



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WILLIAN GIORDANI

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES AFLP
ASSOCIADOS A REAÇÃO DO MILHO À *Puccinia polysora***

Londrina
2017

WILLIAN GIORDANI

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES AFLP
ASSOCIADOS A REAÇÃO DO MILHO À *Puccinia polysora***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves.

Londrina
2017

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

Giordani, Willian .

Diversidade genética e marcadores AFLP associados a reação do milho à *Puccinia polysora*. / Willian Giordani. - Londrina, 2017.
89 f. : il.

Orientador: Leandro Simões Azeredo Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Ferrugem polissora - Tese. 2. Marcadores Moleculares - Tese. 3. Variabilidade Genética - Tese. 4. Estudos de Associação - Tese. I. Gonçalves, Leandro Simões Azeredo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

WILLIAN GIORDANI

**DIVERSIDADE GENÉTICA E MARCADORES AFLP ASSOCIADOS A
REAÇÃO DO MILHO À *Puccinia polysora***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo
Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Liliane Marcia Mertz Henning
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

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

Londrina, 23 de Janeiro de 2017.

Aos meus pais, Dirceu e Maristela, pelo amor incondicional e por nunca terem deixado de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais, por todo amor, carinho e confiança durante toda a minha trajetória. Por cada palavra de incentivo nos momentos de angústia e pela infinita paciência nas horas de incompreensão. Por mesmo distantes, estarem sempre presentes ao meu lado e acima de tudo pelos exemplos de seres humanos que eu sonho em ser um dia.

Ao meu orientador, Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, pela orientação, disponibilidade, apoio e ensinamentos que contribuíram muito para minha formação. Agradeço também pela amizade, confiança e por todas as oportunidades oferecidas.

Aos meus tios Liliane e Fernando pelo enorme incentivo, apoio, suporte e amizade. Pelos exemplos de determinação e dedicação. Por todas as oportunidades e pela confiança depositada em mim. A vocês a minha profunda e sincera gratidão.

À minha namorada Marina, por compartilhar minhas alegrias, me apoiar nos momentos de receio, pelo companheirismo e compreensão que me ajudaram a seguir em frente.

Aos professores da Universidade Estadual de Londrina, especialmente à professora Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca pelos ensinamentos e pelo suporte sempre que necessário.

À todo o pessoal do Laboratório de citogenética e marcadores moleculares da UEL, em especial ao Lucas Benício, à Renata Giacomini e à Bruna Delgado Góes, pela amizade, paciência e por toda ajuda e ensinamentos na realização desse trabalho.

À Embrapa Soja pela infraestrutura oferecida e pela oportunidade de estagiar durante esses dois anos.

À todo o pessoal da Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja pela amizade e pelos valiosos ensinamentos. Agradeço em especial a Juliane P. Marinho por todo apoio e parceria e pelos exemplos de dedicação e competência.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Scapim e a Universidade Estadual de Maringá pela fundamental parceria e por toda a ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas da Universidade Estadual de Maringá, especialmente ao Marlon Coan, ao Rodrigo Ivan Contreras Soto e ao Lucas Camacho pela parceria, ajuda e ensinamentos essenciais para a concretização desse trabalho.

A todos os amigos, especialmente ao Cristian Rafael , a Julia Abati, a Flávia Werner e ao Leandro Spolaor por me acolherem desde a chegada em Londrina, por toda a força que me deram e pelos ótimos momentos compartilhados.

Aos meus familiares que sempre me deram força e acreditaram em mim.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

GIORDANI, Willian. **Diversidade genética e marcadores AFLP associados a reação do milho à *Puccinia polysora***. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O milho é a espécie que apresenta a maior diversidade genética entre os cereais, demonstrada por milhares de cultivares adaptadas a diferentes regiões, climas e solos, e resistentes a várias enfermidades. Conhecer e acessar essa variabilidade é essencial para o melhoramento da cultura, permitindo a identificação de fontes de resistência para diversas doenças. Dentre as doenças que afetam o milho, a ferrugem polissora apresenta destaque, podendo causar perdas significativas na produtividade, e apresentando severas epidemias em várias regiões do Brasil. Já foram identificados alguns genes de resistência a essa doença, contudo a maioria deles confere resistência a uma ou apenas algumas raças do patógeno, tornando importante a busca pela resistência horizontal. A utilização de marcadores moleculares vem auxiliando o melhoramento, permitindo acessar a diversidade genética e identificar marcadores e QTLs relacionados à resistência a doenças. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de linhagens de milho e identificar marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) associados à reação do milho à ferrugem polissora. Foram conduzidos dois experimentos à campo, nas épocas de safra (2014) e segunda safra (2014/2015), na fazenda experimental da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, Paraná, sob o delineamento experimental de blocos casualizados, com duas repetições. Foram avaliadas 145 linhagens de milho, sendo 77 de milho comum e 68 de milho-pipoca. As linhagens foram fenotipadas para severidade de ferrugem polissora e genotipadas por meio de reações AFLP utilizando quatro combinações de *primers* que resultaram na identificação de 975 bandas polimórficas. O coeficiente de similaridade de Jaccard foi utilizado para estimar as distâncias genéticas que foram utilizadas para o agrupamento hierárquico Ward. A estrutura populacional foi estimada por meio do software STRUCTURE e a matriz *kinship* por meio do software SPAGED1. Para a realização do estudo de associação foram utilizados quatro modelos matemáticos por meio do software TASSEL. Houve efeito significativo de linhagens, safras e da interação linhagens x safras. O experimento de segunda safra apresentou maior severidade de ferrugem polissora. Os marcadores AFLP foram eficientes em discriminar geneticamente as linhagens. A análise da estrutura de população mostrou que os genótipos pertencem a dois agrupamentos principais. O modelo de associação contendo os dois fatores, estrutura de população e *kinship*, restringiu o número de associações significativas, reduzindo a chance de obtenção de falsos positivos. Três marcadores (EactMctg18, EactMctg169, EactMctg205) foram considerados interessantes candidatos para estudos mais aprofundados visando sua efetiva incorporação em programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Zea mays*. Ferrugem polissora. Marcadores moleculares. Variabilidade genética. Estudos de associação.

GIORDANI, Willian. **Genetic diversity and AFLP markers associated with maize reaction to *Puccinia polysora***. 2017. 89p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Maize is the specie that presents the greater genetic diversity among cereals, demonstrated by thousands of cultivars adapted to different regions, climates, soils and resistant to various diseases. Knowing and accessing this variability is essential for the maize breeding, allowing an identification of resistance sources for many diseases. Among the diseases that affect maize, southern rust is one of the most important, causing significant losses in yield, and presenting severe epidemics in several regions of Brazil. Some resistance genes to this disease have already been identified, but most of them confer resistance only to one or few races of the pathogen, showing the importance of searching for horizontal resistance. The use of molecular markers has been helping the breeders, allowing access to the genetic diversity and permitting identify markers and QTLs related to disease resistances. Thus, the objective of this study was evaluated the genetic diversity of 145 maize lines and identify AFLP markers (Amplified Fragment Length Polymorphism) associated to the maize reaction for southern rust. Two experiments were carried out in the field, being first crop (2014) and second crop (2014/2015) at the experimental farm of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil. The experimental design was randomized blocks with two replications. A total of 145 maize lines were evaluated, being 77 of common corn and 68 of popcorn. The lines were evaluated for the severity of southern rust and genotyped through AFLP using four primer combinations that resulted in the identification of 975 polymorphic bands. The Jaccard similarity coefficient was used to estimate the genetic distances whose were applied to the Ward hierarchical clustering. The population structure was estimated using the STRUCTURE software and the kinship matrix using SPAGED1 software. For the association studies, four mathematical models were obtained by TASSEL software. There was a significant effect of lines, crops and interaction between lines and crops. The second crop experiment showed higher southern rust severity. AFLP markers were efficient in discriminating the lines. The population structure analysis showed that the genotypes belong to two main groups. The association model containing the both factors, population structure and kinship, restricted the number of significant associations, reducing the chance of obtaining false positives. According to the results, three markers (EactMctg18, EactMctg169, EactMctg205) were considered interesting candidates for further studies aiming their effective incorporation into breeding programs.

Key words: *Zea mays*. Southern rust. Molecular markers. Genetic variability. Association studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do procedimento de AFLP	28
Figura 2 – Escala diagramática de severidade de ferrugem polissora (<i>Puccinia polysora</i>) em milho.....	37
Figura 3 – Distribuição de frequência das notas de severidade de linhagens de milho a ferrugem polissora (<i>Puccinia polysora</i>) no experimento de safra – 2014 (A) e segunda safra – 2014/2015 (B)	47
Figura 4 – Valores médios mensais de temperatura máxima, temperatura mínima e precipitação durante o período de avaliação dos experimentos de safra (2014/2015) e segunda safra (2015).....	49
Figura 5 – Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 145 linhagens de milho, pelo método Ward, com base no polimorfismo obtido por marcadores moleculares AFLP, utilizando-se a distância generalizada de Jaccard	54
Figura 6 – Estrutura populacional de 145 linhagens de milho estimada pelo software Structure. A) Formação de dois <i>clusters</i> de acordo com o coeficiente de adesão dos genótipos. B) Valor de Δk e número ótimo de K, obtido conforme Evanno et al., (2005). C) Coeficiente de adesão de dos genótipos em cada <i>cluster</i> . O eixo y representa o coeficiente de adesão (<i>membership</i>) dos genótipos nos grupos	57
Figura 7 – Quantile-Quantile plots do $-\log_{10}$ entre os p-valores observados e esperados das análises de associação utilizando quatro modelos matemáticos nos experimentos de safra (A) e segunda safra (B).....	61
Figura 8 – Média de severidade de ferrugem polissora dos genótipos de milho na presença e ausência dos marcadores associados significativamente por quatro modelos matemáticos no experimento de safra (2014)	63
Figura 9 – Média de severidade de ferrugem polissora dos genótipos de milho na presença e ausência dos marcadores associados significativamente por quatro modelos matemáticos no experimento de segunda safra (2014/2015)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Modelos matemáticos mais utilizados em estudos de associação.....	35
Tabela 2 – Notas de severidade em relação a escala diagramática de Fantin (1997), para diferentes níveis de severidade	38
Tabela 3 – Tampão de extração de DNA.....	39
Tabela 4 – Combinações de <i>primers</i> <i>EcoRI/MseI</i> testadas na amplificação seletiva	40
Tabela 5 – Expressões matemáticas dos modelos utilizados para o estudo de associação	44
Tabela 6 – Análise de variância para o percentual da severidade transformado de ferrugem polissora e parâmetros genéticos e ambientais de 145 linhagens de milho, em duas safras agrícolas (2014 e 2014/2015)	46
Tabela 7 – Marcadores associados à reação do milho à ferrugem polissora por quatro modelos estatísticos utilizando marcadores AFLP e fenotipagem realizada em experimentos de safra (2014) e segunda safra (2014/2015)	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	A CULTURA DO MILHO	15
2.1.1	Milho-Pipoca.....	16
2.1.2	Épocas de Cultivo.....	17
2.2	DOENÇAS DO MILHO	19
2.2.1	Ferrugem Polissora	21
2.3	MELHORAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS.....	23
2.4	MARCADORES MOLECULARES.....	25
2.4.1	Marcadores AFLP.....	28
2.5	MAPEAMENTOS E ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO FENÓTIPO X MARCADOR	30
2.5.1	Estrutura de População e <i>Kinship</i>	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	EXPERIMENTOS À CAMPO	36
3.1.1	Avaliação Fenotípica	37
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA	38
3.3	REAÇÕES AFLP	39
3.3.1	Preparo das Amostras para Eletroforese Capilar em Sistema Automatizado.....	41
3.4	ANÁLISE DOS DADOS.....	41
3.4.1	Análise dos Dados Fenotípicos	41
3.4.2	Análise dos Dados Genotípicos	42
3.4.2.1	Estudo de diversidade, estrutura populacional e parentesco	42
3.4.3	Estudo de Associação.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	SEVERIDADE DE FERRUGEM POLISSORA.....	46
4.2	ESCOLHA DOS <i>PRIMERS</i> PARA AMPLIFICAÇÃO SELETIVA.....	51
4.3	ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA	52

4.4	ESTRUTURA DE POPULAÇÃO	56
4.5	ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	57
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES	83
	APÊNDICE A – Identificações, nomes e origens dos acessos de milho comum pertencentes ao banco de germoplasma de milho da UEM	84
	APÊNDICE B – Identificações, nomes e origens dos acessos de milho- pipoca pertencentes ao banco de germoplasma de milho da UEM	85
	APÊNDICE C – Integridade do DNA de 166 linhagens de milho em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio	86
	APÊNDICE D – Análise de componentes principais de 145 linhagens de milho baseada no polimorfismo gerado por AFLP	87
	APÊNDICE E – Acessos classificados como altamente resistentes (notas inferiores a 2) de acordo com a média dos experimentos de safra (2014) e segunda safra (2014/2015).....	88
	APÊNDICE F – Polimorfismo de AFLP de oito linhagens de milho, gerado por seis diferentes combinações de <i>primers</i> seletivos, em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata	89

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo sendo uma importante fonte para a alimentação humana e animal e matéria-prima para a indústria. No Brasil, a cultura também possui destaque em decorrência do grande volume de grãos produzidos e da ampla área cultivada. Devido a sua grande adaptabilidade, representada por uma ampla diversidade genética, o cultivo do milho estende-se a uma extensa faixa de latitudes, altitudes, épocas e condições de cultivo. Desta forma, a cultura pode ser encontrada em climas tropicais, subtropicais e temperados. No Brasil o milho é cultivado em todas as regiões, com destaque para o Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

A alta adaptabilidade e o grande número de cultivares disponíveis se devem principalmente a pesquisas relacionadas ao manejo da cultura e aos trabalhos de melhoramento genético desenvolvidos nas últimas décadas, que permitiram, além da ampliação das regiões, épocas e condições de cultivo, também um enorme salto de produtividade. No entanto, apesar de crescer anualmente, a produtividade brasileira na safra 2015/16, foi de pouco mais de 4.300 kg ha⁻¹ (CONAB, 2016), valor considerado baixo quando comparada ao potencial produtivo do milho, que foi várias vezes reportado em mais de 20.000 kg ha⁻¹ (TOLLENAAR; LEE, 2002).

Entre os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do milho no Brasil, estão a semeadura em épocas e regiões inadequadas, a correção e a adubação do solo deficientes, a utilização de densidade de plantas inadequada e a perdas por estresses abióticos e bióticos.

Por apresentar uma ampla abrangência geográfica, sendo submetida a diversas condições edafoclimáticas, o número de doenças que acometem o milho é elevado e podem comprometer severamente a produtividade. Entre as principais doenças destacam-se a mancha branca (vários agentes patogênicos), a antracnose (*Colletotrichum graminicola*), a cercosporiose (*Cercospora zeaemaydis*), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora*), a ferrugem tropical (*Physopella zae*), a ferrugem comum (*Puccinia sorghi*), a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), o enfezamento vermelho (*maize bushy stunt phytoplasma*), as podridões de colmo e os grãos ardidos.

A ferrugem polissora é considerada a mais destrutiva das ferrugens que acometem a cultura do milho. Tem sido relatada em muitas áreas tropicais e subtropicais, sendo comum em ambientes onde prevalecem temperatura e umidade elevadas. O potencial de perdas decorrentes de epidemias de ferrugem polissora já foi relatado em mais de 65% (COSTA et al., 2012).

A resistência genética é a forma mais eficiente de controle de doenças na cultura do milho, por isso muitos programas de melhoramento visam o desenvolvimento de cultivares resistentes. Para o desenvolvimento dessas cultivares, é essencial a identificação de fontes de resistência, buscando em bancos de germoplasma por genes e regiões genômicas capazes de conferir resistência.

No processo de melhoramento, a fenotipagem é tida como uma das etapas mais laboriosas, demandando muito tempo e recursos, além de sofrer influência dos efeitos ambientais que nem sempre conseguem ser isolados no processo de seleção. Para aumentar a eficiência desse processo, a seleção assistida por marcadores moleculares vem assumindo um papel importante, possibilitando o uso simultâneo de dados fenotípicos e genotípicos por meio de marcadores associados a características de interesse.

A maioria das características de importância agronômica, visadas em programas de melhoramento são determinadas por genes localizados em vários locos. Dentre as características de caráter poligênico destacam-se a produtividade e a resistência horizontal a maioria das doenças. Os locos gênicos que afetam um caráter poligênico são denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*).

Com o advento dos marcadores moleculares, o conhecimento sobre os QTLs aumentou significativamente, facilitando os estudos de caracteres importantes e permitindo sua abordagem como herança mendeliana. A partir das informações fornecidas pelos marcadores moleculares, é possível mapear individualmente os QTLs e identificar marcadores associados a esses locos, o que é fundamental para o entendimento da herança dos caracteres poligênicos.

Os estudos de associação são utilizados na identificação de marcadores e QTLs responsáveis por variação fenotípicas e baseiam-se na avaliação do desequilíbrio de ligação (DL) entre sequências de DNA e os locos e alelos responsáveis pelas características de interesse.

Vários tipos de marcadores moleculares podem ser utilizados para a realização de estudos de diversidade genética e de associação. Nos últimos anos, o

desenvolvimento de novas plataformas de genotipagem tem permitido a detecção de um grande número de SNPs, tornando-os altamente utilizados em estudos de diversidade e no mapeamento. Contudo, os marcadores mais antigos também podem ser utilizados para estudos desse gênero e apresentam como principal vantagem o baixo custo e maior acessibilidade.

A identificação de marcadores AFLP tem sido utilizada em estudos de diversidade genética, mapeamento e associação pois é considerada barata, rápida, confiável e permite a obtenção de um grande número de marcadores informativos em um curto espaço de tempo, além de possuir acessibilidade elevada, podendo ser uma boa opção para programas de melhoramento pequenos ou com recursos limitados como é o caso daqueles desenvolvidos por universidades e pequenas empresas públicas ou privadas.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de linhagens de milho e identificar marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) associados à reação do milho à ferrugem polissora.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae é o cereal mais produzido no mundo, sendo uma das espécies vegetais mais cultivadas. Acredita-se que sua domesticação tenha ocorrido há aproximadamente 5 a 10 mil anos na América Central. Apesar da dificuldade em precisar sua origem, existem várias teorias que indicam que o milho tenha se originado do teosinto, um tipo de gramínea selvagem encontrada no México (WANG et al., 1999; RANUM et al., 2014).

A estimativa da produção mundial de milho na safra de 2015/16 foi de 959,73 milhões de toneladas (USDA, 2016). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, produzindo aproximadamente 80 milhões de toneladas anualmente em uma área total de 15,8 milhões de hectares, dos quais mais de dez milhões concentram-se na segunda safra (CONAB, 2016).

A área cultivada com milho abrange um amplo território, e é exposta a diferentes condições edafoclimáticas sendo sua semeadura realizada em várias épocas do ano (RANUM et al., 2014; SCHMITT, 2014).

Nas últimas décadas o sistema produtivo da cultura do milho no Brasil evoluiu muito, permitindo um aumento de produtividade de aproximadamente 400%. Essa evolução se deve a vários fatores como a utilização de sementes de qualidade, maiores níveis de adubação, utilização de produtos químicos, aumento da mecanização, maior qualidade de arranjo de plantas e principalmente aos avanços na área de melhoramento genético por meio do desenvolvimento de cultivares híbridas (GALVÃO et al., 2014).

No Brasil, as pesquisas na área de melhoramento visando a obtenção de híbridos tiveram início entre 1930 e 1932 tendo como objetivo principal, o alcance de maiores produtividades (PATERNIANI et al., 2000).

Os programas atuais de melhoramento de milho no Brasil, sejam eles por meio da abordagem clássica ou por meio da engenharia genética e do melhoramento assistido por marcadores moleculares, têm como principais objetivos o aumento da produtividade, a maior tolerância ao incremento na densidade de plantas, a resistência ao acamamento, a maior qualidade dos grãos e maior tolerância a estresses abióticos e bióticos (PARENTONI et al., 2013).

As condições de cultivo no Brasil apresentam grande variabilidade, seja devido às condições climáticas, dada a enorme abrangência espacial e temporal da cultura no território nacional, ou decorrência do nível de tecnologia e investimento empregado. Isso resulta em uma produtividade média aquém do potencial produtivo da cultura. Na safra 2015/16, a produtividade média brasileira foi de pouco mais de 4.300 kg ha⁻¹ (CONAB, 2016). Esta produtividade é baixa quando comparada à dos Estados Unidos, que no mesmo ano agrícola foi de mais de 10.500 kg ha⁻¹ (USDA, 2016).

