermelho eutroférico. Segundo Köppen, o clima é classificado como subtropical úmido mesotérmico Cfa (verões quentes e ocorrência de chuva nos meses mais secos).

Os dados de precipitação, temperatura máxima e mínima foram obtidos do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IDR-PR para Londrina, na

segunda safra de 2018 e 2019 (Figura 2.1) e da EMBRAPA Agropécuaria Oeste para Dourados. As análises químicas dos solos (0-20 cm) foram realizadas anteriormente à instalação dos experimentos, apresentado os seguintes resultados para Londrina 2018, Londrina 2019 e Dourados 2018, respectivamente: pH_{H_2O} = 5,7, 4,9 e 5,4; P = 5,48, 7,03 e 9,4 $mg\ dm^{-3}$; K^+ = 0,3, 0,86 e 2,43 $mg\ dm^{-3}$; Ca^{+2} = 7,63, 5,9 e 5,21 $cmol_c\ dm^{-3}$; Mg^{+2} = 2,5, 1,5 e 2,73 $cmol_c\ dm^{-3}$; CTC = 15,93, 8,37 e 10,38 $cmol_c\ dm^{-3}$. Com base nos resultados da análise química, foi elaborada a taxa de adubação para a semeadura. Adubação de semeadura para o ambiente de Dourados foi de 300 $Kg\ ha^{-1}$ do formulado 08-28-16 (24 $Kg\ ha^{-1}$ de N, 84 $Kg\ ha^{-1}$ de P_2O_5 e 48 $Kg\ ha^{-1}$ de K_2O). Para a localidade de Londrina, para a segunda safra de 2018 e 2019, aplicou-se 300 $Kg\ ha^{-1}$ no sulco de semeadura do formulado 04-30-10. Além da adubação nitrogenada de semeadura, realizou-se duas aduções de N em cobertura (nas fases V3 e V6), totalizando 240 $Kg\ de\ N\ ha^{-1}$ disponibilizado para a cultura.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos completos ao acaso, com três repetições e 45 tratamentos. As parcelas foram constituídas por 1 linha de 5 m de comprimento, com espaçamento de 0,45 m entre linhas e densidade de 3,2 sementes por metro linear. Os experimentos foram implantados manualmente nas duas safras, de acordo com zoneamento agroclimático do MAPA (Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento) para a cultura do milho em segunda safra. As datas de semeadura foram 15/03/2018 em Dourados e 12/03/2018 e 02/03/2019 em Londrina.

Foram semeadas duas sementes por cova com desbaste após a emergência, garantindo uma população final de 71.111 $pl\ ha^{-1}$. A área útil das parcelas foi definida como 4 m centrais das linhas, retirando 0,5 m de cada extremidade. Durante o ciclo da cultura, as plantas foram irrigadas e adubação e práticas de manejo foram realizadas de acordo com as recomendações para a cultura. O manejo de plantas daninhas, pragas e doenças foi feito com base nas recomendações técnicas para o milho.

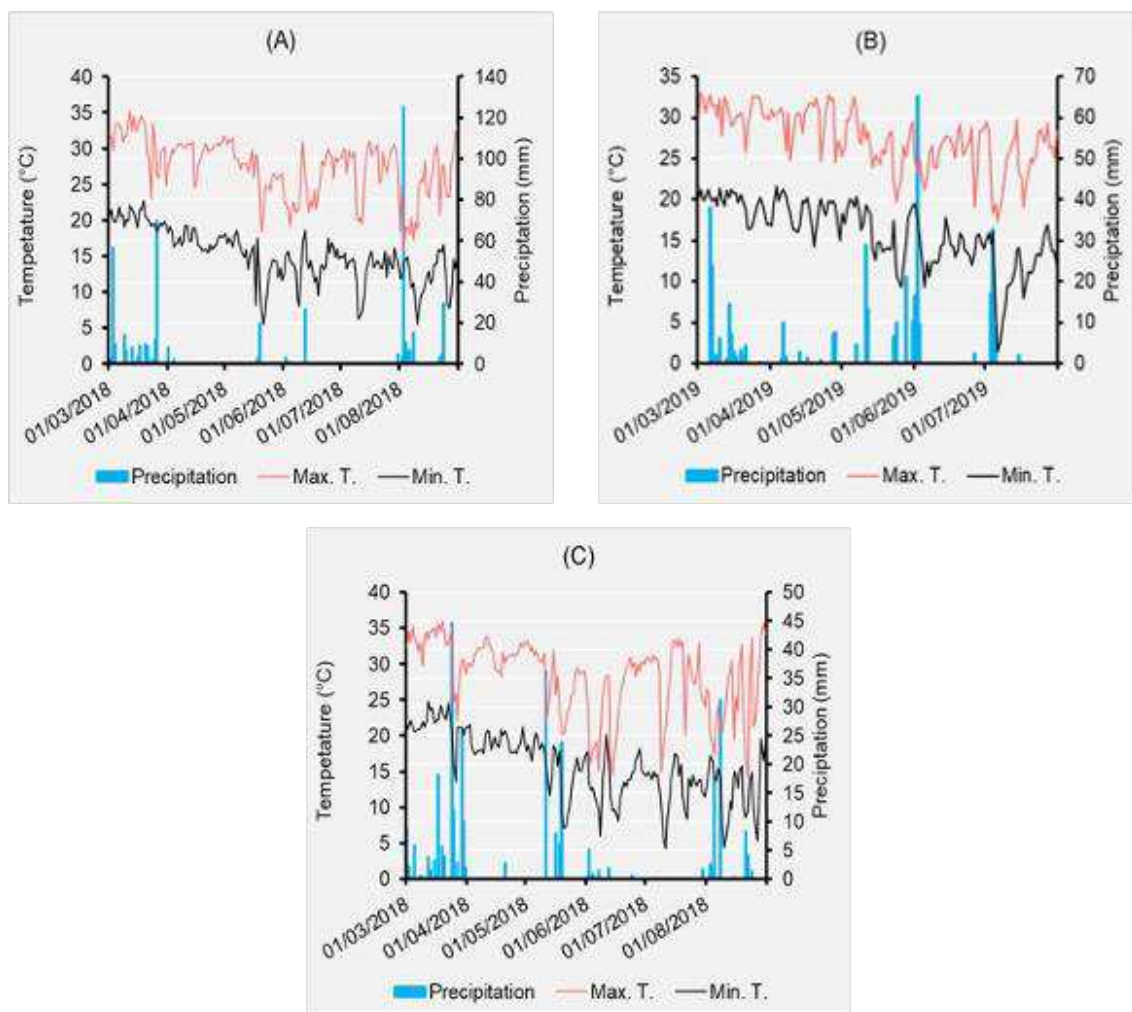


Figura 2.1 – Dados diários da precipitação e temperatura máxima e mínima durante o período experimental em Londrina, 2018 (A), 2019 (B) e Dourados, 2018 (C).