Apesar da baixa produtividade média nacional, as lavouras brasileiras que empregam alta tecnologia e um bom nível de manejo costumam obter produtividades bastante elevadas, atingindo patamares considerados excelentes para a cultura e muito superiores à média nacional. Os principais fatores que contribuem para que a produtividade média seja aquém do potencial da cultura são o uso de cultivares com baixo potencial produtivo ou não adaptadas à região e época de cultivo, semeaduras impróprias, utilização de arranjos de plantas inadequados, aplicação de baixas doses de fertilizantes, estresses abióticos dentre os quais se destaca o déficit hídrico e fatores bióticos com destaque para a incidência de pragas e doenças (SANGOI et al., 2010).

2.1.1 Milho-Pipoca

As primeiras classificações, definiam o milho-pipoca como *Zea mays* L. var. *evarta* (Sturtev) L.H. Bailey. Contudo, Graner e Godoy Junior (1959) relataram que todos os grupos classificados como espécies ou subespécies são na verdade formas genéticas definidas e complexas com diferentes características e estrutura do grão, sendo o gênero *Zea* definido como monotípico.

O milho-pipoca (*Zea mays* L.) é um tipo de milho se caracteriza por possuir grãos duros e pequenos que apresentam a peculiaridade de estourar devido a uma pressão formada dentro do grão quando aquecidos em torno de 177° C (HOSENEY et al., 1983).

No Brasil, apesar do mercado ainda incipiente, o consumo e o interesse dos produtores pelo cultivo do milho-pipoca vem aumentando (FREITAS JUNIOR et al., 2009; DE PAULA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016). Contudo,

mesmo com o aumento na importância, a produção ainda é considerada aquém do potencial de mercado para a cultura (ARNHOLD et al., 2009). A principal limitação para o cultivo tem sido o baixo número de cultivares que apresentem caracteres de interesse agrônômico e alta capacidade de expansão (SCAPIM et al., 2010).

A produção nacional de milho-pipoca se concentra basicamente em cultivares exóticas e apresenta estreita base genética (GONÇALVES et al., 2015). Considerando as diferentes condições edafoclimáticas nas quais a cultura é cultivada, é de extrema importância o desenvolvimento de cultivares adaptadas e a diminuição na dependência de sementes e cultivares provenientes do mercado externo (VIEIRA et al., 2009).

O Brasil possui 75 cultivares de milho-pipoca registradas (MAPA, 2016), no entanto, a maioria delas pertence a indústrias alimentícias e empresas empacotadoras de grãos, que costumam manter as sementes disponíveis apenas para alguns produtores parceiros (GONÇALVES et al., 2014).

Nos últimos anos, pôde-se perceber um aumento no interesse e no número de estudos buscando o melhoramento do milho-pipoca (MIRANDA et al., 2008; SCAPIM et al., 2010; SILVA et al., 2009; PENA et al., 2016). Nesse contexto, a avaliação genótipos e a realização de estudos de diversidade genética são essenciais para a obtenção de cultivares mais adaptadas e produtivas (GONÇALVES et al., 2015; LEAL et al., 2010; TRINDADE et al., 2010). Para resistência a ferrugem polissora, por exemplo, os programas de melhoramento ainda são iniciais e têm se concentrado na identificação de genótipos resistentes (VIEIRA et al., 2011).

2.1.2 Épocas de Cultivo

No Brasil, a cultura do milho tem sido cultivada praticamente durante o ano todo, com a divisão da produção principalmente em duas épocas de cultivo. A primeira época, denominada primeira safra ou safra de verão, tem a semeadura realizada na época tradicional, durante o período chuvoso (final de agosto na região Sul até os meses de outubro e novembro no Sudeste e Centro-oeste). Por sua vez, a segunda safra, ou safrinha, se refere ao cultivo extemporâneo, semeado na

sucessão à soja ou ao próprio milho, principalmente entre fevereiro e março (MIRANDA et al., 2012).

O interesse pela segunda safra teve início no final da década de 70 e a busca por uma época de cultivo alternativa tem sido atribuída principalmente à necessidade de utilização do milho para a subsistência da propriedade, ao baixo interesse dos produtores pelas opções cultiváveis no período outono/inverno e à perspectiva de colheita e comercialização em uma época de baixa disponibilidade no mercado e conseqüentemente de preços superiores (CRUZ et al., 2014).

A concorrência com a soja, mais interessante do ponto de vista econômico, tem feito com que a área cultivada com milho em cultivos de primeira safra venha decrescendo. Contudo, a diminuição na área de primeira safra tem sido compensada com o aumento nos cultivos extemporâneos. Isso tem feito com que a denominação “safrinha”, seja gradativamente substituída pela expressão “segunda safra”, uma vez que o termo “safrinha” remete ao fato do cultivo, em seu surgimento, ser uma safra pequena e de baixa produtividade, o que não é mais verificado atualmente (MIRANDA et al., 2012).

Para que se obtenham altas produtividades no cultivo de milho na segunda safra, é importante que haja um bom planejamento, principalmente em relação a escolha do ciclo da cultura e da cultivar utilizada na primeira safra, buscando que o milho em sucessão seja cultivado sob uma boa e regular disponibilidade hídrica (GALVÃO et al., 2015).

Além da disponibilidade hídrica, existem outros fatores que exigem atenção em cultivos de segunda safra. Segundo Grigolli (2014), o milho de segunda safra costuma ser mais suscetível ao ataque de doenças, uma vez que, as adversidades climáticas, comuns na época da semeadura fazem com que as plantas fiquem mais expostas aos ataques de patógenos. Sendo assim, o conhecimento da dinâmica das doenças no campo e a interferência de fatores climáticos é de grande importância para um manejo fitossanitário adequado. Dentre as doenças de maior importância na segunda safra, destacam-se a cercosporiose (*Cercospora zeaemaydis*), a mancha branca (vários agentes patogênicos), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora*) e a ferrugem tropical (*Physopella zea*).

2.2 DOENÇAS DO MILHO

No Brasil, até a metade da década de 90, o milho era considerado uma cultura rústica e com alta tolerância à doenças. Por esse motivo, o manejo para o controle das enfermidades não era um fator levado em conta pela grande maioria dos produtores (COTA et al., 2013). No entanto, nos últimos anos, as doenças têm assumido papel relevante no cultivo do cereal, se tornando uma grande preocupação para técnicos e produtores (COSTA et al., 2009).

Segundo Cota et al. (2013) o aumento da importância das doenças do milho no Brasil está fortemente relacionada a evolução do sistema de produção. Dentre os fatores que contribuíram para o aumento na incidência e na severidade das doenças, merecem destaque a expansão da área cultivada; a ampliação da época de semeadura; a utilização de cultivares com diferentes níveis de resistência às doenças; o manejo inadequado da irrigação e a evolução do sistema de plantio direto principalmente associado a ausência de rotação de culturas (PINTO et al., 1997; COTA et al., 2013).

O novo cenário no sistema de produção trouxe uma alteração no microclima e na biologia dos agroecossistemas refletindo nas populações dos agentes patogênicos. Os restos culturais presentes sobre a superfície do solo favorecem a sobrevivência e desenvolvimento de muitos fitopatógenos. Isso tem resultado no reaparecimento de doenças antigas e na mais intensa manifestação de inúmeras enfermidades (JULIATTI et al., 2007; PINTO, 2004; REIS; CASA, 2001).

A capacidade das doenças em comprometer o rendimento de grãos do milho é bastante variável, podendo superar 80% para as mais agressivas. Além do rendimento, as doenças ainda podem trazer impactos negativos sobre a qualidade dos grãos e sobre a viabilidade de realização de tratamentos culturais (CASA et al., 2006; COSTA et al., 2009).

Segundo Casela et al. (2006), a mancha branca (vários agentes patogênicos), a antracnose (*Colletotrichum graminicola*), a cercosporiose (*Cercospora zeaemaydis*), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora*), a ferrugem tropical (*Physopella zae*), a ferrugem comum (*Puccinia sorghi*), a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), o enfezamento vermelho (*maize bushy stunt phytoplasma*), as podridões de colmo e os grãos ardidos estão entre as principais doenças que acometem o milho. A importância destas doenças é variável e influenciada por

diversos fatores, com destaque para as condições climáticas, o nível de suscetibilidade das cultivares, o manejo adotado e a época de cultivo (COTA et al., 2013).

As principais estratégias recomendadas para o manejo de doenças do milho são a utilização de cultivares resistentes, a semeadura em épocas e locais adequados, o uso de sementes certificadas e com alta qualidade fitossanitária, a adoção de rotação de culturas, a adubação equilibrada, e o controle químico (CASELA et al., 2006; COTA et al., 2013).

A aplicação de fungicidas para o manejo de doenças na cultura do milho tem aumentado vertiginosamente nas últimas safras. Assim, esta que era uma prática exclusiva de campos de produção de sementes e dos cultivos de milhos especiais, como o pipoca, atualmente é uma estratégia comumente utilizada por produtores de grãos em lavouras comerciais (COSTA; COTA, 2009).

Apesar de mostrar-se eficiente em várias situações, o controle químico ainda é considerado instável, nem sempre apresentando resultados satisfatórios no que se refere à produtividade. Além disso, o retorno econômico as vezes não é verificado, mesmo quando existem impactos positivos sobre a produtividade (COSTA; COTA, 2009).

O controle químico pode ainda trazer consequências indesejáveis do ponto de vista ambiental e para a saúde dos profissionais responsáveis pela aplicação (CASTRO, 2006). Por esses motivos, a utilização de fungicidas para o controle das doenças do milho têm levado à formação de opiniões contraditórias sobre a sua viabilidade.

Apesar de várias estratégias serem usadas para o manejo de doenças, e devido a limitações e efeitos indesejáveis da aplicação de agroquímicos, a utilização de cultivares resistentes é considerada a estratégia mais atrativa e eficiente ao produtor. Seu uso dispensa custos adicionais, não impacta de maneira negativa no ambiente, é compatível com outras técnicas de manejo e pode ser suficiente para o controle da doença (CASELA et al., 2006).

Por esses motivos, programas de melhoramento de diversas espécies têm focado cada vez mais no desenvolvimento de cultivares resistentes à doenças (DUVICK, 2005; GROVER; PENTAL, 2003; SUN et al., 2014).

2.2.1 Ferrugem Polissora

Considerada a mais destrutiva das ferrugens que afetam o milho, a ferrugem polissora, causada pelo fungo *Puccinia polysora* Underw, foi durante toda a década de 90 a doença foliar mais importante da cultura, mantendo sua importância até hoje. A doença costuma se manifestar em ambientes de temperatura e umidade elevadas e por isso tem sido relatada em diversas regiões tropicais e subtropicais (SHURTLEFF, 1992; ABADASSI, 2015). Em regiões tropicais do Brasil, incluindo o Cerrado e a região Sul, a ferrugem polissora é considerada de elevada importância econômica. Severas epidemias têm sido detectadas em toda a região Centro-Oeste do Brasil, noroeste de Minas Gerais, e nos estados de São Paulo e Paraná (CASELA et al., 2006; COSTA et al., 2010).

Fatores como o monocultivo em sistemas de plantio direto e a utilização de híbridos suscetíveis contribuem para o aumento na incidência e nas perdas ocasionadas pela doença (COSTA et al., 2012). Os danos causados por essa enfermidade incluem redução da área foliar, redução do vigor e da massa das sementes, senescência precoce e acamamento de plantas (PATAKY, 2000).

As condições ambientais ideais para o desenvolvimento de *P. polysora* envolvem temperatura entre 23 e 28 °C e elevada umidade relativa do ar (CASELA; FERREIRA, 2002). Nessas condições a doença é capaz de reduzir em mais de 65% a produtividade de alguns híbridos (VON PINHO, 1998; COSTA et al., 2012). Para o desenvolvimento de epidemias, apesar de fatores como molhamento e umidade relativa do ar também sejam importantes e necessários, a temperatura é o principal fator limitante (RAID, 1988).

A dispersão dos esporos a longas distâncias é realizada pela ação do vento, e por ser um patógeno biotrófico, sua sobrevivência no campo irá depender da presença de plantas vivas (PEREIRA et al., 2005; WANLAYAPORN et al., 2013).

Por apresentarem temperaturas mais amenas, as principais regiões produtoras de milho do sul do Brasil, não eram consideradas propícias à ocorrência da ferrugem polissora. Entretanto, na safra 2009/2010, a doença foi detectada em severas epidemias em diversas regiões produtoras de milho nos três estados do sul do Brasil, causando prejuízos aos produtores e em muitas situações, exigindo o controle químico com fungicidas. Na mesma safra, o Ensaio Nacional de Cultivares de Milho, realizado em Londrina e em Passo Fundo, demonstrou elevada severidade da

doença, evidenciando também a susceptibilidade da maioria dos híbridos utilizados pelos produtores do sul do Brasil (COSTA et al., 2010).

Dudienas et al. (2013), estudando a reação de cultivares comerciais de milho quanto à resistência à ferrugem polissora constataram redução da produtividade em função de diferentes níveis de severidade, variando de 3,5%, quando 2,5% de área foliar encontrava-se afetada pela doença, até 20,3% para cultivares com 39% de área foliar afetada.

A formação de pústulas circulares à ovais, de coloração marrom-clara à alaranjada, medindo 0,2 à 2 mm de diâmetro, distribuídas predominante na face superior das folhas, constituem os sinais típicos da ferrugem polissora (PATAKY, 2000).

Os teliosporos, raros na natureza, e os urediniosporos do patógeno são considerados inóculos primário e secundário da doença. Os urediniosporos, formados no interior das pústulas, têm coloração amarela à dourada e possuem tipicamente um formato elíptico ou oval. Os teliosporos, podem aparecer em círculos ao redor das pústulas urediniais, com 0,2 a 0,5 mm de diâmetro, de cor marrom chocolate à preta (SHURTLEFF, 1992).

É comum o engano entre a ferrugem polissora e a ferrugem comum, causada pelo patógeno *Puccinia sorghi*, apesar da primeira ser muito mais destrutiva. Segundo Shurtleff et al. (1992), os urediniosporos da *Puccinia sorghi* são mais escuros, menores, possuem formato arredondados, e são produzidos em uredínias mais alongadas, de cor marrom canela escura. Além disso, geralmente, por se estabelecer no cartucho das folhas, a infecção por *P. sorghi* resulta no desenvolvimento de pústulas em faixas transversais nas folhas.

A alta variabilidade desse patógeno e o impacto e dispersão dessa doença mundialmente pode ser confirmada pelo fato de mais de dez raças de *P. polysora* já terem sido identificadas em vários continentes. As raças EA.1, EA.2 e EA.3 foram reportadas no leste africano (STOREY; HOWLAND 1961; STOREY; HOWLAND 1967), as raças PP.3, PP.4, PP.5, PP.6, PP.7, e PP.8 foram identificadas em isolados das Américas Central, do Sul e do Norte (ROBERT, 1962) e a raça PP.9 foi identificada em germoplasma sul africano (ULLSTRUP, 1965).

Casela e Ferreira (2002) avaliando a reação de 50 híbridos para 60 isolados monopostulares obtidos em diferentes áreas de ocorrência da doença no Brasil, verificaram 17 padrões de virulência de *P. polysora*. A amplitude desses

padrões foi verificada em todos os locais amostrados, sugerindo uma possível ausência de diferenciação geográfica entre as populações de *P. polysora* presentes no Brasil. Além disso, nenhum dos híbridos avaliados foi resistente a todos os isolados.

As principais medidas recomendadas para o manejo da ferrugem polissora compreendem o uso de cultivares resistentes, a escolha da época adequada de semeadura, a consolidação do sistema de rotação de culturas, e aplicação de fungicidas para os casos de elevada severidade da doença e para cultivares suscetíveis (COSTA et al., 2009). Dentre essas alternativas, a utilização de cultivares resistentes é a de menor custo e a mais eficiente no controle de ferrugem polissora, apresentando bons níveis de controle (SILVA et al., 2001; PEREIRA et al., 2005; COSTA et al., 2010).

2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS

O desenvolvimento de cultivares resistentes à doenças é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de diversas espécies (GROVER; PENTAL, 2003; SUN et al., 2014). A escolha dessa característica se deve ao fato de que o controle de doenças pela utilização de cultivares resistentes é o mais barato e de mais fácil utilização, além de trazer outras vantagens como o menor impacto ambiental, ao agricultor e ao consumidor, em decorrência principalmente da menor utilização de agroquímicos (BESPALHOK et al., 2006).

Segundo Michereff (2001), o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças, inicia com a identificação de fontes de resistência por meio da busca em germoplasmas por genótipos que possuam os genes de resistência. Estes genes então, são incorporados à cultivares por meio dos métodos de melhoramento. Por fim, deve-se escolher a melhor estratégia para que a resistência da cultivar seja durável em vista à dinâmica populacional dos patógenos que favorecem a quebra da resistência. Essa peculiaridade, decorrente da interação planta-patógeno, é um desafio para os melhoristas, uma vez que a resistência das cultivares precisa ser desenvolvida continuamente (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A resistência a doenças é fundamental para que as cultivares tenham ampla adaptabilidade à ambientes e boa estabilidade de produção. Como as condições ambientais costumam ser muito variáveis entre as regiões produtoras, a

predisposição para a incidência e progresso das doenças também varia (VIEIRA, 2010).

Vanderplank (1963), propôs duas classificações para a resistência a doenças de acordo com sua efetividade contra raças dos patógenos, a resistência horizontal e a resistência vertical. Essas classificações são muitas vezes utilizadas como sinônimos de resistência monogênica e poligênica. Na resistência vertical, os genótipos possuem resistência completa à determinadas raças da doença, enquanto que, na horizontal, os genótipos expressam níveis de resistência, comumente atuando sobre todas as raças do patógeno. Normalmente, a resistência vertical é facilmente quebrada pelos patógenos, ao passo que, a resistência horizontal, por ser controlada por vários genes, é mais dificilmente superada, sendo desta forma mais durável, porém sofrendo maior influência ambiental (MATTIELO et al., 1997).

A resistência à doenças na cultura do milho pode ser conferida pela ação de genes de efeitos aditivos e não-aditivos. Os genes de efeitos aditivos, normalmente possuem pequenos efeitos que somados a outros genes de efeitos aditivos, expressam fenótipo resistente, decorrente da ação conjunta destes genes e seus alelos. Os genes não-aditivos, por sua vez, são resultantes de locos sob efeitos de dominância e epistasia (CRUZ, 2005).

No Brasil, estudos para o entendimento dos efeitos gênicos relacionados à resistência à ferrugem polissora concluíram que os genes de efeitos aditivos foram os mais importantes (FANTIN, 1993; SILVA et al., 2001). Silva et al., (2001) também encontraram efeitos heteróticos para a resistência em alguns híbridos, mostrando que efeitos não-aditivos também podem apresentar contribuição para esta característica.

Vários genes de resistência para ferrugem polissora já foram identificados, contudo estes genes costumam apresentar resistência para uma ou poucas raças do patógeno sendo geralmente dominantes ou dominantes incompletos (STOREY; HOWLAND, 1957; ULLSTRUP, 1965; BREWBAKER et al., 2011). Entre eles vale-se destacar os genes: *Rpp1*, que confere resistência à raça EA1; *Rpp2*, que confere resistência à raça EA2 (STOREY; HOWLAND, 1961); *Rpp9*, que confere resistência à raça PP. 9 (ULLSTRUP, 1965), *RppQ* (ZHOU et al., 2007) e *RppP25* (ZHAO et al., 2013).

Além disso, resistência poligênica, horizontal também foi relatada. Vários genes e QTLs para resistência a ferrugem polissora já foram mapeados no

cromossomo 10, utilizando diferentes germoplasma (LIU et al., 2003; CHEN et al., 2004; ZHOU et al., 2007; JINES et al., 2007; ZHANG et al., 2009). O braço curto do cromossomo 10 (Região 10S) tem sido mais especificamente a principal região alvo de busca por genes de resistência. Diversos genes de resistência à doença já foram identificados nessa região, como os genes RppS (WU et al., 2015), Rpp9 (ULLSTRUP, 1965), RppQ (CHEN et al., 2004; ZHOU et al., 2007), RppD (ZHANG et al., 2010) e RppP25 (LIU et al., 2003; ZHAO et al., 2013), além dos genes de resistência à ferrugem comum, Rp1 (ULLSTRUP, 1965) e Rp5 (HULBERT; BENNETZEN, 1991). Por esse motivo, a região 10S tem sido denominada *Rpp cluster*.

Para Casela e Ferreira (2002), considerando o histórico de controle da doença em outros países e as características da doença nas condições nacionais, é importante que as estratégias de desenvolvimento de cultivares resistentes à doença sejam de longo prazo, que não foquem apenas na resistência vertical, buscando assim maior durabilidade e estabilidade no controle da doença.

Uma das principais dificuldades para a seleção de genótipos resistentes à ferrugem polissora é a inconsistência da ocorrência da doença nos ambientes de seleção, apresentando uma grande diferença de severidade entre os anos e por isso dificultando a fenotipagem. Outro fator é a alta variabilidade genética do fungo *P. polysora*, permitindo sua rápida adaptação aos materiais resistentes disponíveis no mercado. Por esse motivo, é imprescindível a adoção de estratégias que envolvam um trabalho contínuo de identificação de novas fontes de resistência, mais efetivas no controle da doença e de maior durabilidade (DAMASCENO et al., 2015).

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Com avanços da genética e da biologia molecular, principalmente relacionados ao advento da tecnologia do DNA recombinante, à reação em cadeia da polimerase (PCR) e ao sequenciamento de DNA, foram criadas importantes técnicas para o desenvolvimento de marcadores de DNA. Esses marcadores, também denominados marcadores moleculares têm sido utilizados desde então, nas mais diversas áreas, principalmente visando a identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos de diversas espécies (FALEIRO, 2007).

Para o melhoramento vegetal, os marcadores moleculares foram inicialmente utilizados no início dos anos 80 (SOLLER; BECKMANN, 1983) e são definidos como segmentos de DNA que podem estar fisicamente ligados a locos responsáveis por alguma característica de interesse (FALEIRO, 2007) e que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997).

A identificação de marcadores moleculares é geralmente feita por meio de técnicas moleculares como a digestão por enzimas de restrição, a hibridização entre sequências complementares de DNA, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (FALEIRO, 2007) ou pelo sequenciamento em larga escala, que devido às novas técnicas de sequenciamento teve sua utilização aumentada exponencialmente nos últimos anos (CARVALHO; SILVA, 2010).

Os marcadores moleculares apresentam variações em termos de custo, rapidez de obtenção de resultados, quantidade de DNA requerido, grau de conhecimento técnico necessário, nível de polimorfismo, precisão da distância genética estimada e o alcance estatístico dos testes (AITKEN et al., 2006). Por esses motivos a escolha de cada um irá depender do objetivo de sua utilização e dos recursos disponíveis no laboratório.

A utilização de marcadores moleculares traz grandes benefícios ao melhoramento de plantas, aliando tecnologias economicamente viáveis e de fácil manipulação aos interesses do desenvolvimento de cultivares mais produtivas, adaptáveis e resistentes. Seu potencial de utilização se baseia em sua fácil detecção e no fato de poderem ser estudados como caracteres de herança simples e mendeliana, possuindo uma alta herdabilidade (FALEIRO, 2007).

Os principais marcadores moleculares que levam em conta polimorfismos nas sequências de DNA são: RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) (BOTSTEIN et al., 1980); microssatélites ou SSR – *Simple Sequence Repeats* (seqüências simples repetidas) (TAUTZ, 1989); RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (WILLIAMS et al., 1990); AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) (VOS, 1995); além dos marcadores SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo em um único nucleotídeo) e de outros marcadores mais modernos.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas plataformas de genotipagem, conhecidas como sequenciamento de nova geração (NGS), surgiu um novo conceito, denominado “genotipagem por sequenciamento” (GBS), que tem permitido a detecção de um grande número de SNPs. A alta densidade de SNPs detectados, o elevado polimorfismo, e a facilidade de utilização tem feito com que muitos pesquisadores e grandes programas de melhoramento tenham visado pela sua utilização em estudos de mapeamento (DESCHAMPS et al., 2012).

No entanto os marcadores mais antigos também podem ser utilizados para estudos desse gênero, e apresentam como principal vantagem o baixo custo e maior acessibilidade. Segundo Vieira et al. (2006), a técnica de marcadores AFLP tem sido utilizada em estudos de mapeamento e de associação pois é relativamente barata, rápida, confiável e permite a obtenção de um grande número de marcadores informativos em um curto espaço de tempo, além de possuir acessibilidade elevada.

Segundo Foolad (2007), marcadores considerados laboriosos como por exemplo RFLPs ou AFLPs, não são eficientes em programas de melhoramento de plantas que exigem a genotipagem de populações muito grandes. No entanto, a utilização desse tipo de marcador pode ser uma estratégia interessante para programas de melhoramento pequenos ou com recursos limitados como é o caso daqueles desenvolvidos por universidades e pequenas empresas públicas ou privadas.

A identificação de marcadores moleculares associados a genes de resistência à doenças facilitam a seleção assistida a obter cultivares de milho resistentes pelos programas de melhoramento (BABU et al., 2004).

Para *P. polysora*, Zhang et al. (2010) identificaram em uma linhagem de milho, W2D, um gene capaz de conferir resistência parcial. Além disso, conseguiram identificar um marcador ligado a aproximadamente 2 Mbp do gene *RppD*, localizado no braço curto do cromossomo 10, que também contempla outros genes de resistência.

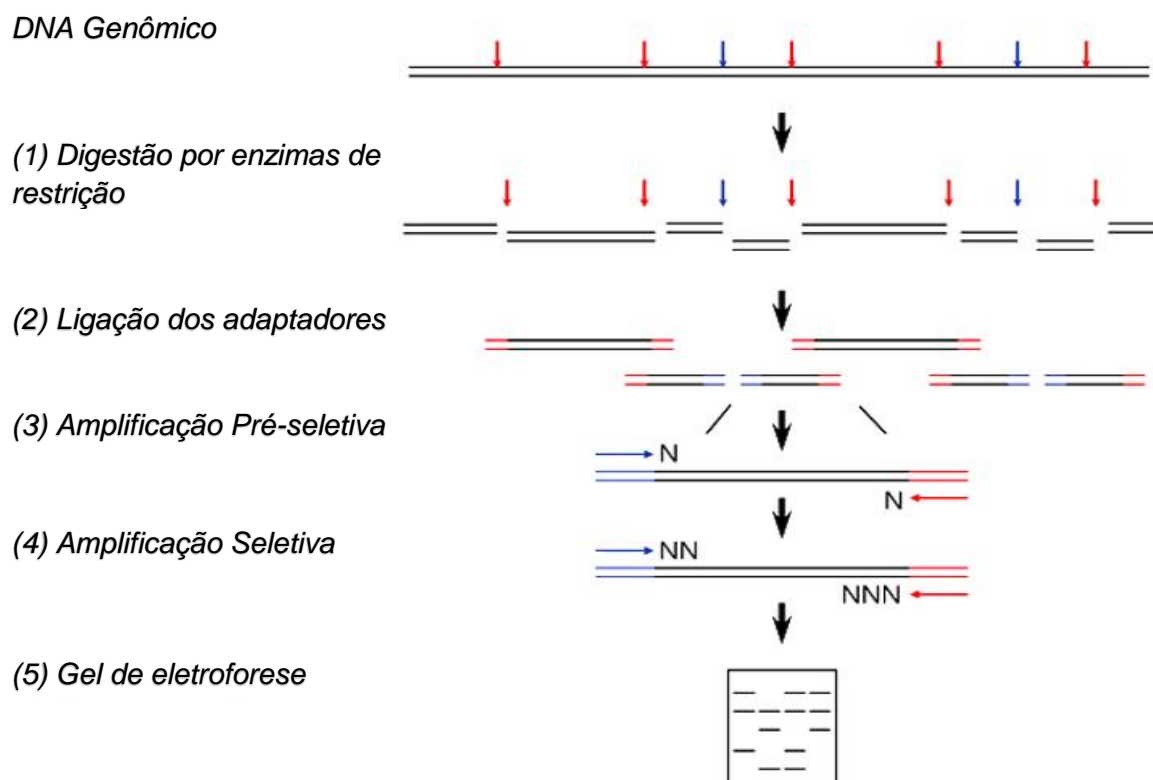
Trabalhando com linhagens tropicais de milho doce, Wanlayaporn et al (2013) por meio de marcadores microsatélites identificaram 15 QTLs de resistência a ferrugem polissora, localizados em seis cromossomos, entre eles o cromossomo 10.

2.4.1 Marcadores AFLP

O AFLP é uma técnica molecular utilizada para a genotipagem de DNA de diferentes espécies e complexidades. Ela tem sido bastante utilizada devido ao seu grande número de aplicações, dentre elas o monitoramento da herança em plantas e animais, diagnóstico de doenças genéticas, análises de pedigree, análise forense, análise parental e *screening* de marcadores de DNA ligados a características genéticas (BLEARS et al., 1998).

A técnica do AFLP, proposta por Vos et al. (1995), é dividida em quatro etapas básicas que consistem na digestão do DNA genômico, ligação de adaptadores, ampliações e análise dos fragmentos (Figura 1).

Figura 1 – Etapas do procedimento de AFLP.



Amostra do DNA genômico. Digestão do DNA pela combinação de duas enzimas de restrição (1). Ligação de adaptadores específicos aos sítios de restrição (2). Pré-amplificação utilizando *primers* complementares aos adaptadores, com poucas bases específicas (3). Amplificação seletiva utilizando *primers* com três bases específicas (4). Gel de eletroforese dos produtos de amplificação (5).

Fonte: Adaptado de Vuylsteke (2007, p. 1387)

Na primeira etapa, denominada etapa de digestão, o DNA é clivado por meio de duas enzimas de restrição, uma responsável pela realização de corte

raro, com 6-8 bases de reconhecimento, e outra de corte frequente, com sítio de restrição de quatro bases. O resultado final da digestão é a formação de três tipos de fragmentos. São eles, os fragmentos gerados pela clivagem por enzimas de corte raro nas duas extremidades e por isso de baixa frequência; os fragmentos clivados em ambas as extremidades por enzimas de corte frequente, portanto mais comuns; e os fragmentos clivados numa extremidade por enzima de corte raro e na outra por enzima de corte frequente, de constância intermediária.

Na segunda etapa, denominada etapa de ligação, são ligados adaptadores às extremidades dos fragmentos previamente clivados pelas enzimas de restrição. Esta etapa tem por finalidade a formação de extremidades de sequências conhecidas, as quais serão utilizados como sítios para iniciadores (*primers*) nas amplificações subsequentes.

A terceira fase do processo consiste na amplificação dos fragmentos digeridos e ligados aos adaptadores. Nesta etapa dois *primers* são utilizados, um deles complementar ao adaptador e a região de corte raro, com um a três nucleotídeos adicionais na região 3'; e o outro, complementar ao adaptador e a região de corte frequente, com um a três nucleotídeos adicionais na região 3'.

Embora não exista um método específico, uma estratégia bastante utilizada é a amplificação realizada em duas etapas, que foi desenvolvida para genomas mais complexos. Na primeira etapa de amplificação, denominada pré-amplificação, ou amplificação pré-seletiva, utilizam-se *primers* contendo um ou nenhum nucleotídeo seletivo. Os produtos de PCR dessa pré-amplificação são então diluídos e utilizados como moldes para uma segunda etapa de amplificação, chamada amplificação seletiva, desta vez com *primers* contendo três nucleotídeos seletivos.

A quarta e última etapa consiste na análise dos fragmentos em gel de poliacrilamida ou por eletroforese capilar em sistema automatizado, onde os fragmentos serão separados para a realização das análises (VOS et al., 1995).

A técnica de AFLP possui algumas vantagens em relação a outros marcadores, dentre elas destacam-se a capacidade de examinar o polimorfismo de um genoma completo e a sua alta reprodutibilidade. Sendo assim, apesar de exigir um pouco mais de tempo e ser mais trabalhosa que outras técnicas, o AFLP possui maior confiabilidade. Normalmente ela consegue detectar um grande número de

marcas, com alto nível de polimorfismo e apresenta a conveniência de ter um baixo custo.

Por esses motivos, as técnicas baseadas em marcadores moleculares do tipo AFLP têm sido muito aplicadas para estudos de diversidade e no mapeamento genético de diversas espécies, como sorgo (MENZ et al., 2002), videira (OLIVEIRA et al., 2005), cana-de-açúcar (GARCIA et al., 2006), brócolis (LIN et al., 2015), batata-doce (ZHAO et al., 2013), feijão (ANDRADE et al., 2016) entre outras.

Em milho esse tipo de marcador já se mostrou eficiente para o mapeamento de genes de resistência à várias doenças (XU et al., 1999). Zhou et al. (2007), utilizando marcadores RAPD, SSR, AFLP e SCAR encontraram os maiores níveis de polimorfismo para os SSR e AFLP. Os resultados demonstraram que esses marcadores são ferramentas efetivas e confiáveis para estudos de mapeamento. Os mesmos autores conseguiram ainda identificar, por meio de mapeamento fino via AFLP, marcadores fortemente ligados ao gene *RppQ*, responsável pela resistência do milho à algumas raças de ferrugem polissora. O gene foi mapeado entre um marcador SCAR e um marcador AFLP a uma distância de 0,46 e 1,71 cM respectivamente, possibilitando assim sua utilização para seleção assistida e clonagem gênica em programas de melhoramento que visem resistência à *P. polysora*.

2.5 MAPEAMENTOS E ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO FENÓTIPO X MARCADOR

A maioria das características de importância agrônômica buscadas em programas de melhoramento são determinadas por vários locos, apresentando variação contínua e grande influência ambiental (STUBER, 1995). Dentre elas, pode-se destacar a produtividade de grãos, a altura de planta, o teor de óleo e de proteína e resistência horizontal às doenças. Esses caracteres são denominados caracteres quantitativos. Os locos gênicos que afetam um caráter quantitativo são denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e podem englobar único gene ou um segmento do cromossomo contendo vários genes (RAMALHO et al., 1993).

Com o advento dos marcadores moleculares o conhecimento sobre os QTLs aumentou, facilitando os estudos de caracteres importantes e permitindo sua abordagem como herança mendeliana. A partir das informações fornecidas pelos marcadores moleculares, é possível mapear individualmente os QTLs, o que é

fundamental para o entendimento da herança dos caracteres poligênicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O mapeamento genético se baseia na realização de inferências da relação entre os valores fenotípicos de caracteres quantitativos e marcadores individuais, por meio de diferentes modelos estatísticos. Quando um marcador está associado ao fenótipo conclui-se que existe um QTL para a característica, associado a um marcador (LANDER; BOTSTEIN, 1989).

A capacidade de se identificar um QTL depende, entre outros fatores, da intensidade com que o QTL atua sobre a característica, do tamanho da população avaliada no estudo, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL e da herdabilidade da característica estudada (BORÉM; CAIXETA, 2009).

A maioria dos mapeamentos de QTLs baseiam-se em populações segregantes oriundas de cruzamentos controlados, utilizando indivíduos provenientes de cruzamentos bi-parentais. A obtenção dessas populações normalmente possui um alto custo e é bastante laborioso além de possuir baixa resolução na detecção de QTLs, uma vez que apenas dois *backgrounds* genéticos são amostrados simultaneamente (FLINT-GARCIA et al., 2003). Assim, somente a diversidade dos dois genitores é contemplada, dificultando um estudo conjunto de diversos genótipos e suas respectivas variações.

Para superar essas limitações, foi proposto o mapeamento associativo, que dispensa a necessidade de utilização de populações segregantes, permitindo sua utilização inclusive em pesquisas de espécies nas quais a realização de cruzamentos é impossibilitada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2006). Uma vez que não há a necessidade de cruzamentos controlados e análise de descendentes, as análises associativas são muito utilizadas na dissecação de características complexas, para identificação de marcadores associados a QTLs de interesse, (YU; BUCKLER, 2006).

Inicialmente utilizado para a identificação de locos relacionados a doenças humanas, os estudos de associação passaram mais tarde a ser largamente utilizados em espécies vegetais com o intuito de mapear genes responsáveis por caracteres de interesse agrônomo (CARLSON, et al., 2001; PRITCHARD, 1999; THORNSBERRY et al., 2001; MUNDIM, 2013; RIBEIRO, 2015; ANONI, 2016). Em plantas, a metodologia usual envolve o uso de populações sem progênie, compostas de indivíduos não aparentados provenientes de diferentes *backgrounds* genéticos,

com distinto histórico de seleção e origens, e que apresentam ampla variabilidade para a característica de interesse (ABDURAKHMANOV; ABDUKARIMOV, 2008).

Os estudos de associação consistem na identificação de locos que controlam caracteres quantitativos, a partir do mapeamento inúmeros de variantes alélicas, de modo que a associação detectada possa ser atribuída ao desequilíbrio de ligação entre marcadores e polimorfismos funcionais em um conjunto de genótipos (YU; BUCKLER, 2006).

O DL é definido como a associação não-aleatória de alelos em diferentes locos, ou seja, se em uma população, dois alelos de locos distintos são encontrados juntos com frequência maior do que a esperada (produto da frequência dos alelos individuais), diz-se que eles estão em desequilíbrio de ligação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2006). A não-aleatoriedade pode resultar em alterações na frequência de haplótipos na população estudada (FLINT-GRACIA et al., 2003). Esse conceito pode ser estendido às associações não aleatórias que ocorrem entre dois marcadores moleculares, dois genes, dois QTLs ou entre um gene (ou QTL) e um marcador (GUPTA et al., 2005).

O DL envolve os múltiplos eventos de recombinação sucedidos ao longo da história evolutiva da espécie nas diversas populações, fato que permite associar genes de interesse com os marcadores moleculares (BUCKLER et al., 2009).

Segundo Gupta et al. (2005), por explorar uma alta diversidade de genótipos, com grau de parentesco distintos, o mapeamento associativo apresenta algumas conveniências como a alta diversidade alélica; a possibilidade da redução de tempo e custo; e a comum obtenção de mapas de alta resolução devido ao alto potencial de recombinação entre alelos ao decorrer das gerações. Desta forma espera-se que somente marcadores fortemente ligados ao loco permaneçam associados ao caráter de interesse.

Por fim, a resolução do mapeamento, a densidade dos marcadores, os métodos estatísticos e o poder e resolução do mapeamento são determinadas com base na diversidade genética, na extensão do desequilíbrio no genoma e no relacionamento genético dentro de uma população (ZHU et al., 2008).

Em milho, o mapeamento associativo tem sido utilizado no melhoramento para várias características como produtividade (VEIGA, 2014); tolerância a estresses abióticos (RIBEIRO, 2015; ANONI, 2016; MUNDIM, 2013);

entendimento de mecanismos de crescimento e desenvolvimento da planta (LIMA, 2014) e para resistência a doenças (VEIGA, 2014).

Apesar da grande maioria dos estudos de associação serem realizados atualmente utilizando estratégias de genotipagem por sequenciamento e identificando marcadores SNP (HUANG; HAN, 2014), análises da associação também podem ser realizadas por meio de marcadores mais antigos como o AFLP (PARKER, 2007; DADRAS et al., 2014). Contudo, as limitações da utilização desse tipo de marcador se baseiam na necessidade da formação de uma região amplificada de sequência caracterizada (SCAR) para a efetiva localização dos marcadores no genoma da espécie estudada e incorporação dos mesmos em programas de seleção assistida (ZARGAR et al., 2015).

2.5.1 Estrutura de População e *Kinship*

As principais limitações dos estudos de associação são a presença de alelos raros, a necessidade de uma alta densidade de marcadores e de um controle eficiente da estrutura de população e grau de relacionamento genético entre os indivíduos (THORNSBERRY et al., 2001; YU; BUCKLER, 2006).

A presença de estrutura genética e de alto grau de parentesco entre os indivíduos pode resultar em falsas associações, levando a alta ocorrência de erros tipo I. Isto ocorre pois se o fenótipo também estiver correlacionado com marcadores relacionados com a estrutura da população, este resultará um número inflacionado de associações significativas (HALL et al., 2010).

A estratégia mais utilizada para superar esta limitação é utilização das matrizes de estrutura populacional (Q) e de relacionamento - *kinship* (K) como covariáveis nos modelos de associação (PRITCHARD et al., 2000).

A estimação da estrutura de população é realizada por meio de diferentes metodologias dentre as quais se destacam os métodos baseados em inferência bayesiana, tais como o software STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) ou por análises de componentes principais (PCA) (PRICE et al., 2006). O STRUCTURE utiliza informações de marcadores não ligados ou fracamente ligados para inferir de maneira iterativa sobre o número de populações mais provável (PRITCHARD et al., 2000). O método baseado em componentes principais por sua

vez, possibilita contemplar, em poucos componentes, a variação existente do conjunto de marcadores e assim inferir sobre a formação de diferentes populações de indivíduos relacionados (PRICE et al., 2006). Após a estimativa da estrutura de população, esta é ajustada ao modelo de associação como efeito fixo.

Além da estrutura de população, o controle de falsos positivos também pode ser realizado pela incorporação da matriz de relacionamento dos indivíduos ou *Kinship*. O coeficiente *kinship* é baseado na probabilidade de identidade de alelos de dois locos homólogos tomados ao acaso entre dois indivíduos (HARDY; VEKEMANS, 2006). A matriz *kinship* é incorporada como covariável de efeito aleatório e resultará em um modelo unificado misto (UMML - *Unified Mixed Model*) (YU et al., 2006; ZHAO et al., 2007).