Para determinação da produtividade de grãos, as espigas localizadas nos 4 m centrais da parcela foram colhidas. A produtividade de grãos foi expressa em Kg ha^{-1} , após correção do teor de umidade para 13%. Para determinação do teor de ferro e zinco nos grão de milho cultivados em Dourados (2018) e Londrina (2019), duas espigas foram coletadas de cada parcela e acondicionadas em sacos de papel. Estes foram levados para estufa com ventilação forçada a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Em seguida, as amostras foram moídas e homogeneizadas. A quantificação do teor de Fe e Zn foi baseada em Silva (2009), por meio de fotometria de chama e espectrofotometria de absorção atômica. O teor de Fe e Zn foram expressos em mg Kg^{-1} de MS (matéria seca).

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância conjunta ($p < 0,05$), conforme o modelo a seguir:

$Y_{ijk} = \mu + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, em que: Y_{ijk} : representa o i -ésimo genótipo no j -ésimo ambiente no k -ésimo bloco; μ : é a média geral; G_i : é o efeito do i -ésimo genótipo; B/A_{jk} : corresponde ao efeito de bloco dentro de ambiente, j -ésimo no k -ésimo bloco; A_j : é o efeito do j -ésimo ambiente; GA_{ij} : é o efeito da interação do i -ésimo genótipo com o j -ésimo ambiente; ε_{ijk} : é o efeito do erro experimental.

A homogeneidade das variâncias foi verificada por meio da razão entre o maior e o menor quadrado médio de resíduo (QMR), considerando como sete o valor limite para a validação da análise, conforme descrito em Cruz *et al.* (2004).

Em seguida, procedeu-se as estimativas da capacidade geral (CGC) (Tabela 2.2) e específica de combinação (CEC) por meio do método IV de análise dialéctica proposto por Griffing (1956). A seguir é apresentado o modelo matemático empregado na análise dialéctica:

$Y_{ijk} = \mu + g_i + g_j + a_k + s_{ij} + (ag)_{ik} + (ag)_{jk} + (as)_{ijk} + \bar{\varepsilon}_{ijk}$, em que: Y_{ijk} : é média geral observada entre a combinação híbrida da i -ésima e a j -ésima linhagem dentro do k -ésimo ambiente; μ : é a média geral; a : é o efeito do ambiente; g_i : é o efeito da capacidade geral de combinação associada a i -ésima linhagem; g_j : é o efeito da capacidade geral de combinação associada a j -ésima linhagem; s_{ij} : é o efeito da capacidade específica de combinação entre a linhagem i e j ; $(ag)_{ik}$ e $(ag)_{jk}$ é efeito da capacidade geral de combinação das linhagens com o ambiente; $(as)_{ijk}$ é o efeito da capacidade específica de combinação entre as linhagens i e j com o ambiente; e $\bar{\varepsilon}_{ijk}$: é o erro experimental médio. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Genes (CRUZ, 2016).

Tabela 2.2 – Estimativas do quadrado médio de genótipos, capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e componentes quadráticos da CGC e CEC para rendimento de grãos (GY), teor de ferro (Fe) e teor de zinco (Zn) avaliados em milho de origem tropical destinado a produção de grãos, no ambiente de safrinha em Londrina e Dourados

| Fonte de variação | GL | QM ^{1/} | GL | QM | |
|-------------------------------------|------|------------------------|-----|-------------|----------|
| | | GY kg ha ⁻¹ | | Fe | Zn |
| Bloco/Ambiente | 6 | 4970612,73 | 4 | 16,96 | 28,61 |
| Genótipos | (44) | 4397894,93** | 44 | 359,27** | 102,15** |
| CGC | 9 | 6371640,77** | 9 | 437,41** | 85,36** |
| CEC | 35 | 3890360,28** | 35 | 339,17** | 106,47** |
| Ambientes | 2 | 24342441,35** | 1 | 137746,59** | 234,53** |
| Genótipos × Ambientes | 88 | 5022047,28** | 44 | 404,73** | 61,02** |
| CGC × Ambientes | 18 | 9710210,89** | 9 | 759,59** | 84,63** |
| CEC × Ambientes | 70 | 3816519,50** | 35 | 313,48** | 54,95* |
| Resíduo | 264 | 376690,56 | 176 | 51,25 | 35,81 |
| Média | | 4774,85 | | 48,41 | 32,15 |
| CV (%) | | 12,85 | | 14,78 | 18,61 |
| Componentes quadráticos | | | | | |
| $\hat{\Phi}_{ge}$ | | 72799,58 | | 6,97 | 0,28 |
| $\hat{\Phi}_{se}$ | | 306698,80 | | 39,44 | 5,80 |
| $\hat{\Phi}_{ge} / \hat{\Phi}_{se}$ | | 0,23 | | 0,17 | 0,048 |

^{1/} * e ^{ns} = significativo e não significativo ao nível de 5* de probabilidade de acordo com o teste F; GL= graus de liberdade; CV (%) = média do coeficiente de variação ambiental. ^{2/} GY= Kg ha⁻¹; Fe e Zn= mg Kg⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância, foi observado efeito significativo em todas as características para as fontes de variação genótipos, ambientes e interação genótipos x ambientes, indicando uma ampla variabilidade dos genótipos e dos ambientes avaliados (Tabela 2.1). O coeficiente de variação foi de 12,85%, 14,78% e 18,61% para rendimento de grãos, teores de Fe e Zn, respectivamente, indicando uma boa qualidade experimental.

Os maiores valores de rendimento de grãos foram verificados para o ambiente Londrina 2019 com a média de 5228,42 Kg ha⁻¹, seguido pelos ambientes Londrina 2018 e Dourados 2018 com 4448,49 e 4386,67 Kg ha⁻¹, respectivamente. A testemunha comercial (Pionner 30F53 VYH) obteve as seguintes produtividades 4552,54, 4390,93 e 8113,10 Kg ha⁻¹ para os ambientes de Londrina – 2018, Londrina – 2019 e Dourados – 2018, respectivamente. Segundo os dados da CONAB (2020), a produtividade média nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul para segunda safra foram de 3685 e 4270 Kg ha⁻¹ para 2018, respectivamente, e 5040 e 6040 Kg

ha⁻¹ para 2019, respectivamente. Aguiar *et al.* (2004), avaliando diferentes híbridos experimentais na segunda safra em diferentes estados brasileiros (MT, MS, MG e PR), verificaram valores de produtividade variando de 3675 a 6742 Kg ha⁻¹.