A *Kinship* pode ser estimada de diferentes maneiras, variando conforme o tipo de dados genotípicos utilizados. A principal metodologia para estimativa da matriz *kinship* a partir de informações de marcadores dominantes foi desenvolvida por Hardy (2003). É uma estimativa considerada robusta e exige o conhecimento prévio do coeficiente de endogamia.

Yu et al. (2006), propôs a utilização de marcadores aleatórios para estimar as matrizes que representam a estrutura populacional (Q) e os coeficientes de parentesco (K) da população, constituindo o modelo (Q + K). O modelo Q + K foi usado em muitos estudos de mapeamento associativo e permitiu a detecção de QTL's em humanos, animais e plantas (ZHAO et al., 2007; PRICE et al., 2010; ZHANG et al., 2010; WANG et al., 2012). Na maioria dos casos o uso do modelo Q + K apresenta um melhor ajuste dos dados quando comparado a outros modelos (YU et al., 2006).

Os principais modelos matemáticos utilizados em estudos de associação estão descritos na Tabela 1.

A escolha do melhor modelo irá depender da presença da estrutura de população, e de sua relação com a característica de interesse. Muitos pesquisadores têm utilizado vários modelos para a identificação daquele que apresenta o melhor ajuste para os dados, reduzindo o número de falsos-positivos sem comprometer verdadeiras associações (YU et al., 2006; LI et al., 2012; WANG et al., 2012; DADRAS et al., 2014; FENG et al., 2014).

Tabela 1 – Modelos matemáticos mais utilizados em estudos de associação

Modelo	Descrição	Expressão Matemática
<i>Naive</i>	Modelo de regressão, sem correção de estrutura de população, simples teste de associação F ou (Kruskal-Wallis)	$y = X\beta + \varepsilon$
Q	Modelo de regressão, estrutura de população inferida como cofator por meio critério baysiano.	$y = X\beta + Qv + \varepsilon$
K	Modelo Misto, kinship contabilizada, sem estrutura de população inferida como cofator	$y = X\beta + Zu + \varepsilon$
Q+K	Modelo Misto, Kinship contabilizada, com estrutura de população inferida como cofator	$y = X\beta + Zu + \varepsilon$ ou $y = X\beta + Qv + Zu + \varepsilon$
P	Modelo de regressão, estrutura de população inferida por meio de análise de componentes principais (PCA)	$y = X\beta + Pv + \varepsilon$
P+K	Modelo Misto, contemplando a estrutura de população por PCA e a matriz <i>kinship</i>	$y = X\beta + Zu + \varepsilon$ ou $y = X\beta + Pv + Zu + \varepsilon$

Em que: y é o valor do fenótipo; β no modelo “*Naive*” contém apenas o vetor de efeito fixo dos marcadores, enquanto que no modelo Q e P, contém a informação dos marcadores e a estrutura de população; v é o vetor de efeito fixo da estrutura de população; u é o vetor efeito aleatório do relacionamento dos indivíduos ou *Kinship*; X , Q , P e Z , são matrizes de incidência dos efeitos explicados nos vetores; ε : é o efeito residual.

Fonte: Adaptado de Yu et al. (2006); Zhao et al. (2007); Coan, (2017, no prelo)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTOS À CAMPO

Foram realizados dois experimentos à campo, instalados na fazenda experimental da Universidade Estadual de Maringá – UEM (23°25'S; 51°57'O), no distrito de Iguatemi, em Maringá (PR). O primeiro experimento foi realizado na época de safra no ano 2014/2015 enquanto o segundo foi realizado na época de segunda safra no ano de 2015.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com duas repetições. As unidades experimentais consistiram em duas linhas com 6 m de comprimento, espaçamento entre linhas de 0,9 m, e espaçamento entre plantas de 0,2 m. O manejo e a adubação foram iguais para os dois experimentos e realizados de acordo com a recomendação técnica para a cultura do milho.

Foram caracterizadas quanto a resistência a ferrugem polissora, 145 linhagens de milho provenientes de vários centros de origem, e oriundos do banco de germoplasma de milho da UEM (Apêndices A e B). O painel de fenotipagem contemplou 77 linhagens de milho comum e 68 de milho-pipoca. A utilização de linhagens de diferentes origens tem o intuito de diminuir o grau de estrutura genética, diminuindo assim a quantidade de falsos positivos no mapeamento associativo. Além disso, a vasta origem dos materiais tende a maximizar a variabilidade genética e assim a capacidade de identificar materiais contrastantes para resistência à ferrugem polissora.

As sementes foram tratadas com inseticida a base de imidacloprido na dose de 100 mL 100 kg⁻¹ de sementes. O tratamento das sementes foi realizado em sacos plásticos, no qual o produto foi adicionado sobre as sementes, para posterior agitação até a completa cobertura das mesmas, com volume de calda de 500 mL 100 kg⁻¹ de sementes. Após a aplicação do produto, as sementes foram armazenadas em câmara fria e seca até o momento da semeadura.

As semeaduras foram realizadas com a utilização de semeadoras manuais no sistema de plantio direto nos dias 30 de novembro de 2014 e 19 de janeiro de 2015. Não foram realizadas aplicações de fungicidas vinculados as sementes ou durante o ciclo.

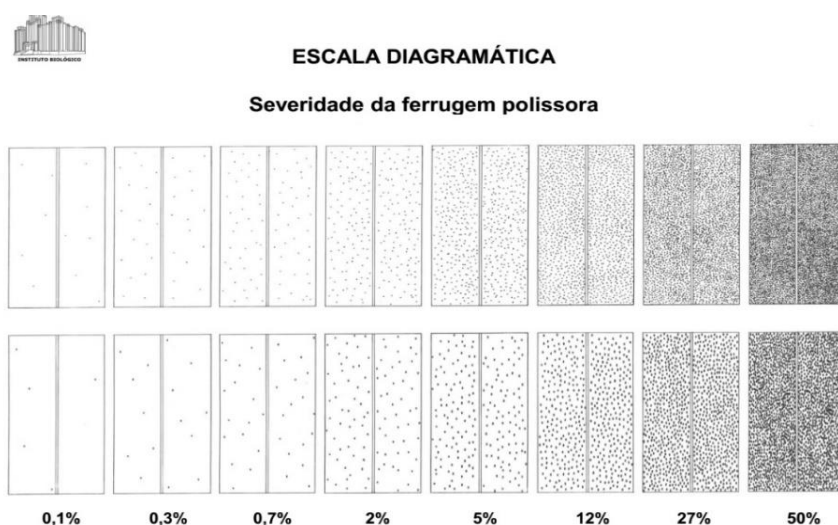
Devido à alta pressão de inóculo de ferrugem polissora desta região durante o período de crescimento vegetativo do milho, não foi necessária a realização de inoculação das plantas com *Puccinia polysora*. O genótipo IAC 112, previamente identificado como altamente suscetível, foi cultivado nas bordaduras a fim de garantir a alta dispersão do patógeno na área experimental.

Os dados climatológicos de precipitação e temperaturas máxima e mínima mensais foram obtidos da Estação Meteorológica da Fazenda Experimental Iguatemi.

3.1.1 Avaliação Fenotípica

Foi realizada uma avaliação de incidência (presença ou ausência da doença) e severidade (percentual da folha com sintomas ou sinais) de ferrugem polissora quando as plantas se encontravam no estágio fenológico de VT conforme escala proposta por Ritchie et al. (1993). A avaliação foi realizada em folhas de cinco plantas escolhidas ao acaso em cada parcela. Para o auxílio na avaliação foi utilizada como referencial a escala diagramática de severidade da ferrugem polissora proposta por Fantin (1997) (Figura 2).

Figura 2 - Escala diagramática de severidade de ferrugem polissora (*Puccinia polysora*) em milho.



Fonte: Fantin (1997)

Com base no referencial proposto pela escala, nove notas variando de 1 a 9 foram atribuídas (Tabela 2).

Tabela 2 – Notas de severidade em relação a escala diagramática de Fantin (1997), para diferentes níveis de severidade.

Nota	Severidade (%)
1	0
2	0,1 -- 0,3
3	0,3 -- 0,7
4	0,7 -- 2,0
5	2,0 -- 5,0
6	5,0 -- 12
7	12 -- 27
8	27 -- 50
9	50 -- 100

Fonte: O próprio autor

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Aproximadamente 30 dias após a emergência foram coletadas em *bulk*, folhas de cinco plantas de cada parcela. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra-freezer a -80 ° C até o momento da extração do DNA.

Para o processo de extração foram utilizados aproximadamente 300 mg de tecido foliar. O tecido foi macerado em cadinho de porcelana contendo nitrogênio líquido. A extração foi realizada utilizando tampão contendo Tris-HCl 1M; NaCl 5M; EDTA 0,5M; CTAB 5% e β -mercaptoetanol (DOYLE; DOYLE, 1990) (Tabela 3).

Inicialmente, 700 μ L do tampão, previamente aquecido a 65 °C, foram adicionados às amostras em tubos de 2 mL e então mantidos em banho maria a 65°C durante 60 minutos, com suaves agitações a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo de 2 mL no qual foi adicionado 1 mL de clorofórmio. Após 5 minutos de agitação por suaves inversões as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8.000 rpm.

Tabela 3 – Tampão de extração de DNA

Reagentes	Volume para 100 mL
CTAB 5%	2 g
Tris HCl 1M pH 8,3	10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	4 mL
NaCl	8,2 g
Água	Completar volume
β -Mercaptoetanol*	200 μ L

*Adicionado somente no momento do uso

Fonte: O próprio autor

O sobrenadante (700 μ L) foi retirado e transferido para um tubo de 1,5 mL juntamente com 700 μ L de isopropanol a -20 °C. As amostras foram agitadas por 5 minutos e então mantidas a -20 °C por 2 horas para precipitação do DNA. Após uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos, verificou-se a formação de um *pellet*. O sobrenadante foi suavemente descartado e o *pellet* foi lavado com 500 μ L de etanol 70%. Após a lavagem, o *pellet* foi secado e ressuspendido em 60 μ L de tampão TE. Visando eliminar o RNA, as amostras foram tratadas com 0,1 μ L de RNase (110 ng μ L⁻¹) por 30 minutos a 37 °C.

A qualidade e integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Apêndice C). A quantificação do DNA foi realizada com a utilização do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). O DNA foi então diluído para uma concentração de 100 ng μ L⁻¹ para a utilização nas reações de AFLP.

3.3 REAÇÕES AFLP

As reações AFLP foram realizadas conforme Vos et al. (1995), com algumas modificações. Inicialmente, na etapa de restrição, aproximadamente 1000 ng de DNA de cada amostra foram duplamente digeridos pelas enzimas *Eco*R1 (5U) e *Mse*I (1U) por 18 horas a 37 °C.

Em seguida, 20 μ L contendo os fragmentos gerados a partir da clivagem foram ligados aos adaptadores, *Eco*RI e *Mse*I. Para essa reação foram utilizados os adaptadores *Eco*RI 0,5 μ M e *Mse*I 5,0 μ M, a enzima T4 DNA ligase 1U, tampão T4 DNA ligase 1X, NaCl 0,05 M, BSA 50 ng μ L⁻¹, DTT 0,25 mM e água ultrapura para um volume final de 10 μ L. A reação foi então incubada a 37 °C por 3

horas, 17 °C por 30 minutos e 70 °C por 10 minutos, no termociclador. A seguir, 25 µL da reação restrição-ligação contendo os fragmentos ligados aos adaptadores foi diluída em 100 µL de água ultrapura.

Os fragmentos digeridos e ligados aos adaptadores foram submetidos a uma etapa de amplificação pré-seletiva com um par de *primers* contendo uma base seletiva. A amplificação pré-seletiva foi realizada para um volume final de 10 µL, utilizando 3.5 µL do kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); primer pré-seletivo 4.75 µM; e 3.0 µL da diluição da reação de ligação.

A amplificação pré-seletiva foi realizada para maior especificidade dos fragmentos, utilizando 3,5 µL do kit GoTaq® *Green Master mix* (Promega, USA), 0,58 µL de *primer* pré-seletivo 4,75 µM, 3,0 µL da diluição da reação de restrição-ligação e água ultrapura para um volume de 10 µL. O programa de amplificação pré-seletiva foi: 1 ciclo 72 °C por 2 min, 20 ciclos de 90 °C por 1 seg, 56 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60 °C por 30 min. Em seguida, um volume de 5 µL da reação pré-seletiva foi diluído em 20 µL de água ultrapura.

Finalmente, para as reações de amplificação seletiva foram utilizados de 0.54 µL de cada primer seletivo de *Msel* 5µM e *EcoRI* 1µM; 3.5 µL de GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); e 2,5 µL do DNA pré-amplificado diluído, completando o volume da reação para 10 µL com água ultrapura.

Para a amplificação seletiva, foram testadas inicialmente em uma amostra composta por oito genótipos, seis combinações de *primers EcoRI* – NNN + *Msel* – NNN (Tabela 4) marcados com quatro diferentes fluoróforos FAM, PET, NED e VIC respectivamente nas cores azul, vermelho e amarelo e verde, possibilitando assim a leitura do tamanho do fragmento em eletroforese capilar em sistema automatizado.

Tabela 4 – Combinações de *primers EcoRI/Msel* testadas na amplificação seletiva.

Combinação	Primer EcoRI	Primer Msel	Fluoróforo
Combinação 1	E-ACG	M-CAG	NED
Combinação 2	E-AGC	M-CAG	PET
Combinação 3	E-ACT	M-CTG	VIC
Combinação 4	E-ACT	M-CTAG	VIC
Combinação 5	E-ACC	M-CTAG	NED
Combinação 6	E-AAG	M-CTG	FAM

Fonte: O próprio autor

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador com ciclo de 2 minutos a 94 °C; 30 segundos a 65 °C e 2 minutos a 72 °C; 8 ciclos de 1 segundo a 94 °C, 30 segundos a 64 °C e 2 minutos a 72 °C, decrescendo 1 °C a cada ciclo; 23 ciclos de 1 segundo a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e 2 minutos a 72 °C; e por fim, 30 minutos a 60 °C. O produto final das amplificações com as seis combinações de *primers* foi avaliada em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata conforme Creste et al. (2001).

Das seis combinações de *primers* testadas, quatro foram selecionadas para a genotipagem do painel contendo as 145 linhagens. As combinações escolhidas com base no polimorfismo observado no gel de poliacrilamida foram: E-ACG/M-CAG, E-AGC/M-CAG, E-ACT/M-CTG, e E-AAG/M-CTG. O produto da amplificação seletiva utilizando estas quatro combinações de *primers* foi então submetido a eletroforese capilar em sistema automatizado.

3.3.1 Preparo das Amostras para Eletroforese Capilar em Sistema Automatizado

Para a resolução dos produtos de PCR obtidos pela amplificação seletiva, preparou-se um *mix* contendo 2 µL de água ultrapura e 2 µL de cada um dos produtos de amplificação realizadas com os diferentes pares de *primers* (FAM, PET, VIC e NED), totalizando um volume final de 10 µL. Desse *mix*, 1 µL foi homogeneizado com 0.2 µL de *size standard* 600-LIZ (GeneScan v2.0) e 8.8 µL de formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems). Em seguida, a mistura foi desnaturada a 94 °C por três minutos e então submetida à eletroforese capilar pelo sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems). O resultado da eletroforese capilar foi analisado pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems) e resultou em uma matriz binária considerando presença ou ausência de determinado fragmento.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

3.4.1 Análise dos Dados Fenotípicos

Para a análise estatística dos dados fenotípicos de severidade de ferrugem polissora, inicialmente as pressuposições da análise de variância foram examinadas por meio de testes de homogeneidade de variâncias e de normalidade

dos resíduos. Foi verificada ausência de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância e também não foi verificada homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett a 5% de significância. Os dados foram então transformados conforme a expressão: $y = \sqrt{x + 0.5}$, onde y é o valor transformado e x é o valor da severidade.

Os dados dos experimentos de safra e segunda safra foram analisados em conjunto pela análise de variância (ANAVA) a 5% de significância pelo teste F, utilizado o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + R/E_{jk} + E_j + GE_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} é o valor da variável Y no bloco K^{th} do genótipo I^{th} no ambiente J^{th} ;

μ é a média geral;

G_i é o efeito aleatório do I^{th} genótipo;

E_j é o efeito fixo do ambiente J^{th} ;

GE_{ij} é o efeito aleatório da interação do I^{th} genótipo com o J^{th} ambiente;

R/E_{jk} é o efeito aleatório do do bloco K^{th} dentro do ambiente J^{th} ; e

ε_{ijk} é o efeito aleatório do erro associado a observação Y_{ijk} .

A Análise de variância, bem como os parâmetros genotípicos e ambientais de herdabilidade no sentido amplo (h^2), componentes da variância genotípica (σ^2_g) e da interação G x A (σ^2_{ge}), variância residual (σ^2_e), correlação intraclasses, coeficiente de variação genético (CV_g), coeficiente de variação ambiental (CV_e) e razão CV_g/CV_e foram obtidos pelo programa GENES (CRUZ, 2006).

3.4.2 Análise dos Dados Genotípicos

3.4.2.1 Estudo de diversidade, estrutura populacional e parentesco

O coeficiente de similaridade de Jaccard foi calculado para estimar as distâncias genéticas entre as linhagens. A matriz de distância gerada foi então

utilizada para a construção de um dendrograma pelo método de agrupamento hierárquico Ward. Ambas as análises foram obtidas pelo pacote *ade4* no software R.

Para a estimativa da estrutura populacional e obtenção da matriz Q foi utilizada modelagem bayesiana pelo software Structure v2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), a partir das informações genotípicas dos marcadores moleculares. Para o cálculo do número de subpopulações foram utilizados os seguintes parâmetros: 11 corridas independentes com K variando de 1 à 10; 50.000 *burn-ins*; 500.000 simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov (MCMC) em modelo assumindo *clusters* mistos (*admixture*) e frequências alélicas correlacionadas.

A determinação do número de K mais provável foi obtida com base nos resultados do software Structure e conforme a metodologia dos valores de Δk proposta por Evanno et al. (2005). Os dados do Structure foram também avaliados pelo software Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012) e os gráficos foram gerados pela interface online Structure Plot 2 (RAMASAMY et al., 2014).

A matriz de parentesco (*kinship*), foi gerada conforme metodologia proposta por Hardy (2003) com auxílio software SPAGEDI (HARDY; VEKEMANS, 2003). Na análise o coeficiente de endogamia foi considerado 0,99.

Os coeficientes *kinship* foram estimados a partir da expressão:

$$F_{ij} = \left(\frac{Q_{ij} - Q_m}{1 - Q_m} \right)$$

Onde:

F_{ij} é o coeficiente de *kinship* de coancestria genética entre *i* e *j*;

Q_{ij} é a probabilidade de as amostragens aleatórias de *i* e *j* serem idênticas por ascendência e;

Q_m é a probabilidade média de que amostragem aleatória tomada na população seja idêntica por ascendência.

A matriz gerada pelo software SPAGEDI teve sua diagonal multiplicada por dois e os valores negativos foram substituídos por zero.

3.4.3 Estudo de Associação

Para a realização do estudo de associação foram utilizados quatro modelos: (i) *naive* - sem controle da estrutura de população e do grau de parentesco, (ii) GLM – utilizando a matriz dos coeficientes da estrutura de população (Q) obtidos pelo programa Structure, e os modelos mistos (iii) MLM – utilizando a matriz *kinship* (K) para controle do parentesco e (iv) MLM - utilizando a matriz Q e a matriz K. A estrutura populacional foi considerada sempre como efeito fixo, enquanto a matriz *kinship* foi utilizada para estimar a estrutura de variância e covariância do efeito individual aleatório (YU et al., 2006; ZHANG et al., 2010).

Os modelos utilizados e suas respectivas expressões matemáticas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Expressões matemáticas dos modelos utilizados para o estudo de associação.

Modelo	Expressão Matemática
GLM: G + P "Naive"	$y = X\beta + \varepsilon$
GLM: G + P+Q	$y = X\beta + Qv + \varepsilon$
MLM: G + P + K	$y = X\beta + Zu + \varepsilon$
MLM: G + P+Q+ K	$y = X\beta + Zu + \varepsilon$ ou $y = X\beta + Qv + Zu + \varepsilon$

Onde: Em que: y é o valor do fenótipo; β e v são os efeitos fixos dos marcadores e da estrutura de população respectivamente, u é o efeito aleatório da *kinship*, X , Q e Z , são matrizes de incidência relacionadas a β , v e u efeitos explicados nos vetores; ε : é o efeito residual.

Fonte: O próprio autor

É importante ressaltar que optou-se pelo controle da estrutura de população por meio da matriz Q do Structure pois a partir da análise de

componentes principais não foi possível agrupar de maneira eficiente as linhagens de acordo com a estrutura populacional (Apêndice D).

Os marcadores com frequência menor que 5% e maior que 95% foram removidos da análise visando reduzir a chance de identificação de falsos positivos devido à presença de marcadores raros.