Para os teores de Fe e Zn, foram observados valores médios de 25,82 e 31,22 mg Kg⁻¹ MS, respectivamente, para o ambiente de Dourados 2018, enquanto para o ambiente de Londrina 2019 foram de 71,00 e 33,08 mg Kg⁻¹ MS, respectivamente. Queiroz *et al.* (2011) investigaram 22 linhagens de milho no Brasil e verificaram valores entre 12,2 e 36,6 mg Kg⁻¹ para Fe e 17,5 e 42,00 mg Kg⁻¹ para Zn. Por sua vez, Maziya-Dixon *et al.* (2000) mediram os teores de Fe e Zn em 120 linhagens na Nigéria e encontraram números variando entre 13,6 e 159 mg Kg⁻¹ para ferro e entre 11,6 e 95,6 mg Kg⁻¹ para zinco.

Os teores de Fe e Zn apresentaram uma correlação de 0,39 ($p < 0,01$). Diversos pesquisadores têm reportado uma correlação significativa ($r = 0,37$ a $0,52$) entre Fe e Zn em grãos de milho em diferentes ambientes (BAXTER *et al.*, 2014; LUNG'AHU *et al.*, 2011; MALLIKARJUNA *et al.*, 2015; QIN *et al.*, 2012; THAKUR *et al.*, 2015). Essas correlações podem ser influenciadas por diversos fatores ambientais e genéticos e podem ser atribuídas à ligação ou efeitos pleiotrópicos dos genes. Os fatores genéticos incluem vários genes que codificam proteínas transportadoras de metal no milho ou a presença de transportadores comuns para alguns minerais (AKTAR *et al.*, 2018; HINDU *et al.*, 2018; QIN *et al.*, 2012). No presente estudo, não foi observada correlação do rendimento de grãos com Fe e Zn. Bänziger e Long (2000) observaram uma ampla variação do coeficiente de correlação entre rendimento de grãos com Fe ($r = -0,60$ a $0,16$) e Zn ($r = -0,44$ a $-0,03$) em 12 ambientes e concluíram que esta relação é amplamente afetada pelas condições ambientais.

Pelo desdobramento da soma de quadrado de genótipos para capacidade geral e específica de combinação, bem como as interações com os ambientes, foram observados efeitos significativos para todas as características, indicando que os efeitos aditivos e não aditivos estão envolvidos no controle genético das características RG, e Fe e Zn nos grãos. No entanto, pela relação da CGC (ϕ_g)/CEC (ϕ_s), foram observados valores inferiores a 1, indicando a predominância dos efeitos não aditivos em relação aos efeitos aditivos. Para teores de Fe e Zn nos grãos a ocorrência de ambos os efeitos (aditivos e não aditivos) têm sido observada em diferentes trabalhos, no entanto, com predomínio dos efeitos aditivos (ARNOLD; BAUMAN, 1976; BRKIC *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 2004). No presente trabalho, o

predomínio dos efeitos não aditivos indica a possibilidade da exploração da heterose para essas características.

Pela estimativa de \hat{g}_i (CGC) para RG, as linhagens L6 e L7 apresentaram os maiores valores positivos para o ambiente Londrina - 2018 (948,7 e 978,9 Kg ha⁻¹, respectivamente) e Londrina – 2019 (608,5 e 505,8 Kg ha⁻¹, respectivamente), enquanto para o ambiente Dourados – 2018, o maior valor foi observado para linhagem L4 (1253,9 Kg ha⁻¹), indicando que essas linhagens possuem uma maior frequência de alelos favoráveis para RG (Figura 2.2). Para os teores de Fe e Zn, os maiores valores positivos de \hat{g}_i foram observados para as linhagens L2 (6,4 e 2,1 mg Kg⁻¹, respectivamente) e L9 (8,3 e 2,2 mg Kg⁻¹, respectivamente) em Londrina – 2019, enquanto para Dourados foi a linhagem L7 (5,6 e 3,1 mg Kg⁻¹, respectivamente).

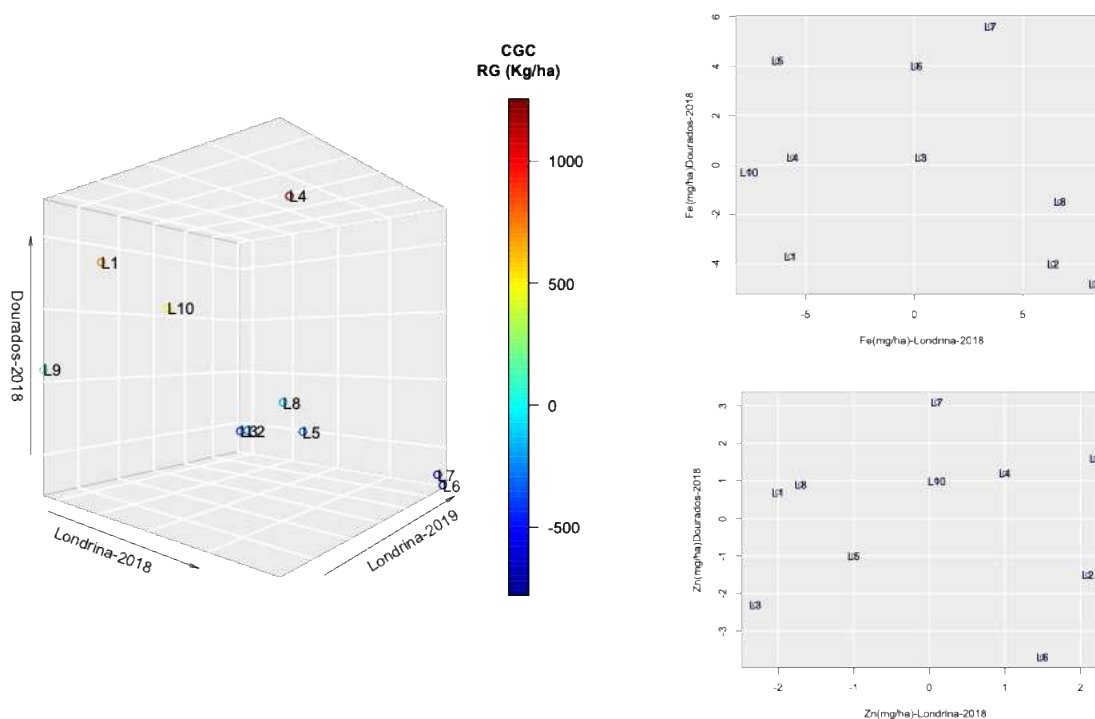


Figura 2.2 – Estimativas da capacidade geral de combinação para rendimento de grãos (RG), e teor de ferro (Fe) e zinco (Zn) no grão em dez linhagens de milho tropical destinadas à produção de grãos em três ambientes.

Para estimativa de \hat{s}_{ij} (CEC) (Tabela 2.3), as combinações híbridas L4 x L6 e L4 x L7 apresentaram valores positivos para RG para todos os ambientes, indicando híbridos promissores. Esses híbridos obtiveram uma produtividade de 5403 e 5200 Kg ha⁻¹, respectivamente, no ambiente Dourados – 2018, 5586,07 e 6651,18 Kg ha⁻¹, respectivamente, no ambiente Londrina – 2018 e 6174,54 e 6257,23 Kg ha⁻¹, respectivamente, no ambiente Londrina – 2019. Para os teores de Fe e Zn, as

combinações que se destacaram foram L2 x L9, L4 x L6 e L6 x L7 para ambiente de Londrina – 2019, enquanto para o ambiente de Dourados – 2018, foi L4 x L6. Esses híbridos obtiveram valores de Fe de 19,81, 30,55 e 35,13 mg Kg⁻¹, respectivamente, para o ambiente de Dourados – 2018 e 75,5, 74,08 e 68,31 mg Kg⁻¹, respectivamente, para o ambiente de Londrina – 2019. Para o teor de Zn, os valores foram de 28,11, 29,30 e 31,23 mg Kg⁻¹, respectivamente, em Dourados – 2018 e 33,03, 30,98 e 24,1 mg Kg⁻¹, respectivamente, em Londrina – 2019. Objetivando a seleção simultânea das características RG, e Fe e Zn no grão, o híbrido L4 x L6 se mostrou o mais promissor, mostrando valores positivos de $\hat{\sigma}_j$ em todos os ambientes avaliados.

Tabela 2.3 – Estimativas da capacidade específica de combinação para rendimento de grãos (RG) e teor de ferro (Fe) e zinco (Zn) em 45 híbridos de milho tropical destinadas à produção de grãos, avaliadas na segunda safra em 3 ambientes (A1: Londrina, 2018; A2: Londrina, 2019; A:3 Dourados, 2018)

| Híbridos | Rendimento de grãos (Kg ha ⁻¹) | | | Fe (mg Kg ⁻¹) | | Zn (mg Kg ⁻¹) | |
|----------|--|---------|---------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
| | A1 | A2 | A3 | A1 | A3 | A1 | A3 |
| 1x2 | -1419,5 | -645,4 | -923,6 | 6,8 | 5,8 | -2,1 | 8,5 |
| 1x3 | -124,4 | -61,2 | -262,0 | 7,3 | -5,4 | -0,5 | 1,1 |
| 1x4 | -323,5 | 43,3 | 824,3 | 4,6 | -0,8 | -0,3 | -1,1 |
| 1x5 | 1860,1 | 486,7 | -807,5 | -7,2 | 7,2 | 4,4 | 3,2 |
| 1x6 | -1028,8 | -149,1 | 1076,7 | -1,9 | -10,4 | -4,5 | -2,4 |
| 1x7 | -848,0 | 167,7 | -9,3 | 12,3 | 20,9 | 4,1 | -4,0 |
| 1x8 | 639,8 | -40,8 | 4104,8 | -6,4 | -17,4 | 3,6 | -5,5 |
| 1x9 | 701,6 | -317,1 | -127,7 | 0,4 | -1,3 | 1,3 | 4,0 |
| 1x10 | 542,6 | 515,8 | -3875,6 | -15,9 | 1,5 | -6,1 | -3,7 |
| 2x3 | 1212,9 | -658,3 | 611,7 | 2,5 | 10,0 | -1,3 | 6,6 |
| 2x4 | -439,3 | -599,8 | -874,1 | -21,1 | -6,2 | -0,2 | 0,5 |
| 2x5 | -472,6 | 914,6 | 4172,2 | -2,1 | -10,8 | 4,2 | -2,7 |
| 2x6 | 16,5 | 133,8 | -754,7 | -11,2 | 28,8 | 2,4 | 0,8 |
| 2x7 | 612,3 | -8,4 | -515,7 | -6,8 | -11,4 | -3,3 | -6,0 |
| 2x8 | 10,0 | 83,1 | -656,6 | -8,6 | -0,5 | -0,5 | -2,5 |
| 2x9 | 754,9 | 36,8 | 587,9 | 30,5 | -9,1 | 5,2 | -8,1 |
| 2x10 | -275,1 | 743,7 | -1647,0 | 10,0 | -6,7 | -4,4 | 2,9 |
| 3x4 | 833,9 | 55,4 | -1770,5 | -7,7 | -5,8 | -5,8 | -4,0 |
| 3x5 | 693,5 | 377,8 | 179,8 | -0,9 | -3,6 | 1,7 | -1,1 |
| 3x6 | -149,4 | 130,1 | 2806,9 | -3,4 | -8,0 | -1,7 | -3,1 |
| 3x7 | -1292,6 | 506,8 | 724,9 | 3,5 | -5,9 | -3,5 | -3,8 |
| 3x8 | -147,9 | -142,7 | 217,0 | 5,3 | 13,9 | -1,1 | -3,8 |
| 3x9 | -784,0 | -88,9 | -434,5 | -8,9 | 0,4 | 3,0 | 0,1 |
| 3x10 | -242,0 | -119,1 | -2073,3 | 2,2 | 4,4 | 9,4 | 8,1 |
| 4x5 | -430,6 | -319,7 | -1104,0 | 15,1 | 0,2 | -2,2 | -2,2 |
| 4x6 | 1133,5 | 377,6 | 473,2 | 11,9 | 10,2 | 0,7 | 2,8 |
| 4x7 | 544,3 | 276,3 | 440,2 | -1,5 | -11,3 | 5,7 | 6,5 |
| 4x8 | -410,0 | -311,2 | -634,7 | -6,8 | 6,9 | 2,7 | -2,4 |
| 4x9 | -17,1 | -286,4 | 90,8 | 3,8 | 1,3 | 4,1 | 6,7 |
| 4x10 | -891,1 | 764,4 | 2554,9 | 1,7 | 5,6 | -4,7 | -6,9 |
| 5x6 | 879,1 | -115,1 | -1356,6 | -5,7 | -8,1 | -2,5 | 5,5 |
| 5x7 | -432,1 | -818,3 | -1002,6 | -5,2 | 6,9 | 2,3 | -1,1 |
| 5x8 | -920,4 | 341,2 | -1358,5 | 0,5 | -0,2 | 1,9 | 1,0 |
| 5x9 | -329,5 | 486,9 | 14,0 | -5,6 | 3,0 | -1,7 | -2,6 |
| 5x10 | -847,5 | -1354,2 | 1263,2 | 11,2 | 5,5 | -8,1 | 0,0 |
| 6x7 | -258,0 | -334,1 | -119,5 | 19,2 | -2,6 | 10,4 | 8,0 |
| 6x8 | 137,8 | 78,4 | -595,3 | -0,6 | 2,9 | -1,5 | 4,6 |
| 6x9 | -313,4 | -175,8 | -746,8 | -8,4 | -3,2 | -1,9 | -5,7 |
| 6x10 | -417,4 | 54,1 | -783,7 | 0,2 | -9,5 | -1,4 | -10,4 |
| 7x8 | 535,5 | 451,2 | -1625,3 | 7,9 | 0,3 | -5,2 | -1,6 |
| 7x9 | 263,4 | 564,9 | -368,8 | -19,5 | 0,8 | -12,6 | -1,5 |
| 7x10 | 875,4 | -806,2 | 2476,3 | -10,0 | 2,3 | 2,2 | 3,4 |
| 8x9 | -687,9 | -440,6 | -275,7 | 7,9 | 2,7 | -5,2 | 5,5 |
| 8x10 | 843,1 | -18,7 | 824,4 | 0,8 | -8,6 | 5,2 | 4,9 |
| 9x10 | 412,0 | 220,1 | 1260,9 | -0,3 | 5,5 | 7,9 | 1,6 |