A significância da associação foi verificada pelo teste de Bonferroni (0,05 / número de hipóteses), considerado altamente conservativo e rigoroso, e considerando um limiar de corte moderadamente restritivo (1 / número de hipóteses) (WANG et al., 2012). Optou-se pela utilização dos dois testes devido ao limitado número de genótipos testados e pela menor saturação do AFLP quando comparada a genotipagem por GBS. Além disso, devido ao alto rigor do teste de Bonferroni vários autores têm proposto e utilizado metodologias alternativas que diminuem o limiar estatístico visando obter maior número de associações (JOHNSON et al., 2010; LU et al., 2010; WANG et al., 2012).

Todas as análises de associação foram realizadas por meio do software TASSEL 5.2 (BRADBURY et al., 2007). Para os MLM foi utilizado o método P3D.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEVERIDADE DE FERRUGEM POLISSORA

Pela análise de variância da severidade, observou-se efeito significativo de linhagens, safras e interação linhagens x safras (Tabela 6). Esse resultado permite inferir sobre existência de variabilidade no painel de fenotipagem para a resistência à ferrugem polissora e possibilita a identificação de linhagens com diferentes níveis de resistência. Essa variabilidade é de extrema importância para estudos de associação genômica, uma vez que, esses dependem da existência de uma ampla diversidade genética para o caráter a ser estudado (ABDURAKHMANOV; ABDUKARIMOV, 2008).

Tabela 6 – Análise de variância para o percentual da severidade transformado de ferrugem polissora e parâmetros genéticos e ambientais de 145 linhagens de milho, em duas safras agrícolas (2014 e 2014/2015).

FV	GL	SQ	QM	F	P
Blocos/Safras	2	0.283	0.141		
Linhagens (L) **	144		234.284	1.627	5.941
Safras (S)	1	164.147	164.147	170.787	**
L x S	144	118.188	0.820	2.997	**
Erro	288	78.866	0.273		
Média	3.35				
Média Safra	0.96				
Média Segunda Safra	5.11				
CV(%)	33.04				
Componente de variância genotípica (σ^2_g)			0.3382		
Componente de variância G x A (σ^2_{ge})			0.1367		
Variância residual (σ^2_e)			0.2738		
Herdabilidade no sentido amplo (h^2)			83.168		
Correlação intraclasse (%)			55.263		
Coeficiente de variação genético (CV_g)			36.726		
Coeficiente de variação ambiental (CV_e)			33.04		
Razão CV_g/CV_e			1.111		

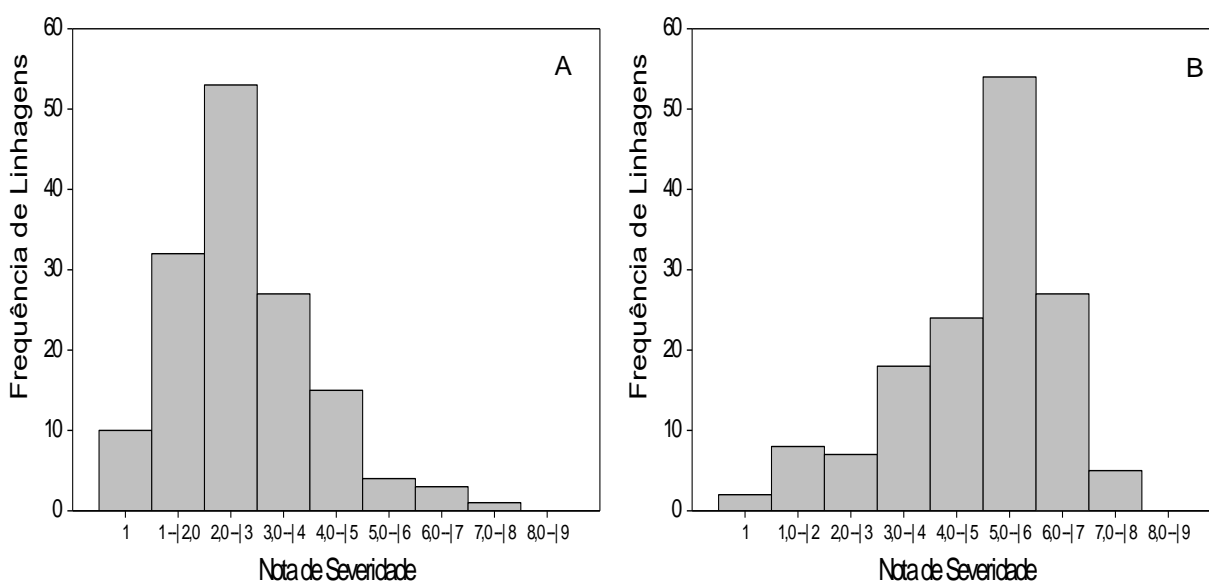
Fonte: O próprio autor

O efeito significativo de ambiente demonstra que a severidade de ferrugem polissora foi maior na segunda safra em relação a primeira. Na primeira

safra a severidade foi de 0,96%, enquanto na segunda a severidade chegou a 5,11% (Tabela 6).

As distribuições de frequência das notas de severidade (Figura 3A e 3B) estabelecidas de acordo com a escala diagramática proposta por Fantin et al. (1996) confirmam a variabilidade no painel de fenotipagem para a resistência a ferrugem polissora. É possível perceber também que os dados obtidos pelas notas apresentaram comportamento assimétrico, diferenciando-se do comportamento normal. No experimento de safra (Figura 3A) percebe-se uma tendência de assimetria a esquerda, enquanto no experimento conduzido na segunda safra (Figura 3B) a assimetria foi a direita.

Figura 3 – Distribuição de frequência das notas de severidade de linhagens de milho a ferrugem polissora (*Puccinia polysora*) no experimento de safra – 2014 (A) e segunda safra – 2014/2015 (B).



Fonte: O próprio autor

Percebe-se também uma grande diferença na distribuição de frequência das linhagens para cada umas épocas de cultivo (Figuras 3A e 3B). No experimento de safra, dentre as 145 linhagens avaliadas, dez não apresentaram incidência da doença, recebendo nota um. A classe 1 --| 2 foi composta por 32 linhagens, enquanto a classe que apresentou a maior frequência foi a 2 --| 3, que concentrou 53 linhagens. Para 3 --| 4 e 4 --| 5 a frequências foram de 27 e 15, respectivamente. Poucas linhagens apresentaram alta severidade de ferrugem polissora no experimento de safra, sendo que as frequências de linhagens com

notas de 5 --| 6, 6 --| 7 e 7 --| 8 foram respectivamente quatro, três e um. Além disso, nenhuma linhagem possuiu média da nota de severidade superior a 8. Isso demonstra que, no experimento conduzido na safra, apesar da alta incidência de *P. polysora*, a severidade não foi tão elevada.

Para o experimento de segunda safra, apenas duas linhagens, “A2560-65H23.3-176” e “A2560-62H23.2-167” não apresentaram incidência da doença, possuindo nota igual a um. As frequências das classes 1 --| 2 e 2 --| 3 também foram baixas, apresentando oito e sete linhagens respectivamente, enquanto que para 3 --| 4 e 4 --| 5 o número de foi de 18 e 24 respectivamente. A classe de notas de severidade que apresentou a maior frequência foi a 5 --| 6, com 54 linhagens, seguida pela 6 --| 7 que apresentou 27 linhagens. Apenas cinco linhagens apresentaram notas entre 7 --| 8 e assim como no experimento de safra, nenhuma apresentou nota superior a 8.

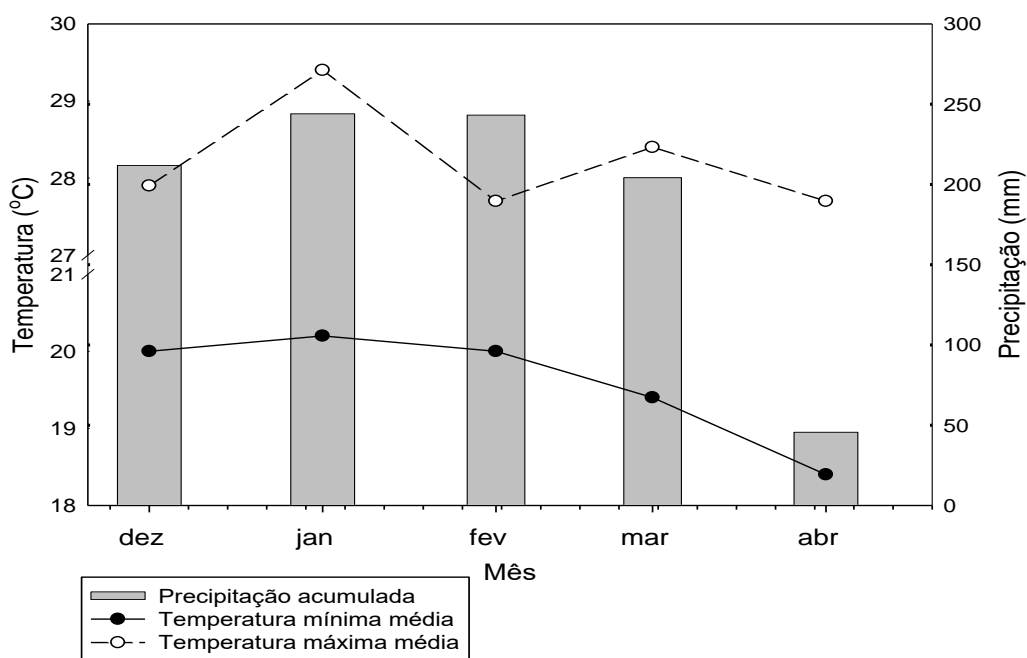
Das 145 linhagens avaliadas, 13 foram classificadas como altamente resistentes, apresentando notas médias dos experimentos de safra e segunda safra, inferiores a dois, são elas: A2560-62H23.2-167, A2560-63H23.2-170, W57, A2560-65H23.3-176, CD303-89H4.2-258, 30F33-69H26.1-188, 30F33-70H23.1-191, CML12, AVANT-14H5.5-24, DKB350-78H30.1-219, CML19, DAS2C599-95H34.4-276, DKB747-42-104A2560-62H23.2-167 (Apêndice E). Dentre essas 13 linhagens, destaca-se a A2560-62H23.2-167 que recebeu nota um (ausência da doença) tanto no experimento de safra quanto no experimento de segunda safra sugerindo essa linhagem como uma potencial fonte de resistência para programas de melhoramento que busquem o desenvolvimento de cultivares resistentes a ferrugem polissora.

Dentre os fatores que podem explicar a maior severidade da doença na segunda safra destacam-se as condições climáticas e também a presença do inóculo na área. A precipitação e as temperaturas máximas e mínimas dos meses de avaliação do experimento de safra (dez - fev) foram superiores às dos meses de condução do experimento de segunda safra (jan - abr) (Figura 4).

É possível que na safra a temperatura tenha sido menos adequada para o desenvolvimento do patógeno do que na safra, ultrapassando as temperaturas de 25 °C, descritas na literatura como ótimas para a maior manifestação da doença (MELCHING, 1975; HOLLIER; KING, 1985; RAID et al., 1988; GODOY et al., 1999).

Segundo Godoy et al. (2003) semeaduras tardias costumam apresentar maior presença de inóculo, a qual, quando associada a condições climáticas favoráveis pode levar a altas epidemias de *P. polysora*. Raid et al. (1988) em estudos conduzidos nos Estados Unidos sugeriu a temperatura como um fator mais limitante a ocorrência de epidemias de *P. polysora* do que a umidade.

Figura 4 – Valores médios mensais de temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C) e precipitação acumulada durante o período de avaliação dos experimentos de safra (2014/2015) e segunda safra (2015).



Fonte: O próprio autor

Kurosawa et al. (2016) avaliando 37 linhagens de milho-pipoca, em experimentos a campo e sobre condições de inoculação natural, também verificou maiores médias de severidade na segunda safra. Shioga et al. (2015), atribuíram a alta severidade de ferrugem polissora nessa época de cultivo, ao fato de que, as áreas normalmente já contam com a presença do inóculo, seja pela reincidência da cultura do milho na área em um intervalo de tempo curto ou pela dispersão do inóculo proveniente de outras áreas. Além disso, os mesmos autores relataram que a ferrugem polissora, por requerer temperatura e umidade relativa do ar elevadas, tende a ter sua incidência e severidade maiores nas semeaduras iniciais do milho na época da segunda safra. Assim, condições climáticas favoráveis associadas à

utilização de cultivares suscetíveis são condições ideais para a ocorrência de epidemias na segunda safra.

Mesmo quando se comparam experimentos conduzidos na mesma safra, diferentes datas de semeadura podem resultar em níveis de severidade bastante diferentes. Juliatti e Souza (2005) encontraram maior severidade de ferrugem polissora no mês de fevereiro em relação ao mês de março, mostrando que o planejamento da data de semeadura é importante para evitar períodos no qual o clima favorece de maneira mais intensa o desenvolvimento da doença.

O efeito significativo da interação linhagens x safras demonstra a existência de comportamento diferencial das linhagens em cada uma das safras. A resistência horizontal é um fator capaz de explicar essa interação, pois essa resistência é caracterizada pela ação conjunta de um grande número de genes, cada um com pequeno efeito na expressão do fenótipo. Assim, cada gene sofre a ação ambiental, a qual somada, resulta em um grande efeito sobre o fenótipo (FALCONER, 1996).

Mafra (2016) em um experimento de dialelo circulante entre 16 linhagens de milho-pipoca também encontrou interação significativa entre genótipos e época de cultivo, demonstrando a importância da interação genótipo x ambiente para a resistência do milho a ferrugem polissora.

Os parâmetros genéticos e ambientais associados a reação das linhagens à ferrugem polissora foram estimados visando inferir sobre a variabilidade genética e prever a magnitude dos ganhos genéticos em programas de seleção. Foi observado que o componente da variância genotípica foi superior ao da variância ambiental demonstrando a ampla variabilidade dos genótipos que podem possivelmente conter diferentes genes e alelos com efeitos sobre a resistência.

A estimativa do coeficiente de variação genético (CV_g) foi de 33,8% (Tabela 6). Este também é um parâmetro importante pois é capaz de auxiliar a definição de estratégias em programas de melhoramento, permitindo comparar a variabilidade genotípica para diferentes variáveis (KUROSAWA et al., 2016). De qualquer forma, para uma melhor interpretação dos resultados, o CV_g deve ser analisado em conjunto com o CV_e por meio da razão CV_g/CV_e . Para este estudo a razão apresentou um quociente igual a 1,11 (Tabela 6), onde valores superiores a 1,0 são considerados bons e sugerem a obtenção de bons ganhos de seleção em programas de melhoramento (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992). Este resultado

favorece a seleção de fontes de resistência para ferrugem polissora a partir do painel de fenotipagem utilizado.

Segundo Shimoya et al. (2002), as estimativas do CV_g são bastante importantes para programas de melhoramento uma vez que são capazes de indicar a amplitude de variação genética de uma característica. Sendo assim, essa estimativa, por estar diretamente correlacionada com a variância genética, permite antecipar a magnitude das mudanças passíveis de serem obtidas por meio de seleção ao longo do programa de melhoramento. Kurosawa et al. (2016) também obteve valores superiores a 1,0 para incidência e severidade de *P. polysora* sobre milho-pipoca em experimentos conduzidos na segunda safra, demonstrando alta variabilidade genética, boa acurácia na identificação e a possibilidade de sucesso na seleção de fontes de resistência.

A estimativa da herdabilidade no sentido amplo (h^2) foi de 83,17% (Tabela 6). Este resultado indica que a resistência a ferrugem polissora pode ser atribuída principalmente a fatores genéticos em relação aos fatores ambientais. Esse resultado corrobora com o descrito por outros autores que observaram herdabilidade de 76 - 82% (WANLAYAPORN et al., 2013), 79 - 86% (HOLLAND et al., 1998) e 93% (JINES et al., 2007). Kurosawa et al. (2016), em experimentos avaliando a severidade de ferrugem polissora na primeira e segunda safra também obteve valores de herdabilidade bastante similares, variando de 72 à 90%.

4.2 ESCOLHA DOS *PRIMERS* PARA AMPLIFICAÇÃO SELETIVA

Para a seleção dos *primers* foram priorizadas as combinações capazes de gerar maior polimorfismo com boa qualidade de amplificação. Para as seis combinações de *primers* *EcoRI* - NNN + *MseI* - NNN testadas (Tabela 4) pode-se observar um bom perfil de amplificação, com alto número de bandas polimórficas.

O padrão de amplificação gerado pelas seis combinações de *primers* em oito amostras foi analisado em gel de poliacrilamida 6% (Apêndice F). Com base no marcador de peso molecular, pode-se perceber a grande amplitude de tamanhos de fragmentos amplificados, decorrente da presença de três tipos de fragmentos gerados na digestão, os fragmentos cortados por enzimas de corte raro nas duas extremidades (*MseI-MseI*), os fragmentos gerados por enzimas de corte frequente

nas duas extremidades (*EcoRI-EcoRI*) e os fragmentos gerados pelo corte das duas enzimas (*MseI-EcoRI*).

Das seis combinações de *primers* testadas, as que apresentaram o menor número de ampliações foram as combinações 4 e 5, que possuíam as sequências E-ACT/M-CTAG e E-ACC/M-CTAG respectivamente. O menor número de fragmentos amplificados por essas duas combinações *primers* pode ser explicado pelo fato de que nas combinações 4 e 5 o *primer MseI* contava com a presença de quatro bases seletivas. A presença de uma base extra resulta em maior especificidade pois o número de fragmentos amplificados é reduzido em aproximadamente quatro vezes, a cada base seletiva adicionada ao *primer* (Vos et al., 1995).

Foram selecionados com base no polimorfismo, um total de quatro combinações de *primers* (E-ACG/M-CAG, E-AGC/M-CAG, E-ACT/M-CTG e E-AAG/M-CTG), que foram utilizadas para a genotipagem das 145 amostras e para os estudos de diversidade e associação. A utilização dessas quatro combinações de *primers* gerou um total de 1008 bandas sendo 975 polimórficas. Das 1008 bandas, 321 foram geradas pela combinação E-AGC/M-CAG, 214 pela combinação AAG/M-CTG, 232 pela combinação E-ACG/M-CAG, e 241 pela combinação E-ACT/M-CTG.

Dentre as combinações utilizadas, três (E-ACG/M-CAG, E-AGC/M-CAG e E-AGG/M-CTG) já haviam sido consideradas altamente polimórficas por Castro et al. (2015), em um estudo de diversidade de 45 linhagens de milho-pipoca para as quais verificaram um total de 906 bandas, das quais 684 foram polimórficas.

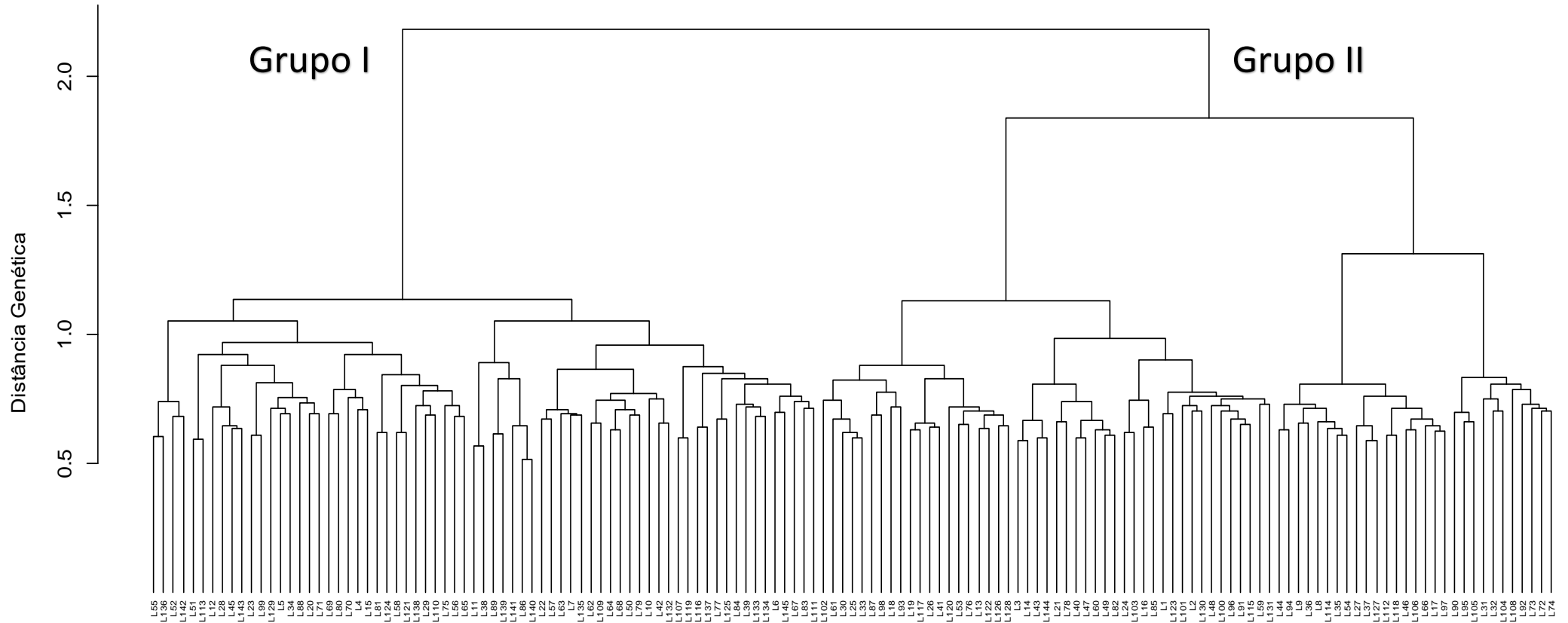
4.3 ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA

Os marcadores AFLP utilizados neste estudo foram eficientes em diferenciar os genótipos, permitindo acessar a variabilidade genética entre os acessos. Segundo Garcia et al. (2004) os marcadores AFLP são eficazes para estudos de diversidade de linhagens de milho tropical, sendo capaz de acessar com alta acurácia o relacionamento genético entre indivíduos.