CONCLUSÕES

Uma ampla variabilidade foi observada entre os híbridos avaliados para rendimento de grãos e teores de Fe e Zn no grão. Efeitos aditivos e não aditivos estão envolvidos no controle genético dessas características, com predomínio dos efeitos não aditivos. Objetivando a seleção simultânea das características RG e altos teores de Fe e Zn no grão, o híbrido L4 x L6 se mostrou o mais promissor, mostrando valores positivos de \hat{s}_{ij} em todos os ambientes avaliados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os acessos de milho grão e pipoca empregados neste estudo de associação genômica apresentaram variabilidade ampla para o teor dos nutrientes avaliados. Os QTNs identificados e o acúmulo de alelos superiores em um mesmo acesso revelou aumento gradual no teor de nutrientes no grão, indicando que essas marcas genéticas podem ser utilizadas em futuros programas de melhoramento visando a biofortificação do milho. Os *loci* identificados no presente trabalho serão importantes para o melhoramento de milho grão e pipoca de origem tropical no Brasil para as características nutricionais estudadas. Uma ampla variabilidade foi observada entre os híbridos avaliados para rendimento de grãos e teores de Fe e Zn. Efeitos aditivos e não aditivos estão envolvidos no controle genético dessas características, com predomínio dos efeitos não aditivos. Por fim, objetivando a seleção simultânea das características RG, Fe e Zn, o híbrido L4 x L6 (proveniente de cruzamento entre as linhagens L4 e L6) se mostrou o mais promissor, mostrando valores positivos de $\hat{\sigma}_{ij}$ em todos os ambientes avaliados.

REFERÊNCIAS

- AACC International - American Association of Cereal Chemists. **Starch—Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase**. Method 76-11.01, 1999.
- ABIMILHO - Associação Brasileira das Indústrias do Milho. **Oferta e Demanda do Milho - Brasil**. Acesso em: 21 de março de 2021. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br/estatisticas> >.
- AGUIAR, C. G. *et al.* Análise dialéctica de linhagens de milho na safrinha. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1731-1737, 2004.
- AKHTAR, S. *et al.* Iron and zinc in maize in the developing world: Deficiency, availability, and breeding. **Crop Science**, v. 58, n. 6, p. 2200-2213, 2018.
- ALI, M. *et al.* Genomic prediction for grain yield and yield-related traits in Chinese winter wheat. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1342, 2020.
- ALOMARI, D. Z. *et al.* Identifying candidate genes for enhancing grain Zn concentration in wheat. **Frontiers in plant science**, v. 9, 2018.
- ARIANI, A.; BERNY MIER Y TERAN, J. C.; GEPTS, P. Genome-wide identification of SNPs and copy number variation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using genotyping by-sequencing (GBS). **Molecular Breeding**, v. 36, n. 87, 2016.
- ARNOLD, J. M.; BAUMAN, L. F. Inheritance of and Interrelationships among Maize Kernel Traits and Elemental Contents 1. **Crop Science**, v. 16, n. 3, p. 439-440, 1976.
- AZMACH, G. *et al.* Genetic loci controlling carotenoid biosynthesis in diverse tropical maize lines. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 8, n. 3, p. 1049-1065, 2018.
- BAILEY, R. L. *et al.* The epidemiology of global micronutrient deficiencies. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 2, p. 22-33, 2015.
- BALL, S. *et al.* From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 349-352, 1996.
- BALL, S. G.; MORELL, M. K. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 207-233, 2003.
- BÄNZIGER, M.; LONG, J. The potential for increasing the iron and zinc density of maize through plant-breeding. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 21, n. 4, p. 397-400, 2000.
- BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-265, 2004.

BAXTER, I. R. *et al.* Single-kernel ionic profiles are highly heritable indicators of genetic and environmental influences on elemental accumulation in maize grain (*Zea mays*). **PLOS One**, v. 9, n. 1, p. e87628, 2014.

BIAN, Y.; HOLLAND, J. B. Enhancing genomic prediction with genome-wide association studies in multiparental maize populations. **Heredity**, v. 118, n. 6, p. 585, 2017.

BOCCIO, J. R.; IYENGAR, V. Iron deficiency. **Biological trace element research**, v. 94, n. 1, p. 1-31, 2003.