A dissimilaridade genética estimada com base na informação genotípica dos 1008 marcadores variou de 0,51 a 0,84, com média de 0,74 nas 10440 combinações obtidas. O agrupamento dos genótipos por meio do dendrograma obtido pelo método Ward, foi capaz separar os genótipos, em dois

grandes grupos (I e II) compostos predominantemente por linhagens classificadas como milho comum e como milho-pipoca respectivamente (Figura 5).

Figura 5 – Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 145 linhagens de milho, pelo método Ward, com base no polimorfismo obtido por marcadores moleculares AFLP, utilizando-se a distância generalizada de Jaccard.



Fonte: O próprio autor.

O grupo I foi constituído por 69 linhagens, das quais 68 haviam sido previamente classificadas como milho comum. O grupo II, por sua vez, foi composto por 76 linhagens, dentre as quais 67 previamente classificadas como milho-pipoca (Apêndices 1 e 2).

No grupo II, foi possível observar a formação de dois subgrupos bem definidos (Figura 5). O primeiro subgrupo foi composto por 47 linhagens, todas descritas como milho-pipoca enquanto o segundo subgrupo contou com 29 linhagens, 20 de milho-pipoca e nove de milho comum. Este resultado sugere que as linhagens pertencentes ao este último subgrupo apresentem similaridades genéticas entre milho comum e milho-pipoca.

O agrupamento das linhagens de milho-pipoca nos subgrupos não ocorreu de acordo com a origem dos genótipos. A dificuldade de separar geneticamente as linhagens de milho-pipoca conforme a origem pode ser explicada pela estreita base genética dos bancos de germoplasma de pipoca (ZIEGLER, 2000). Essa base genética restrita tem como principal causa, o histórico de utilização de um pequeno número linhagens de pipoca desenvolvidas a partir de genótipos de milho *Flint* e modificadas por seleção na busca por maximizar a capacidade de expansão e qualidade do grão (KANTETY et al., 1995).

Uma base genética restrita é indesejável em programas de melhoramento de milho-pipoca pois o desenvolvimento de cultivares que explorem altos níveis de heterose exige a identificação de parentais contrastantes (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1988). Amaral Júnior et al. (2011), em estudo utilizando marcadores microssatélites concluíram que os melhoristas brasileiros de pipoca têm utilizado genótipos com estreita diversidade genética em seus programas, demonstrando a importância na maior atenção para a seleção de genótipos mais distintos.

Silva et al. (2009), empregando marcadores microssatélites para analisar a diversidade genética de 25 genótipos de milho-pipoca, relataram que todas as cultivares comerciais brasileiras foram agrupadas juntas pelo método de Tocher, demonstrando a importância da identificação e utilização de novos germoplasmas em programas de melhoramento de pipoca. Segundo Miranda et al. (2008) e Dandolini et al. (2008), o entendimento da variabilidade genética das populações brasileiras de milho-pipoca são essenciais para a exploração dos efeitos aditivos e não aditivos para várias características. Isso indica a necessidade de

maiores estudos da variabilidade das raças brasileiras visando o mais claro entendimento da base genética dos bancos de germoplasmas utilizados nos programas de melhoramento nacionais.

A separação dos genótipos de milho-pipoca em dois subgrupos bem definidos, conforme observado nesse trabalho permite um melhor entendimento da diversidade genética de pipoca do banco de germoplasma da UEM, possibilitando o desenvolvimento de estratégias visando ampliar a base genética das cultivares.

4.4 ESTRUTURA DE POPULAÇÃO

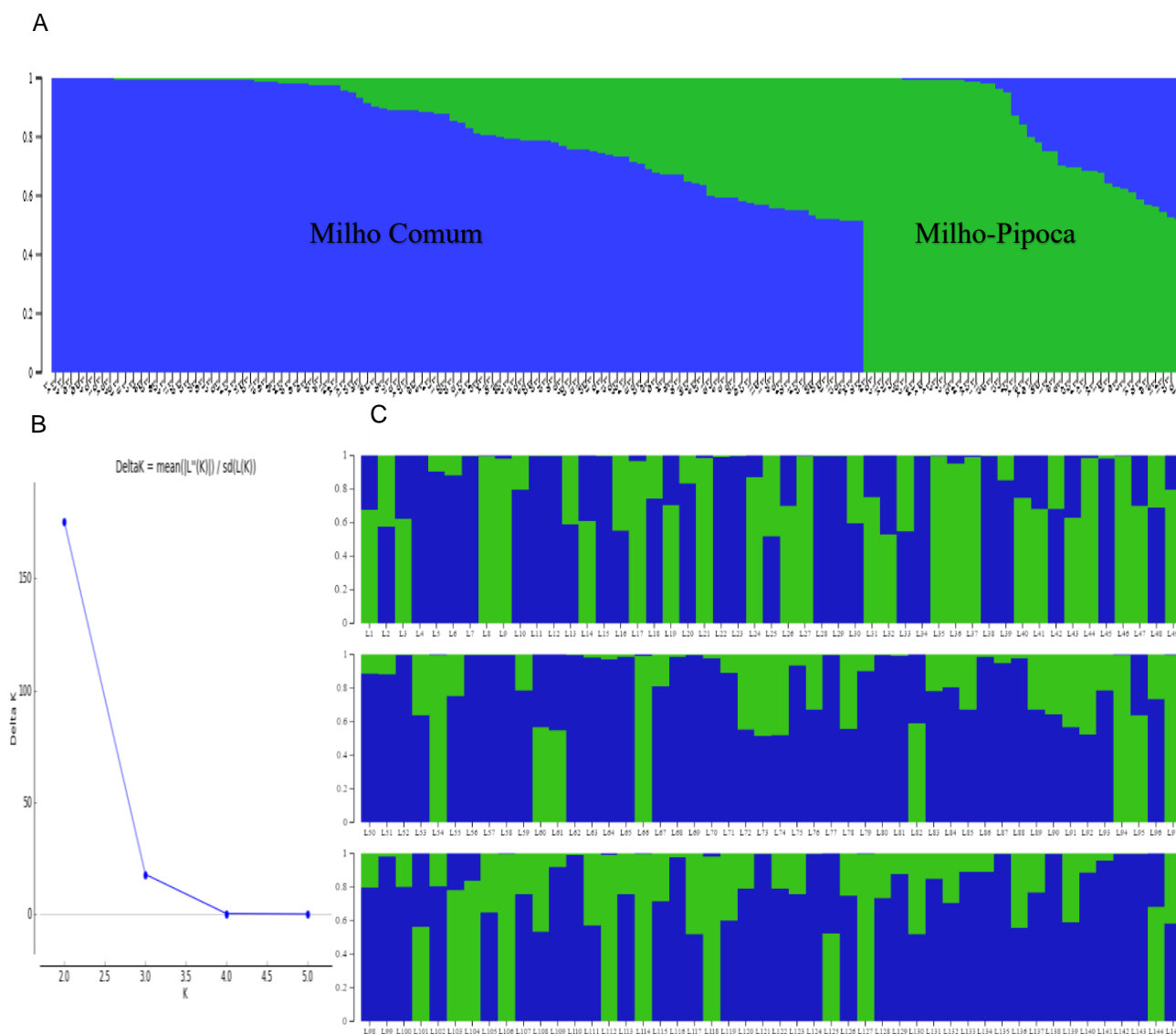
A partir das simulações geradas pelo Structure e de acordo com a metodologia do valor de Δk proposta por Evanno et al, (2005) foi definido que o número ótimo de populações foi de $K=2$ (Figura 6B).

Com base no coeficiente de adesão (*membership*), os genótipos foram classificados em cada um dos *clusters*. Das 145 linhagens avaliadas, 76 foram classificadas como pertencentes ao grupo (I) que contemplou a maioria das linhagens de milho comum. O grupo (II) foi formado por 41 linhagens, envolvendo principalmente as de milho-pipoca. Outras 28 linhagens foram classificadas como *admixture* por possuírem *membership* inferior a 0,7 para ambos os grupos (Figura 6C).

Os *clusters* formados se assemelharam aos agrupamentos obtidos pelo estudo de diversidade utilizando o coeficiente de Jaccard e o agrupamento de Ward, sendo capaz de separar os genótipos em dois grandes grupos, constituídos predominantemente por milho comum (I) ou milho-pipoca (II) (Figura 6A). A classificação de alguns genótipos como *admixture* sugere que estes compartilhem locos comuns ao dois *clusters*.

Compreender a estrutura de população é essencial para os programas de melhoramento. Este tipo de análise tem sido utilizada em estudos de diversidade (LANES et al., 2014; SILVA et al., 2015; BRACCO et al., 2016), na definição de grupos heteróticos (LARIÉPE et al., 2016) e visando eliminar falsas associações em estudos de mapeamento associativo (PRITCHARD et al., 1999; KANG et al., 2008; MEZMOUK et al., 2011).

Figura 6 – Estrutura populacional de 145 linhagens de milho estimada pelo software Structure. A) Formação de dois *clusters* de acordo com o coeficiente de adesão dos genótipos B) Valor de Δk e número ótimo de K, obtido conforme Evanno et al., (2005). C) Coeficiente de adesão de dos genótipos em cada *cluster*. O eixo y representa o coeficiente de adesão (*membership*) dos genótipos nos grupos.



Fonte: O próprio autor

4.5 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

O estudo de associação foi realizado utilizando quatro diferentes modelos matemáticos (Tabela 5). Os modelos MLM e GLM apresentavam diferenças quanto a forma de controle da estrutura populacional e do parentesco entre os genótipos.

Os modelos identificaram diferenças quanto aos marcadores e o número de marcas associadas significativamente a reação do milho à ferrugem polissora pelos testes de Bonferroni ($p < 8,82 \times 10^{-5}$) e por outro teste similar, considerado moderadamente restritivo ($p < 1,76 \times 10^{-3}$) (Tabela 7).

As análises separadas de cada uma das safras, identificaram diferentes marcadores associados. No experimento conduzido na segunda safra foram identificados maior número de associações em relação ao experimento de safra (Tabela 7). Isso pode ter ocorrido devido a maior severidade da doença observada na segunda safra, que pode ter representado melhor a reação das linhagens do milho.

Além disso, a interação QTL x safras também é um fator que pode ter influenciado nas diferenças observadas nas associações de safra e segunda safra. Segunda El-Soda et al. (2014) são inúmeros os fatores que influenciam a interação QTL x ambiente, fazendo com que o interesse pelo entendimento das causas genéticas dessa interação tenham aumentado e sugerindo inclusive o desenvolvimento e utilização de estratégias capazes de incorporar a interação genótipo x ambiente nos modelos utilizados nos estudos de mapeamento.

Neste estudo, conforme o esperado, o maior número de marcadores significativos foi identificado pela utilização do modelo "GLM: G+P", que contemplou informações apenas das matrizes genotípica, gerada por AFLP (G), e fenotípica (P), no modelo também conhecido como *naive*. Para o experimento de safra, esse modelo identificou associações significativas de dois marcadores (EactMctg187, EaagMctg36) enquanto na segunda safra foram quinze associações significativas (EaagMctg4, EagcMcag129, EactMctg18, EactMctg186, EaagMctg90, EactMctg207, EagcMcag117, EaagMctg162, EaagMctg131, EactMctg81, EaagMctg201, EactMctg158, EaagMctg94, EaagMctg148, EaagMctg140).

Tabela 7 – Marcadores associados à reação do milho à ferrugem polissora por quatro modelos estatísticos utilizando marcadores AFLP e fenotipagem realizada em experimentos de safra (2014) e segunda safra (2014/2015).

Safra																
Modelo	GLM: G + P				GLM: G + P+Q				MLM: G + P+ K				MLM: G + P+Q + K			
	Marker	Size	Pvalue	R ²	Marker	Size	Pvalue	R ²	Marker	Size	Pvalue	R ²	Marker	Size	Pvalue	R ²
EactMctg187	346pb	5.71E-05	**	0.107	EactMctg187	346pb	5.42E-05	**	0.109							
EaagMctg36	104pb	0.00134	*	0.071	EaagMctg36	104pb	0.00143	*	0.069							

Segunda Safra																			
Modelo	GLM: G + P				GLM: G + P+Q				MLM: G + P+ K				MLM: G + P+Q + K						
	Marker	Size	Pvalue	R ²	Marker	Size	Pvalue	R ²	Marker	Size	Pvalue	R ²	Marker	Size	Pvalue	R ²			
EaagMctg4	54pb	4.89E-05	**	0.109	EaagMctg117	227pb	1.24E-04	*	0.091	EactMctg18	78pb	6.72E-04	*	0.084	EactMctg205	328pb	6.98E-04	*	0.084
EagcMcag129	197pb	7.48E-05	**	0.104	EactMctg205	328pb	2.91E-04	*	0.081	EactMctg205	328pb	9.10E-04	*	0.081	EactMctg18	78pb	7.66E-04	*	0.082
EactMctg18	78pb	1.40E-04	*	0.097	EactMctg18	78pb	5.39E-04	*	0.074	EactMctg169	293pb	0.00139	*	0.074	EactMctg169	293pb	9.79E-04	*	0.078
EactMctg186	345pb	2.95E-04	*	0.088	EaagMctg4	54pb	7.18E-04	*	0.071										
EaagMctg90	185pb	4.93E-04	*	0.082	EactMctg169	293pb	0.00145	*	0.063										
EactMctg207	393pb	6.97E-04	*	0.078															
EagcMcag117	183pb	8.08E-04	*	0.076															
EaagMctg162	327pb	8.32E-04	*	0.075															
EaagMctg131	247pb	8.74E-04	*	0.075															
EactMctg81	154pb	9.86E-04	*	0.073															
EaagMctg201	412pb	0.0012	*	0.071															
EactMctg158	261pb	0.00146	*	0.069															
EaagMctg94	194pb	0.0015	*	0.068															
EaagMctg148	282pb	0.00169	*	0.067															
EaagMctg140	273pb	0.00171	*	0.067															

GLM: Modelo linear geral. G: Matriz da presença/ausência dos marcadores identificados por AFLP. P: Matriz dos dados fenotípicos Q: Estrutura de população definida por meio do software STRUCTURE. MLM: Modelo linear misto. K: Matriz *kinship* estimada conforme Hardy (2003). **Pvalue significativo conforme teste de Bonferroni. * Pvalue significativo conforme teste moderadamente restritivo.

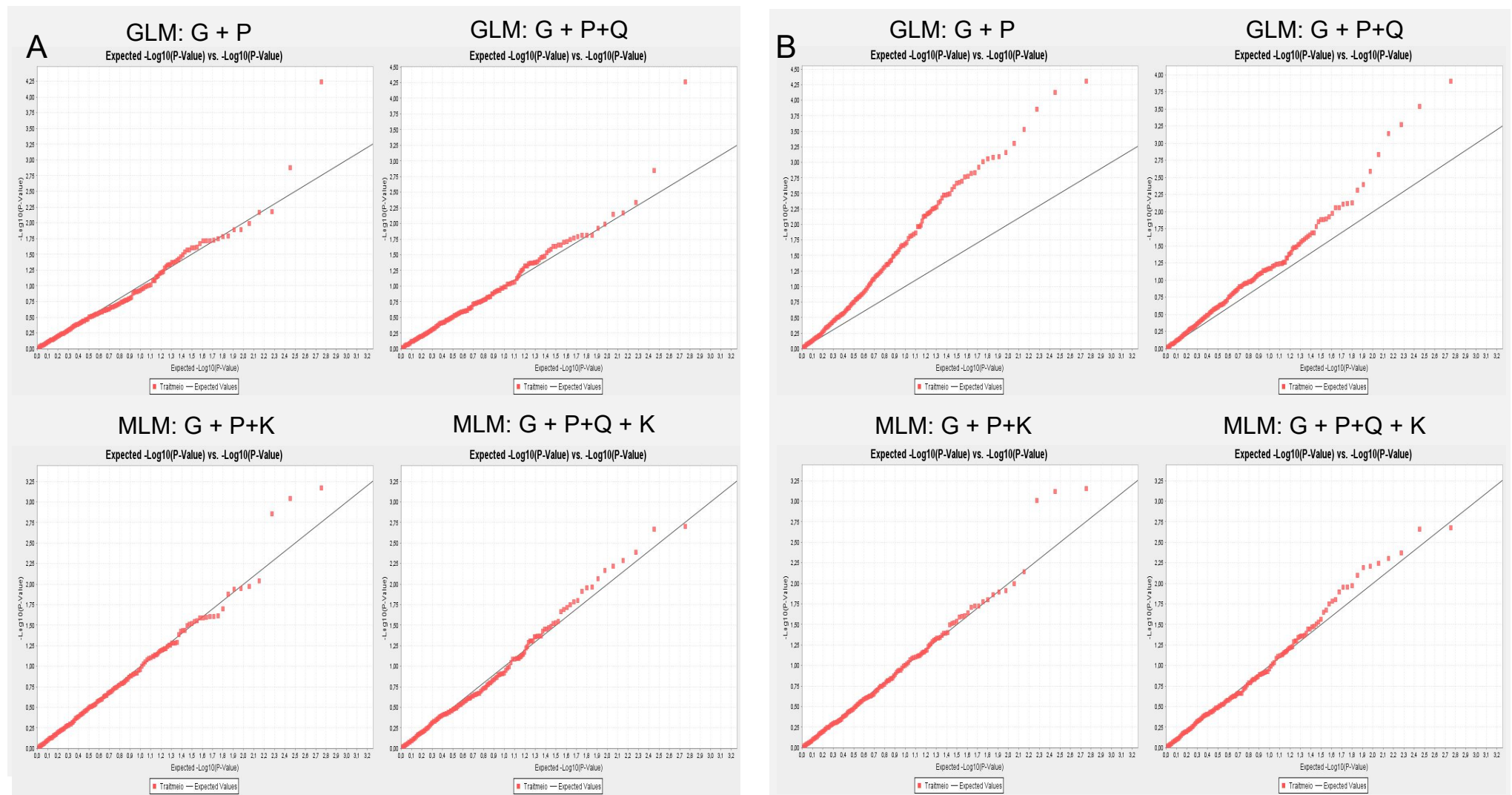
Fonte: o próprio autor

O modelo *naive*, por não levar em conta a presença de estrutura de população, comumente pode levar a um alto número de falsos positivos (PRITCHARD et al., 1999). Além da estrutura de população, o efeito do parentesco (ou relacionamento), estimado pela matriz *Kinship*, quando não contemplado pelo modelo, também pode levar a associações equivocadas (YU et al., 2006). O Q-Q *plot* das associações baseadas no modelo *naive* (Figura 7) demonstram, principalmente para o experimento de segunda safra, que este modelo não foi eficiente no controle de falsas associações, sugerindo a necessidade de controle da estrutura de população e do relacionamento genético.

O primeiro modelo testado que levou em conta algum controle na associação foi o “GLM: G + P+Q”, onde, além das informações fenotípicas e genotípicas, também foi incorporada a matriz de estrutura populacional (Q) gerada pelo STRUCTURE. Este modelo restringiu o número de marcadores associados em relação ao observado pelo modelo *naive*, demonstrando a importância do controle da estrutura populacional e seu potencial na redução de falsas associações. No experimento de safra foram identificados os mesmos dois marcadores obtidos pelo modelo *naive* (EactMctg187, EaagMctg36), enquanto no experimento de segunda safra o controle da estrutura populacional restringiu de quatorze para apenas cinco (EaagMctg117, EactMctg205, EactMctg18, EaagMctg4, EactMctg169) o número de marcadores associados significativamente, dos quais dois (EactMctg205, EactMctg169) não haviam sido observados no primeiro modelo. O Q-Q *plot* do modelo “GLM: G + P+Q” (Figura 7) demonstra a maior adequação deste em relação ao modelo *naive* confirmando o melhor controle de falsos positivos pela menor inflação dos p-valores.

O modelo “MLM: G + P+ K”, que incorporou a matriz *kinship* (K) mas não levou em conta a estrutura populacional, apresentou maior impacto sobre as associações que o observado pelo uso do modelo “GLM: G + P+Q”. Para o experimento de safra não foram observadas associações significativas, enquanto para a segunda safra o número de associações significativas foi de apenas três (EactMctg18, EactMctg205, EactMctg169). O Q-Q *plot* do modelo sugere que a incorporação da matriz K resultou em alto controle da inflação dos p-valores (Figura 7).

Figura 7 – Quantile-Quantile plots do $-\log_{10}$ entre os p-valores observados e esperados das análises de associação utilizando quatro modelos matemáticos nos experimentos de safra (A) e segunda safra (B).



GLM: Modelo linear geral. G: Matriz da presença/ausência dos marcadores identificados por AFLP. Q: Estrutura de população definida por meio do software STRUCTURE. MLM: Modelo linear misto. K: Matriz *kinship* estimada conforme Hardy (2003).

Fonte: O próprio autor

Por fim, foi testado o modelo “MLM: G + P+Q + K”, que incorporou tanto a matriz K quanto a matriz Q. Este modelo é considerado o mais completo e que costuma apresentar a melhor significância de ajuste dos dados no modelo (YU et al., 2006). Para a fenotipagem de safra, o modelo “MLM: G + P+Q + K”, assim como o “MLM: G + P+ K” não apresentou nenhuma associação significativa. Já para os dados de segunda safra, foram encontrados, pelos dois modelos, os mesmos marcadores associados. Os *QQ-plot* de safra e segunda safra, demonstraram o bom ajuste deste modelo ao conjunto de dados, sugerindo sua eficiência no controle da inflação dos p-valores e dos falsos positivos (Figura 7).

Para Achleitner et al. (2008) a diferença entre os modelos demonstra a importância da estrutura de população e a combinação das matrizes Q e K proveem uma redução no coeficiente de determinação e presumem a melhor correção da estrutura de população. Um dos principais inconvenientes da utilização de modelos que utilizem correções por estrutura populacional e relacionamento, é que estes podem reduzir o número de associações verdadeiras considerando-as falsos positivos, e resultando em erros tipo II. Esse fato pode ocorrer principalmente para características fortemente relacionadas com a estrutura de população (LARSSON et al., 2013). Contudo, apesar deste inconveniente, o modelo “MLM: G + P+Q + K”, na maioria dos casos apresenta melhor significância no ajuste dos dados quando comparado aos demais (YU et al., 2006). Em plantas sua utilização se justifica, uma vez que, a grande maioria das populações, apresenta certo nível de estruturação e parentesco entre os seus indivíduos (YU; BUCKLER, 2006; ZHU et al., 2008).

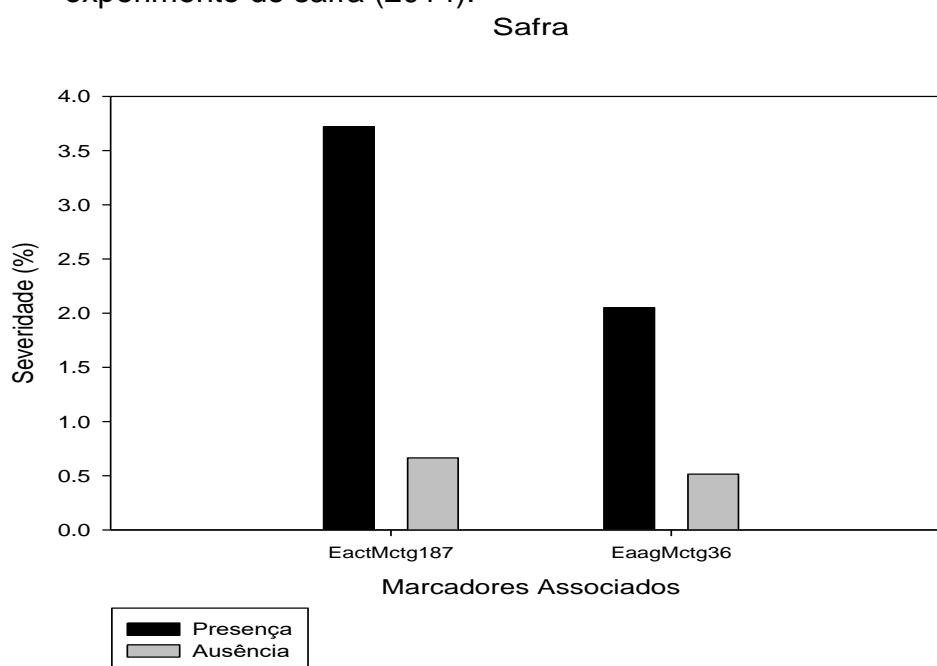
Considerando todos os modelos testados, foi possível identificar 19 marcadores associados significativamente, sendo dois para o experimento de safra e 17 para o experimento de segunda safra. O modelo que melhor se ajustou ao conjunto de dados, considerando a estrutura populacional e o parentesco entre as linhagens (MLM: G + P+Q + K) restringiu o número de marcadores associados para apenas três, todos na segunda safra.

A principal razão para a ausência de associações significativas observada no experimento de safra, é atribuída principalmente à baixa severidade de ferrugem polissora. As condições climáticas não favoreceram a agressividade da doença, o que dificultou sua expressividade e atrapalhou a identificação das associações. No experimento de segunda safra, onde as condições climáticas

favoreceram a manifestação da doença de maneira mais severa, observou-se um maior número de marcadores significativamente associados.

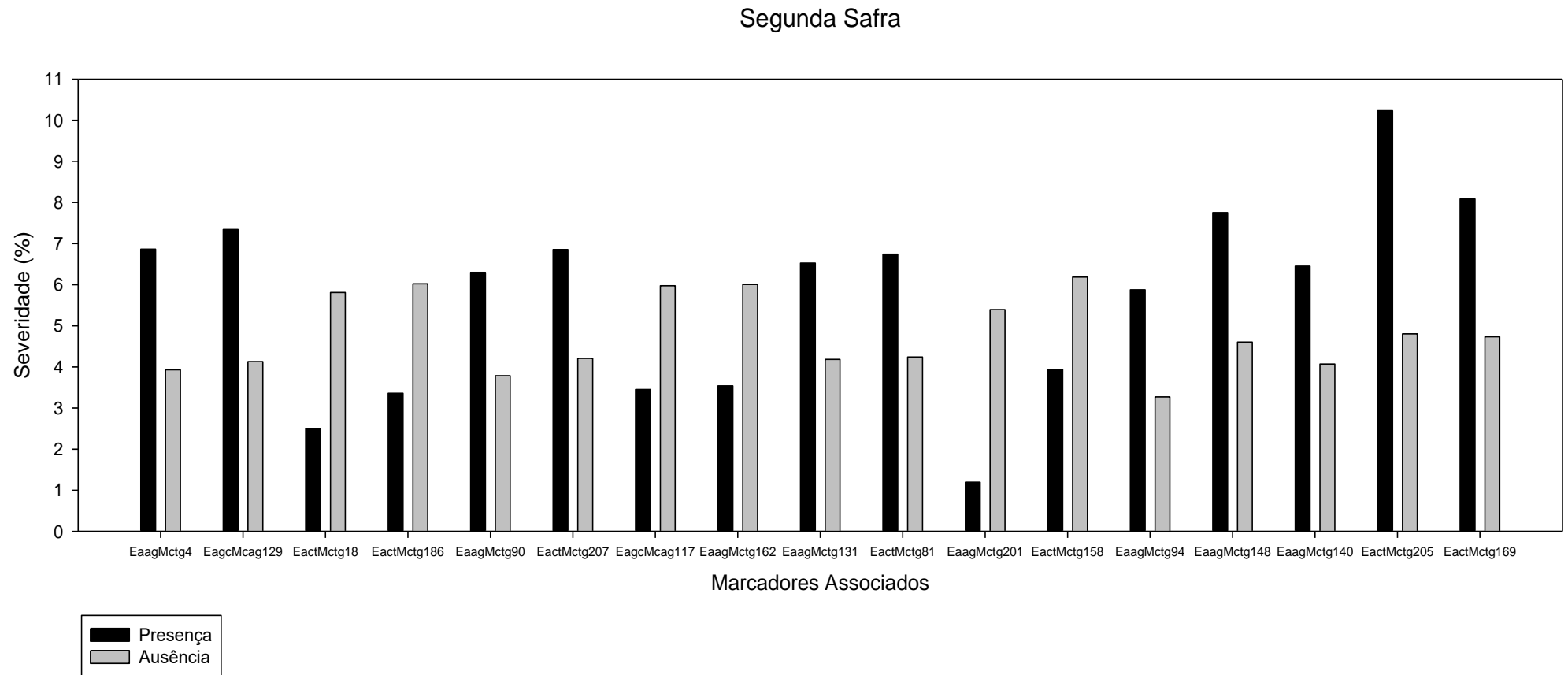
Dentre os 19 marcadores significativos, quando considerados todos os modelos, a maioria (13), esteve associado a susceptibilidade, uma vez que a média da severidade nos genótipos que apresentaram o marcador foi superior à daqueles que não apresentaram (Figura 8 e 9). Desses marcadores, os EactMctg205 (328 bp) e EactMctg169 (293 bp) merecem destaque, uma vez que foram identificados pelo modelo “MLM: G + P+Q + K” e apresentaram os maiores efeitos sobre a susceptibilidade, aumentando a severidade em 5,42 e 3,35% respectivamente (Figura 9).

Figura 8 – Média de severidade de ferrugem polissora dos genótipos de milho na presença e ausência dos marcadores associados significativamente no experimento de safra (2014).



Para resistência à doença, apenas seis marcadores (EactMctg18, EactMctg186, EagcMctg117, EaagMctg162, EaagMctg201, EactMctg158) foram identificados como significativamente associados, uma vez que a severidade nas linhagens que apresentavam as marcas foi inferior à das que não apresentavam. Dentre estes destaca-se o marcador EactMctg18, de aproximadamente 78bp, que obteve significância pelo modelo “MLM: G + P+Q + K” e resultou em 3,31% a menos de severidade (Figura 9).

Figura 9 – Média de severidade de ferrugem polissora dos genótipos de milho na presença e ausência dos marcadores associados significativamente por quatro modelos matemáticos no experimento de segunda safra (2014/2015).



Fonte: O próprio autor

Os resultados sugerem que os marcadores EactMctg18, EactMctg205 e EactMctg169 são bons candidatos para estudos mais aprofundados que permitam sua incorporação futura em programas de melhoramento buscando resistência a ferrugem polissora. Contudo é importante ressaltar a necessidade de validação desses marcadores em um número maior de genótipos, e em um maior número de ambientes para a confirmação de suas capacidades de prever os valores fenotípicos (COLLARD et al., 2005). Estudos de validação desses marcadores em outros painéis de genótipos e em diferentes ambientes podem ajudar a entender se o efeito dos QTLs implícitos na associação entre os marcadores e fenótipos são robustos e empregáveis na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento.

É importante frisar também que apesar dos marcadores AFLP serem úteis para o mapeamento, esta é uma técnica considerada bastante laboriosa e por isso inconveniente para a utilização em larga escala em programas de seleção assistida. Assim, a efetiva utilização desses marcadores exige sua conversão em Regiões amplificadas de sequencias caracterizadas (SCAR) ou outros marcadores simples de PCR.

A transformação dos marcadores AFLP em SCAR por meio do sequenciamento das bandas isoladas é importante para a seleção assistida pois estes marcadores são detectados em locos pontualmente definidos, podem ser identificados na forma de bandas em géis de agarose, são fáceis de observar, são menos sensíveis às condições da reação e possuem maior reprodutibilidade, permitindo assim a triagem em larga escala (WEI et al., 2009). Além disso, esse tipo de estratégia também permite a construção de mapas mais saturados das regiões sequenciadas, possibilitando a concreta identificação de QTLs ou genes de resistência no genoma do milho.

Para resistência a doenças Moon e Nicholson (2009) utilizaram quatro marcadores AFLP relacionados com a resistência ao vírus do vira-cabeça em fumo, para a geração de SCAR. Em milho, uma estratégia similar também já foi utilizada com sucesso, onde, após a identificação de marcadores AFLP associados à resistência ao vírus do mosaico da cana (XU et al., 1999) realizou-se a conversão dos mais promissores em marcadores simples de PCR (DUSSLE et al., 2002), facilitando sua utilização na seleção assistida. Agrama et al. (2002), também

converteram marcadores AFLP em SCAR em estudos visando a resistência do milho à *Peronosclerospora sorghi*.

5 CONCLUSÕES

Os marcadores AFLP foram eficientes em acessar a diversidade genética das linhagens, permitindo a formação de dois grupos capazes de reunir as linhagens de milho comum e de milho-pipoca.

O modelo de associação contemplando a estrutura de população e a *kinship* (“MLM: G + P+Q + K”) restringiu o número de associações significativas, reduzindo a chance de obtenção de falsos positivos e demonstrando um bom ajuste ao conjunto de dados.

Três marcadores AFLP (EactMctg18, EactMctg169, EactMctg205) associados a reação do milho à ferrugem polissora foram considerados promissores para estudos mais aprofundados e para validação.

Treze linhagens foram classificadas como altamente resistentes, com destaque para a linhagem A2560-62H23.2-167, que não apresentou incidência da doença nas duas safras.

REFERÊNCIAS

- ABADASSI, J. Maize Agronomic Traits Needed in Tropical Zone. **International Journal of Science, Environment**, v. 4, n. 2, p. 371–392, 2015.
- ABDURAKHMONOV, Y. I.; ABDUKARIMOV, A. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2008, n. 574927, p. 1-18, 2008.
- ACHLEITNER, A.; TINKER, N. A.; ZECHNER E.; BUERTSMAYR H. Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 7, p. 1041–1053, 2008.
- AGRAMA, H. A.; HOUSSIN, S. F.; TAREK, M. A. Cloning of AFLP markers linked to resistance to *Peronosclerospora sorghi* in maize. **Mol Genet Genomic** v. 9, p. 814–819, 2002.
- AITKEN, K. S.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L. Quantitative trait loci identified for in a sugarcane (*Saccharum spp.*) cultivar x *Saccharum officinarum* population. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.112, p.1306-1317, 2006.
- ALZATE-MARIN, A. L., CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, n. 30, p. 333–342, 2005.
- AMARAL JUNIOR, A. T.; OLIVEIRA, E. C.; GONSALVES, L. S. A.; CANDIDO, L. S.; SILVA, T. R. C.; VITORAZZI, C.; SCAPIM, C. A. Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**. v.10, p.15462-15469, 2011.
- ANDRADE, F. A. DE.; GONÇALVES, L. S. A.; MIGLIORANZA, E.; RUAS, C. F.; RUAS, M.; TAKAHASHI, L. S. A. AFLP analysis of genetic diversity in determinate and indeterminate snap bean accessions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 29, 2016.
- ANONI, C. P. **Mapeamento associativo para múltiplos ambientes e múltiplos locos visando tolerância a seca em milho**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2012.
- ARNHOLD, E.; MORA, F.; SILVA, R. G.; GOOD-GOD, P. I. V.; RODOVALHO, M. A. Evaluation of top-cross popcorn hybrids using mixed linear model methodology. **Chilean Journal of Agriculture Research**, v. 69, n. 1, pp. 46-53, 2009.
- BABU, R.; NAIR, S. K.; PRASANNA, B. M.; GUPTA, H. S.; Integrating marker-assisted selection in crop breeding—prospects and challenges. **Curr Sci**. v. 87, n.5, p. 607–619, 2004.

BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. A. **Plantas transgênicas**. 2006. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%20transgenicos>> Acesso em: 21 jul. 2015

BLEARS, M. J.; De GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 99-114, 1998.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.

BOTSTEIN, D. R. L.; WHITE, M. S.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314–31, 1980.

BRACCO, M.; CASCALES, J.; HERNÁNDEZ, J. C.; POGGIO, L.; GOTTLIEB, A. M.; LIA, V. V. Dissecting maize diversity in lowland South America: genetic structure and geographic distribution models. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 186, 2016.

BRADBURY, P. J.; ZHANG, Z.; KROON, D.; CASSTEVEN, T. M.; RAMDOSS, Y.; BUCKLER, E. S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**. n. 23, v.1, p.2633-2635, 2007.

BREWBAKER, J. L.; KIM, S. K.; SO, Y. S.; LOGROÑO, M.; MOON, H. G.; MING, R.; LU, X. W.; JOSUE, A. D. General resistance in maize to southern rust (*Puccinia polysora* Underw.). **Crop Science**. n. 4, v. 51, p. 1393-1409, 2011.

BRUNELLI, K. R.; SILVA, H. P.; CAMARGO, L. E. A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira** v. 27, n. 1977, 2002.

BUCKLER, E. S.; HOLLAND, J. B.; BRADBURY, P.; ACHARYA, C.; BROWN, P. J.; BROWN, C.; ERSOZ, E.; FLINT-GARCIA, S.; GARCIA, A.; YU, J.; ZHANG, Z.; KRESOVICH, S.; MCMULLEN, M. The genetic architecture of maize flowering time. **Science**, v. 325, n. 5941, p. 714-718, 2009.

CAMACHO, L. R. S. **Estudo de associação genômica ampla para resistência parcial à ferrugem polissora em milho**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá. No prelo 2017.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 427–439, 2006.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. Variability in isolates of *Puccinia polysora* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 414-416, 2002.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_83.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2015.

CARLSON, S. C.; NEWMAN, T. L.; NICKERSON, D. A. SNPing in the human genome. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 78-85. 2001.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40 n. 3, p. 735–744, 2010.

CASTRO, V. L. **Aspectos do biomonitoramento da toxicidade perinatal pelos agroquímicos**. 2006 Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Castro_aspectosID-pmTW0iYN1n.pdf> Acesso em: 10 mar 2016.

CASTRO, C. R.; BABA, V. Y.; MATSUZAKI, R. A.; KURODA, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. Análise da diversidade genética entre linhagens de milho-pipoca. In: 8 CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, n. 2015, Goiânia. **Anais...** Goiânia :UFG, 2015. p. 554.

CHEN, C. X.; WANG, Z. L.; YANG, D. E.; YE, C. J.; ZHAO, Y. B.; JIN, D. M.; WENG, M. L.; WANG, B. Molecular tagging and genetic mapping of the disease resistance gene RppQ to southern corn rust. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 108, p. 945-950, 2004.

COAN, M. M. D. **Mapeamento Associativo com genotipagem por sequenciamento para resistência a podridão da espiga por *Fusarium verticillioides* em acessos de milho comum e pipoca**. 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. No prelo.

COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUER, J.; PANG E. C. K.. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n. 1-2, p. 169–196, 2005.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo levantamento**. Brasília: Conab, jul. 2016.

COSTA, D. F.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A.; MOREIRA, L. C. B. Aplicação de fungicidas no controle de doenças foliares na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n. 1, p.98-105, 2012.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; CASELA, C. R. Doenças. In: CRUZ, J. C. **Sistema de produção de milho**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm>. Acesso em: 20 ago. 2015.

COSTA, R. V.; COTA, L. V. **Controle químico de doenças na cultura do milho: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação**. 2009.

Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2009/circular/Circ_125.pdf> Acesso em: 05 ago. 2016.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; PEREIRA, D. F.; ROCHA, L. M. P.; GUIMARAES, L. J. M.; GUIMARAES, P. E.; PARENTONI, S. N.; MACHADO, J. R. A. **Epidemias Severas da Ferrugem Polissora do Milho na Região Sul do Brasil na Safra 2009/2010**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 138). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2010/circular/Circ_138.pdf> Acesso em: 07 jul. 2016.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SABATO, E. O.; SILVA, D. D. **Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 193). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/975363/1/circ193.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n. 1, p. 299-306, 2001.

CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: UFV, p. 384, 2015.

CRUZ, C. D. Programa GENES. **Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG), p. 382, 2006.

CRUZ, J. C.; PEREIRA, FILHO, I. A.; DUARTE, A. P. **Milho segunda safra**. 2014. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fya0krse02wx5ok0pvo4k3mp7ztkf.html>> Acesso em: 10 de maio de 2016.

DADRAS, A. R.; SABOURI, H.; NEJAD, G. M.; SABOURI, A.; SHOAI-DEYLAMI, M. Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 5, p. 3317–3329, 2014.

DAMASCENO, C. M. B.; PASTINA, M. M.; GUIMARAES, P. E. O.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D. **Identificação de Fontes de Resistência à Ferrugem-polissora em Milho e Desenvolvimento de População de Mapeamento**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 13 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 212). Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1038807/1/circ212.pdf>>. Acesso em: 25. jan. 2017.