BODDY, J. Catching ancient maize domestication in the act. **Science**, v. 354, n. 6315, p. 953-954, 2016.

BOHRA, A. *et al.* **Genomic Interventions for Biofortification of Food Crops**. In: Quality Breeding in Field Crops. Springer, Cham, 2019. p. 1-21.

BOUIS, H. E.; SALTZMAN, A. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. **Global food security**, v. 12, p. 49-58, 2017.

BRKIĆ, I. *et al.* Combining abilities of corn-belt inbred lines of maize for mineral content in grain. **Maydica**, v. 48, n. 4, p. 293-297, 2003.

BROWN, K. H. *et al.* Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American journal of clinical nutrition**, v. 75, n. 6, p. 1062-1071, 2002.

BULÉON, A. *et al.* Starch granules: structure and biosynthesis. **International journal of biological macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification? **Plant and soil**, v. 302, n. 1, p. 1-17, 2008.

CHANG, F. *et al.* Genome-wide association studies for dynamic plant height and number of nodes on the main stem in summer sowing soybeans. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. August, p. 1-13, 2018.

CHEN, F. *et al.* Heterosis and genetic analysis of iron concentration in grains and leaves of maize. **Plant breeding**, v. 126, n. 1, p. 107-109, 2007.

CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. **Valor bruto da produção agropecuária deve atingir R\$ 1,142 trilhão em 2021**. Acesso em: 21 de março de 2021. Disponível em: < <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.VBP.12fev2021-v2.pdf> >.

COAN, M. *et al.* Genome-wide association study of resistance to ear rot by *Fusarium verticillioides* in a tropical field maize and popcorn core collection. **Crop Science**, v. 58, n. 2, p. 564-578, 2018.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira Grãos**. Acesso em: 6 de maio de 2019. Disponível em: <

<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> >.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira Grãos 2020**. Acesso em: 11 de fevereiro de 2021. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> >.

COOK, J. P. *et al.* Genetic architecture of maize kernel composition in the nested association mapping and inbred association panels. **Plant physiology**, v. 158, n. 2, p. 824-834, 2012.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 5, editor. Viçosa: UFV, 2012.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, Editora UFV, v. 1, p. 480, 2004.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DAVEY, J. W. *et al.* Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Review Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499-510, 2011.

DE VALENÇA, A. W. *et al.* Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. **Global Food Security**, v. 12, p. 8-14, 2017.

DELFINI, J. *et al.* Diversity of nutritional content in seeds of Brazilian common bean germplasm. **PloS One**, v. 15, n. 9, p. e0239263, 2020.

DESCALSOTA, G. I. L. *et al.* Genome-wide association mapping in a rice MAGIC Plus population detects QTLs and genes useful for biofortification. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

DESROUSSEAUX, D. *et al.* Ircorsv: Linkage disequilibrium corrected by the structure and the relatedness. **R package version**, v. 1, n. 1, 2017.

DWIVEDI, S. L. *et al.* Nutritionally Enhanced Staple Food Crops. **Plant Breeding Reviews**, v. 36, p. 169-291, 2012.

ELSHIRE, R. J. *et al.* A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2011.
doi:10.1371/journal.pone.0019379

ENDELMAN, J. B. Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. **The Plant Genome**, v. 4, n. 3, 2011.

FENTON, M. E. *et al.* High-density linkage mapping of vitamin E content in maize grain. **Molecular Breeding**, v. 38, n. 3, p. 31, 2018.

FLINT-GARCIA, S. A. *et al.* Kernel evolution: from teosinte to maize. **the book Maize kernel development**. Lincoln: University of Nebraska-Lincoln, p. 1-16, 2017.

FLINT-GARCIA, S. A.; BODNAR, A. L.; SCOTT, M. P. Wide variability in kernel

composition, seed characteristics, and zein profiles among diverse maize inbreds, landraces, and teosinte. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 6, p. 1129-1142, 2009.

FORNASIERI, F. D. **Manual da cultura do milho**. FUNEP. Jaboticabal, 2007.

GARDNER, C. O.; EBERHART, S. A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, p. 439-452, 1966.

GLOWINSKI, A.; FLINT-GARCIA, S. **Germplasm Resources for Mapping Quantitative Traits in Maize**. In: The Maize Genome. Springer, Cham, 2018. p. 143-159.

GOLDMAN, I. L.; ROCHEFORD, T. R.; DUDLEY, J. W. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois Long Term Selection maize strains. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p. 217-224, 1993.
doi:10.1007/BF00223767

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian journal of biological sciences**, v. 9, n. 4, p. 463-493, 1956.

GUPTA, D. S. *et al.* **Rice, Wheat and Maize Biofortification**. In: Sustainable Agriculture Reviews. Springer, Cham, 2015, p. 123-140.

GUPTA, P. K.; KULWAL, P. L.; JAISWAL, V. Association mapping in plants in the post-GWAS genomics era. **Advances in Genetics**, v. 104, p. 75-154, 2019.

GYAWALI, S. *et al.* Multiple element concentration in the grain of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) collection. **Journal of Plant Nutrition**, p. 1-11, 2019.

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; FILHO, J. B. M. **Quantitative genetics in maize breeding**. Springer, Nova York, 2010, p. 664.

HARPER, L. C. *et al.* The Maize GDB Genome Browser tutorial: one example of database outreach to biologists via video. **Database**, 2011.

HAYMAN, B. Y. The theory and analysis of diallel crosses. **Genetics**, v. 39, n. 789, p. 789-809, 1954.

HE, L. *et al.* Genome-wide association studies for pasmo resistance in flax (*Linum usitatissimum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1982, 2019.

HILL, W. G.; WEIR, B. S. Variances and covariances of squared linkage disequilibria in finite populations. **Theoretical Population Biology**, v. 33, n. 1, p. 54-78, 1988.

HINDU, V. *et al.* Identification and validation of genomic regions influencing kernel zinc and iron in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 7, p. 1443-1457, 2018.

HIREMATH, N. *et al.* Heterosis Breeding for Maturity, Yield and Quality Characters in Maize (*Zea mays* L.). **Molecular Plant Breeding**, v. 4, 2013.

- HUANG, X. *et al.* Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. **Nature genetics**, v. 42, n. 11, p. 961-967, 2010.
- HWANG, E.-Y. *et al.* A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.
- JAMES, M. G.; ROBERTSON, D. S.; MYERS, A. M. Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. **The Plant Cell**, v. 7, n. 4, p. 417-429, 1995.
- JAMES, M.G.; DENYER, K.; MYERS, A. M. Starch synthesis in the cereal endosperm. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 215-222, 2003.
- JEON, J.-S. *et al.* Starch biosynthesis in cereal endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 383-392, 2010.
- JIN, T. *et al.* The genetic architecture of zinc and iron content in maize grains as revealed by QTL mapping and meta-analysis. **Breeding Science**, v. 63, n. 3, p. 317-324, 2013.
- JOY, E. J. M. *et al.* Soil type influences crop mineral composition in Malawi. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 587-595, 2015.
- KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2013.
- KUMAR, J. *et al.* Genetics of Fe, Zn, β -carotene, GPC and yield traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using multi-locus and multi-traits GWAS. **Euphytica**, v. 214, n. 11, p. 219, 2018.
- KUMP, K. L. *et al.* Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 163-168, 2011.
- KWOK, P.-Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, n. 1, p. 235-258, 2001.
- LAN, S. *et al.* Genomic prediction accuracy of seven breeding selection traits improved by QTL identification in flax. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020.
- LI, H. *et al.* Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels. **Nature genetics**, v. 45, n. 1, p. 43, 2013.
- LI, Q. *et al.* Genome-wide association studies identified three independent polymorphisms associated with α -tocopherol content in maize kernels. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36807, 2012.
- LI, X. *et al.* Combined linkage and association mapping reveals QTL and candidate genes for plant and ear height in maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

- LIN, F. *et al.* QTL mapping for maize starch content and candidate gene prediction combined with co-expression network analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 7, p. 1931-1941, 2019.
- LIPKA, A. E. *et al.* GAPIT: genome association and prediction integrated tool. **Bioinformatics**, v. 28, n. 18, p. 2397-2399, 2012.
- LISTMAN, G. M. *et al.* Improving nutrition through biofortification: Preharvest and postharvest technologies. **Cereal Foods World**, v. 64, n. 3, p. 1-7, 2019.
- LIU, N. *et al.* Identification of quantitative trait loci and candidate genes for maize starch granule size through association mapping. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14236, 2018.
- LIU, W. *et al.* Novel Sources of Stripe Rust Resistance Identified by Genome-Wide Association Mapping in Ethiopian Durum Wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum). **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- LIU, N. *et al.* Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Genes for Starch Content Regulation in Maize Kernels. **Frontiers in Plant Science**, 7:1046, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01046
- LONG, J. K.; BÄNZIGER, M.; SMITH, M. E. Diallel analysis of grain iron and zinc density in southern African-adapted maize inbreds. **Crop Science**, v. 44, n. 6, p. 2019-2026, 2004.
- LUNG'AHU, M. G. *et al.* Genetic and physiological analysis of iron biofortification in maize kernels. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20429, 2011.
- MALLIKARJUNA, M. G. *et al.* Comparative Transcriptome Analysis of Iron and Zinc Deficiency in Maize (*Zea mays* L.). **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1812, 2020.
- MALLIKARJUNA, M. G. *et al.* Stability performance of inductively coupled plasma mass spectrometry-phenotyped kernel minerals concentration and grain yield in maize in different agro-climatic zones. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0139067, 2015.
- MANICKAVELU, A. *et al.* Genetic nature of elemental contents in wheat grains and its genomic prediction: toward the effective use of wheat landraces from Afghanistan. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169416, 2017.
- MAQBOOL, M. A. *et al.* Breeding for provitamin A biofortification of maize (*Zea mays* L.). **Plant Breeding**, v. 137, n. 4, p. 451-469, 2018.
- MAQBOOL, M. A.; BESHIR, A. Zinc biofortification of maize (*Zea mays* L.): Status and challenges. **Plant Breeding**, v. 138, n. 1, p. 1-28, 2019.
- MAZIYA-DIXON, B. *et al.* Genetic variation in total carotene, iron, and zinc contents of maize and cassava genotypes. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 21, n. 4, p. 419-422, 2000.
- MENKIR, A. Genetic variation for grain mineral content in tropical-adapted maize inbred lines. **Food chemistry**, v. 110, n. 2, p. 454-464, 2008.

- MESSIAS, R. S. *et al.* Micronutrient and functional compounds biofortification of maize grains. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 123-139, 2015.
- NADEEM, M.A. *et al.* DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. **Biotechnology Biotechnological Equipment**, v.32, p.261–285, 2018. doi: 10.1080/13102818.2017.1400401
- TANDZI, L. N. *et al.* Breeding for quality protein maize (QPM) varieties: a review. **Agronomy**, v. 7, n. 4, p. 80, 2017.
- ORTIZ-MONASTERIO, J. I. *et al.* Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 293-307, 2007.
- OWENS, B. F. *et al.* A foundation for provitamin A biofortification of maize: genome-wide association and genomic prediction models of carotenoid levels. **Genetics**, v. 198, n. 4, p. 1699-1716, 2014.
- PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2006.
- PALACIOS-ROJAS, N. *et al.* Mining maize diversity and improving its nutritional aspects within agro-food systems. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1809-1834, 2020.
- PERERA, I. *et al.* Identification of low phytic acid and high Zn bioavailable rice (*Oryza sativa* L.) from 69 accessions of the world rice core collection. **Journal of Cereal Science**, v. 85, p. 206-213, 2019.
- PINSON, S. R. M. *et al.* Worldwide genetic diversity for mineral element concentrations in rice grain. **Crop Science**, v. 55, n. 1, p. 294-311, 2015.
- PIXLEY, K. *et al.* Biofortification of maize with provitamin A carotenoids. In: **Carotenoids and human Health**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 271-292.
- PIXLEY, K. V.; PALACIOS-ROJAS, N.; GLAHN, R. P. The usefulness of iron bioavailability as a target trait for breeding maize (*Zea mays* L.) with enhanced nutritional value. **Field Crops Research**, v. 123, n. 2, p. 153-160, 2011.
- PRASAD, A. S. Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 17, n. 7-8, p. 685-687, 2001.
- PRASANNA, B. M. *et al.* Molecular breeding for nutritionally enriched maize: status and prospects. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1392, 2020.
- QIN, H. *et al.* Identification of QTL for zinc and iron concentration in maize kernel and cob. **Euphytica**, v. 187, n. 3, p. 345-358, 2012.

QUEIROZ, V. A. V. *et al.* Disponibilidade de ferro e zinco em linhagens de milho. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 577-583, 2011.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

RASHEED, A. *et al.* Crop Breeding Chips and Genotyping Platforms: 85 Progress, Challenges, and Perspectives. **Molecular Plant**, v.10, p.1047–1064, 2017. doi: 10.1016/j.molp.2017.06.008

REMLINGTON, D. L. *et al.* Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11479-11484, 2001.

RESENDE, M. D. V. Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 16, 330-339. 2016.

REVILLA, P. *et al.* Association mapping for cold tolerance in two large maize inbred panels. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, p. 127, 2016.

RICACHENEVSKY, F. K. *et al.* Improving the Nutritional Content and Quality of Crops: Promises, Achievements, and Future Challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 738, 2019.

RIEDELSEIMER, C. *et al.* Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 8872-8877, 2012.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SALTZMAN, A. *et al.* Biofortification: progress toward a more nourishing future. **Global Food Security**, v. 2, p. 9-17, 2013 doi: 10.1016/j.gfs.2012.12.003

SAS INSTITUTE. JMP IN 4.0.3 Cary, North Carolina, 2000.

SCHNABLE, P. S. *et al.* The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1112-1115, 2009.

SCHRÖDER, S. *et al.* Optimization of genotyping by sequencing (GBS) data in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2016.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

ŠIMIĆ, Domagoj *et al.* Genetic variation of bioavailable iron and zinc in grain of a maize population. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 3, p. 392-397, 2009.

SOFI, P. A. *et al.* Quality protein maize (QPM): genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 1, n. 6, p. 244-253, 2009.

STAPLEY, J. *et al.* Adaptation genomics: The next generation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 12, p. 705-712, 2010.

SU, C. *et al.* High density linkage map construction and mapping of yield trait QTLs in maize (*Zea mays*) using the genotyping-by-sequencing (GBS) technology. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

SUWARNO, W. B. *et al.* Genome-wide association analysis reveals new targets for carotenoid biofortification in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 5, p. 851-864, 2015.

TAMBA, C. L.; NI, Y. L.; ZHANG, Y. M. Iterative sure independence screening EM-Bayesian LASSO algorithm for multi-locus genome-wide association studies. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–20, 2017.

TAMBA, C. L.; ZHANG, Y.-M. A fast mrMLM algorithm for multi-locus genome-wide association studies. **Biorxiv**, p. 341784, 2018.

TAUTZ, D.; RENZ, M.. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

THAKUR, N. *et al.* Evaluation of elite maize genotypes (*Zea mays* L.) for nutritional traits. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 6, n. 1, p. 350-354, 2015.

TIBBS CORTES, L.; ZHANG, Z.; YU, J. Status and prospects of genome-wide association studies in plants. **The Plant Genome**, p. e20077, 2021.

USDA – United State Department of Agriculture. **Grain: World Markets and Trade**. Acesso em: 14 de fevereiro de 2021. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>>.

VASCONCELOS, M. W.; GRUISSEM, W.; BHULLAR, N. K. Iron biofortification in the 21st century: setting realistic targets, overcoming obstacles, and new strategies for healthy nutrition. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 8-15, 2017.

VELU, G. *et al.* Genetic dissection of grain zinc concentration in spring wheat for mainstreaming biofortification in CIMMYT wheat breeding. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 13526, 2018.

VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

- VYN, T. J.; TOLLENAAR, M. Changes in chemical and physical quality parameters of maize grain during three decades of yield improvement. **Field Crops Research**, v. 59, n. 2, p. 135-140, 1998.
- WANG, D. G. *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1077-1082, 1998.
- WANG, H. *et al.* Development of a multiple-hybrid population for genome-wide association studies: theoretical consideration and genetic mapping of flowering traits in maize. **Scientific reports**, v. 7, p. 40239, 2017.
- WANG, N. *et al.* Identification of loci contributing to maize drought tolerance in a genome-wide association study. **Euphytica**, v. 210, n. 2, p. 165-179, 2016.
- WANG, S. B. *et al.* Improving power and accuracy of genome-wide association studies via a multi-locus mixed linear model methodology. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–10, 2016.
- WANG, W. Y. S. *et al.* Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 2, p. 109-118, 2005.
- WEN, W. *et al.* Broadening our portfolio in the genetic improvement of maize chemical composition. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 8, p. 459-469, 2016.
- WEN, W. *et al.* Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- WESSELLS, K. R.; BROWN, K. H. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e50568, 2012.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.
- WILSON, L. M. *et al.* Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. **The Plant Cell**, v. 16, n. 10, p. 2719-2733, 2004.
- WURTZEL, E. T.; CUTTRISS, A.; VALLABHANENI, R.. Maize provitamin A carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 29, 2012.
- XU, Y. *et al.* Genome-wide association mapping of starch pasting properties in maize using single-locus and multi-locus models. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.
- YAN, J. *et al.* Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. **PloS One**, v. 4, n. 12, p. e8451, 2009.
- YU, J. *et al.* A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 203, 2006.

- YU, L.-X. *et al.* Identification and validation of single nucleotide polymorphic markers linked to Ug99 stem rust resistance in spring wheat. **PloS One**, v. 12, n. 2, p. e0171963, 2017.
- ZAID, I. U. *et al.* Genome-wide single-nucleotide polymorphisms in CMS and restorer lines discovered by genotyping using sequencing and association with marker-combining ability for 12 yield-related traits in *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 143, 2017.
- ZAIDI, P. H. *et al.* Genomic regions associated with root traits under drought stress in tropical maize (*Zea mays* L.). **PloS One**, v. 11, n. 10, p. e0164340, 2016.
- ZEEMAN, S. C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A. M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 209-234, 2010.
- ZHANG, C. *et al.* Analysis of the genetic architecture of maize ear and grain morphological traits by combined linkage and association mapping. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 5, p. 1011-1029, 2017.
- ZHANG, J. *et al.* PLARmEB: Integration of least angle regression with empirical Bayes for multilocus genome-wide association studies. **Heredity**, v. 118, n. 6, p. 517–524, 2017.
- ZHANG, J. *et al.* Genome-wide association study for flowering time, maturity dates and plant height in early maturing soybean (*Glycine max*) germplasm. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 217, 2015.
- ZHAO, F.-J.; MCGRATH, S. P. Biofortification and phytoremediation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 373-380, 2009.
- ZHAO, Q.-Y. *et al.* Identifying key drivers for geospatial variation of grain micronutrient concentrations in major maize production regions of China. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115114, 2020.