DANDOLINI, T. S.; SCAPIM, C. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; MOTT, A. S.; LOPES, A. D. Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 313-320, 2008.

DE PAULA, T. O. M.; GONÇALVES, L. S. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T. do.; OLIVEIRA, E. C. de.; SILVA, V. Q. R. da.; SCAPIM, C. A.; LOPES, A. D. Magnitude of the genetic base of commercial popcorn and in recommendation in Brazil. **Crop Breed Appl Biotechnol**, v. 10, n. 4, pp. 289-297, 2010.

DESCHAMPS, S.; LLACA, V.; MAY, G. D. Genotyping-by-Sequencing in Plants. **Biology**, v. 1, n. 3, p. 460–483, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUDIENAS, C.; FANTIN, G. M.; DUARTE, A. P.; TICELLI, M.; BÁRBARO, I. M.; FREITAS, R. S.; LEAO, P. C. L.; FILHO, G. C.; BOLONHEZI, D.; PÂNTANO, A. P. Severidade de ferrugem polissora em cultivares de milho e seu efeito na produtividade. **Summa phytopathol**, Botucatu, v. 99 n. 1 p. 16–23, 2013.

DUSSLE, C. M.; QUINT, M.; XU, M.; MELCHINGER, A.; LUBBERSTEDT, T. Conversion of AFLP fragments tightly linked to SCMV resistance genes SCMV1 and SCMV2 into simple PCR-based markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 8, p. 1190–1195, 2002.

DUVICK, N. D. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). In: SPARKS, D. **Advances in Agronomy**. 1 ed. Ames: Ames State University, 2005. p. 86-106.

EARL, D. A. ; VON HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, vol. 4, n.2, p. 359, 2012.

EL-SODA, M.; MALOSETTI, M.; ZWAAN, B. J.; KORNEFF, M.; ARTS, M. G. M. Genotype x environment interaction QTL mapping in plants: Lessons from Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 390–398, 2014.

FALEIRO, G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

FANTIN, G. M.; SILVA, H. P.; BALMER, E.; MIRANDA FILHO, J. B. de. Herança da resistência à ferrugem causada por *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo v.18, p.332-333, 1993.

FANTIN, G. M. **Avaliação de resistência do milho a ferrugem causada por *Puccinia polysora* UNDERW**. 1997. 136 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464 p.

FENG, L.; CHEN, B.; XU, K.; WU, J.; SONG, W.; BRANCOF, I.; HARPER A. L.; TRICK, M.; LIU, S.; GAO, G.; WANG, N.; YAN, G.; QIAO, J.; LI, J.; LI, H.; XIAO, X.; ZHANG, T.; WU, X.. Genome-Wide Association Study Dissects the Genetic Architecture of Seed Weight and Seed Quality in Rapeseed (*Brassica napus* L .). **DNA Research** n.21, p. 355–367, 2014.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.; BORÉM, A.; & CAIXETA, E. T. (2006). Genética de associação em plantas. **Marcadores Moleculares**. Ed.: UFV, Viçosa, 273-306.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER IV, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review on Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 357-374, 2003.

FREITAS JÚNIOR, S. P.; AMARAL JÚNIOR, A. T. do.; RANGEL, R. M.; VIANA, A. P. Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. **Cookies on CAB Direct**, v. 9, n.1, pp. 1-7, 2009.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 61, n. 1, p. 819–828, 2014.

GALVÃO, J. C. C.; TROGELLO, E.; PEREIRA, L. P. L. Milho Segunda Safra. In: **Milho: do plantio à colheita**. 1 ed. GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. G. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. p.207-223.

GARCIA, A. A. F.; BENCHIMOL, L. L.; BARBOSA, A. M. M.; GERALDI, I. O.; SOUZA, C. L.; SOUZA, A. P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 579–588, 2004.

GARCIA, A. A. F.; KIDO, E. A.; MEZA, A. N.; SOUZA, H. M. B.; PINTO, L. R.; PASTINA, M. M.; LEITE, C. S.; DA SILVA, J. A. G.; ULIAN, E. C. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum spp.*) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 2, p. 298–314, 2006.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SILVA, H.; SILVA, W.; BERGER R. D. Temporal progress of southern rust in maize under different environmental conditions. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1997, p. 273–278, 2003.

GODOY, C.V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Influência da duração do molhamento foliar e da temperatura no desenvolvimento da ferrugem do milho causada por *Puccinia polysora*. **Fitopatologia Brasileira** v.1, n. 24, p. 160-165, 1999.

GONÇALVES, G. B.; PINTO, T. T.; BURG, I.; OLIVEIRA, W. B. S.; SOUZA, R.; OGLIARI, J. B. Diversidade morfológica de variedades crioulas de milho pipoca conservadas por agricultores familiares do oeste catarinense. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, n. 2015, Belém. **Cadernos de agroecologia**. Belém:UFPA, 2015. p. 3.

GONÇALVES, L. S. A.; FREITAS JÚNIOR, S. P.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SCAPIM, C. A.; RODRIGUES, R.; MARINHO, C. D.; PAGLIOSA, E. S. Estimating combining ability in popcorn lines using multivariate analysis. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 1, p. 10–15, 2014.

GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, E. C. **Culturas da fazenda brasileira**. Edições melhoramento, São Paulo. p. 461, 1959.

GRIGOLLI, J. J. J.; LOURENÇÃO, A. L. F. Doenças do Milho Safrinha In: FUNDAÇÃO MS **Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno Doenças do Milho**, 1 ed. Curitiba : Midiograf, 2013 Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br/media/attachments/151/151/55ad6368ae80a392383d052b83891b289ab09d98603aa_capitulo-07_doencas-do-milho-safrinha.pdf> Acesso em: 10 jul. 2016

GROVER, A.; PENTAL, D. Breeding objectives and requirements for producing transgenics for major field crops of India. **Current Science**, v. 84, n. 3, p. 310–320, 2003.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, n.4, p. 461–485, 2005.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2nd ed. Ames; Iowa State University Press, 1988.

HALL, D.; TEGSTRÖM, C.; INGVARSSON, P. K. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, 1- 9, 2010.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Resources**, v. 2, n. 4, pp. 618–620.

HOLLAND, J. B.; UHR, D. V.; JEFFERS, D.; GOODMAN, M. M. Inheritance of resistance to southern corn rust in tropical-by-corn-belt maize populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 2, p. 232–241, 1998.

HOLLIER, C.A. & KING, S.B. Effect of dew period and temperature on infection of seedling maize plants by Puccinia polysora. **Plant Disease**. n. 69, v.1, p.219-220, 1985.

HOSENEY, R. C.; ZELEZNAK, K.; ABDELRAHMAN, A. Mechanism of Popcorn popping. **Journal of Cereal Science I**, p. 43-52, 1983.

HUANG, X.; HAN, B. Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. **Annual review of plant biology**, v. 65, s.n., p. 531–51, 2014.

HULBERT S. H.; BENNETZEN J. L. Recombination at the Rp1 locus of maize. **Molecular and General Genetics**. n. 3, v. 226, p. 377-382, 1991.

JINES, M. P.; BALINT-KURTI, P.; ROBERTSON-HOYT, A.; MOLNAR, T.; HOLLAND, J. B.; GOODMAN, M. M. Mapping resistance to Southern rust in a tropical by temperate maize recombinant inbred topcross population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, n. 4, p. 659–667, 2007

JOHNSON, R. C.; NELSON, G. W.; TROYER, J. L.; LAUTENBERGER, J. A.; KESSING, B. D.; WINKLER, C. A.; O'BRIEN, S. J. Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS). **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 724, 2010.

JULIATTI, F. C.; ZUZA, J. L. M. F.; SOUZA, P. P.; POLIZEL, A. C. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 34-41, 2007.

JULIATTI, F. C.; SOUZA, R.M. Efeito de épocas de plantio na severidade de doenças foliares e produtividade de híbridos de milho. **Bioscience**, Uberlândia, v.21, n.1, p.103-112, 2005.

KANG, H. M.; ZEITLEN, N. A.; WADE, C. M.; KIRBY, A.; HECKERMEN, D.; DALY, M. J.; ESKIN, E. Efficient Control of Population Structure in Model Organism Association Mapping. **Genetics**. v. 1, n. 178, p. 1709–1723, 2008.

KANTETY, R. V.; ZENG, X.; BENNETZEN, J. L.; ZEHR, B. E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, v. 1, n. 4, p. 365-373. 1995.

KUROSAWA, R. N. F.; VIVAS, M.; AMARAL-JUNIOR, A. T.; SANTOS, A.; MAFRA, G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SCHWANTES, I. A. Reaction of popcorn germplasm to polysora rust under field conditions and natural inoculation. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 6, p. 415–422, 2016.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, S. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, n. 1, p. 185, 1989.

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

LARIÈPE, A.; MOREAU, L.; LABORDE, J.; BAULAND, C.; MEZMOUK, S.; DÉCOUSSET, L.; MARY-HUARD, T.; FIÉVET, J. B.; GALLAIS, A.; DUBREUIL, P.; CHARCOSSET, A. General and specific combining abilities in a maize (*Zea mays* L.) test-cross hybrid panel: relative importance of population structure and genetic divergence between parents. **Theoretical and Applied Genetics**. n., v., p.1-15, 2016.

LEAL, A. A.; MANGOLIN, C. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES L. S. A.; SCAPIM, C. A.; MOTT, A. S.; ELOI, I. B. O.; CORDOVÉS, V.; SILVA, M. F. P.

Efficiency of RAPD versus SSR markers in determination of genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**. v.9, n.1, p. 9-18., 2010.

LIMA, R. O. **Linkage analysis and association mapping for plant height in maize**. 2014. 52 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LI, X.; YAN, W.; AGRAMA, H.; JIA, L.; JACKSON, A.; MOLDENHAUER, K.; YEATER, K.; MCCLUNG, A.; WU, D. Unraveling the Complex Trait of Harvest Index with Association Mapping in Rice (*Oryza sativa* L .). **Plos one**. v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.

LIN, K. H.; CHANG, L. C.; LAI, C. D.; LO, H. F. AFLP mapping of quantitative trait loci influencing seven head related traits in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 257–268, 2013.

LIU, Z. X.; WANG, S. C.; DAI, J. R.; HUANG, L. J.; CAO, H. H. Studies of genetic analysis and SSR linked marker location of gene resistance to southern rust in inbred line P25 of maize. **Acta Genet Sin** v. 8 n. 30 p. 706–710, 2003.

LU, Y.; ZHANG, S.; SHAH, T.; XIE, C.; HAO, Z.; LI, X.; FARKHARI, M.; RIBAUT, J. M.; CAO, M.; RONG, T.; XU, Y. Joint linkage–linkage disequilibrium mapping is a powerful approach to detecting quantitative trait loci underlying drought tolerance in maize. **Pnas**, v. 107, n. 45, p. 19585–19590, 2010.

MAFRA, G. S. **Capacidade combinatória da resistência à *Puccinia polysora* em milho-pipoca estimada via dialelo circulante entre linhagens tropicais e temperadas**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. DE. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 161–168, 1997.

MAPA (2016) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/registro/registro-nacional-cultivares> > Acesso em: 20 dez 2016.

MENZ, M. A.; KLEIN, R. R.; MULLET, J. E.; OBERT, J. A.; UNRUH, N. C.; KLEIN, P. E. A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers. **Plant Mol. Biol.** v.48, n. 5, p.483–499, 2002.

MELCHING, J. S. Corn rusts: types, races and destructive potential. **Proceedings of the 30th Annual Corn and Sorghum Research Conference**. Chicago. p 90-115, 1975.

MEZMOUK, S.; DUBREUIL, P.; BOSIO, M.; DÉCOUSSET, L.; CHARCOSSET, A.; PRAUD, S.; MANGIN, B. Effect of population structure corrections on the results of association mapping tests in complex maize diversity panels. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 122, n. 6, pp. 1149-1160, 2011.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. 1 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2001.

MIRANDA, G. V.; SOUZA, L. V.; GALVÃO, J. C. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V.; SANTOS I. C. Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations. **Euphytica**, v. 162, n. 02, p. 431-440, 2008.

MIRANDA, R. A.; DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C.; **Cultivo do milho**, 2012. Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/economia.htm> Acesso em: 10 jun 2016.

MOON, H. S., NIFONG, J. M.; NICHOLSON, J. S.; HEINEMAN, A.; LION, K.; VAN DER HOEVEN, R.; HAYES, A.J.; LEWIS, R.S. Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources. **Crop Sci.** n.1, v.49, p.1–11, 2009.

MUNDIM, G. B. **Diversidade genética, análise de trilha e mapeamento associativo para eficiência no uso de nitrogênio em milho-pipoca**. 2013. 48 f. Dissertação (Mestrado em Genética animal; Genética molecular e de microrganismos; Genética quantitativa; Genética vegetal; Me) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; CUNHA, R. C.; SOUZA, M. W. L.; LIMA, L. A. Use of biostimulants in relieving salt stress in popcorn. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 307–315, 2016.

OLIVEIRA, P. R. D.; SCOTTON, D. C.; NISHIMURA, A. F. Análise da Diversidade Genética Por AFLP e Identificação de Marcadores Associados à Resistência a Doenças em Videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 4, n. 3, p. 454–457, 2005.

PARENTONI, S. N.; MIRANDA, R. A. DE.; GARCIA, J. C. Implications on the introduction of transgenics in Brazilian maize breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 9–22, 2013.

PARKER, T. B., **Investigation of Hop Downy Mildew through association mapping and Observation of the oospore**. 2007. 126 f. Dissertation (Ph.D.) – Oregon State University, 2007.

PATAKY, J. K. Rusts. In: WHITE, D. G. **Copendium of corn diseases**. 3. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C. W.; DUARTE, W. (Org.) **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília, Paralelo 15, 2000. p.11-41.

PENA, G. F.; AMARAL-JUNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; VIVAS, M.; RIBEIRO, R. R.; MAFRA, G. S.; SANTOS, A.; SCAPIM, C. A. Comparison of testers in the

selection of S3 families obtained from the UENF-14 variety of popcorn. **Bragantia**, v. 75, n. 10, p. 135–144, 2016.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. IN: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**, 1 ed. São Paulo:Ceres, 2005. p. 477 – 488.

PINTO, N. F. J. A. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares do milho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 3/4, p. 271 - 274, 1997.

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 134-138, 2004.

PRICE, A. L.; PATTERSON, N. J.; PLENGE, R. M.; WEINBLATT, M. E.; SHADICK, N. A.; REICH, D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, New York, v. 38, s.n, p. 904-909, 2006.

PRITCHARD, J. K.; ROSENBERG, N. A. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. **American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 65, n.1, p. 220-228, 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M., ROSENBERG, N. A.; DONNELLY, P. Association mapping in structured populations. **American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 67, n.1, p. 170-181, 2000.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n.2, p. 945-959, 2000.

RAID, R. N.; PENNYPACKER, S. P.; STEVENSON, R. E. Characterization of *Puccinia polysora* epidemics in Pennsylvania and Maryland. **Phytopathology**, n. 78, v. 1, p. 579-585, 1988.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3 ed. Lavras: UFLA, 2008.

RAMASAMY, R. K.; RAMASAMY, S.; BINDROO, BB.; NAIK, V. G. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. **Springerplus**, v. 3, n.1, p.1, 2014.

REIS, E. M. & CASA, R. T. Milho: Manejo integrado de doenças. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Milho: tecnologia e produtividade**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2001, p. 223-237.

RIBEIRO, C. A. G. **Identificação de regiões genômicas relacionadas à seca e à deficiência de fósforo via análise de ligação e mapeamento associativo em milho tropical**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. How a corn plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, **Special Report**, v. 48, 26 p. 1993.

ROBERT A. L. Host ranges and races of the corn rusts. **Phytopathology** v. 52, n. 1, p. 1010-1012, 1962

SANGOI, L.; SILVA, P. R. F. Arranjo de plantas e desempenho agronômico do milho. In: **A Cultura do milho em Santa Catarina**, Florianópolis, 1 ed., p.115-162, 2010.

SCAPIM, C. A.; JÚNIOR AMARAL, A. T.; VIEIRA, R. A.; MOTERLE, L. M.; TEIXEIRA, L. R.; VIGANÓ, J.; JÚNIOR SANDOVAL, G. B. (2010) Novos Compostos de milho-pipoca para o Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 321-329.

SCAPIM, C. A.; PACHECO, C. A. P.; AMARAL-JUNIOR, A. T.; VIEIRA, R. A.; PINTO, R. J. B.; CONRADO, T. V. Correlations between the stability and adaptability statistics of popcorn cultivars. **Euphytica**, v. 174, n. 02, p. 209-218, 2010.

SCHMITT, Amauri. **Arranjo de plantas para maximizar o desempenho agronômico do milho em ambientes de alto manejo**. 2014, 226p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal – Áreas: Ciências Agrárias, Fitotecnia, Agronomia) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 2014.

SHIMOYA, A.; PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 227–234, 2002.

SHIOGA, P. S.; GERAGE, A. C.; ARAUJO, P. M.; BIANCO, R.; CUSTODIO, A. A. P.; **Avaliação estadual de cultivares de milho segunda safra 2015**. 1 ed. Londrina: IAPAR, 2015, 101 p.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of Corn Diseases**. 1 ed. St. Paul: American Phytopatological Society Press, 1992. 105 p.

SILVA, H. P.; BARBOSA, M. P. M.; NASS, L. L.; CAMARGO, L. E. A. Capacidade de combinação e heterose para resistência a *Puccinia polysora* Underw em milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, p.777-783, 2001.

SILVA, T. A.; CANTAGALI, L. B.; SAAVEDRA, J.; LOPES, A. D.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; SCAPIM, C. A. Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 181–187, 2015.

SILVA, T. A.; PINTO, R. J. B.; SCAPIM, C. A.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M.; CARVALHO, M. S. N. Genetic divergence in popcorn genotypes using microsatellites in bulk genomic DNA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 09, n. 01, p. 31-36, 2009.

SOLLER, M.; BECKMANN, J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical Applied Genetics**. v. 67, n.1, p.25-33, 1983.

STOREY, H. H.; HOWLAND, A. K. Resistance in maize to the tropical American rust fungus, *Puccinia polysora* Underw., I. Genes Rpp1 and Rpp2. **Heredity**, v. 11, p. 289-301, 1957.

STOREY, H. H.; HOWLAND, A. K. The tropical rust disease of maize caused by *Puccinia polysora* Underw. **East Afr Agr For Res Organ Ann Rep**, v. 1 n. 1 p.52–57, 1961.

STOREY, H. H.; HOWLAND, A. K. Resistance in maize to a third East African race of *Puccinia polysora* Underw. **Ann Appl Biol**, v. 60, n. 1, p. 297–303, 1967.

STUBER, C. W. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. **Trends genetics**, v. 11, n. 12, p. 477-481, 1995.

SUN, K.; ZHENG, Z.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F.; BAI, Y. Breeding for disease resistance by editing plant susceptibility genes. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**. v. 9, n.1, p. 5, 2014.

TAUTZ, I. D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res**, v. 17, n. 1, p.6463-6471, 1989.

THORNSBERRY, J. M.; GOODMAN, M. M.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; NIELSEN, D.; BUCKLER, E. S. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 286–289, 2001

TOLLENAAR, M.; LEE, E. A. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. **Field Crops Research**, v. 75, n. 3, p. 161–169, 2002.

TRINDADE, A. P. R.; PINTO, R. J. B.; JÚNIOR AMARAL, A. T.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; SCAPIM, C. A. (2010). Genetic Diversity of Breeding Popcorn Lines Determined by SSR Markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, s.p.

ULLSTRUP, A. J. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to an American race of *Puccinia polysora*. **Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 425-428, 1965.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Circular Series. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2016.

VANDERPLANK, J. E. **Plant Diseases: Epidemics and Control**. 1 ed. New York: Academic Press, 1963.

VEIGA, A. D. **Identificação de QTLs associados à resistência a cercosporiose e produção de grãos em milho**. 2011. 90 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486 p.

VIEIRA, E. A.; NODARI R. O.; CARVALHO F. I. F.; FIALHO J. F. **Mapeamento Genético de Caracteres Quantitativos e sua Interação com o Ambiente**. 1 ed. Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2006.

VIEIRA, R. A. **Melhoramento genético da resistência à helmintosporiose comum, cercosporiose e ferrugem-polissora em milho-pipoca**. 2010. 87 f. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2010.

VIEIRA, R. A.; SCAPIM, C. A.; TESSMANN, D. J.; HATA, F. T. (2011) Análise dialética da produtividade, capacidade de expansão e resistência à ferrugem polissora em linhagens de milho-pipoca. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n.3. p. 774-780, 2011.

VIEIRA, R. A.; SOUZA NETO, I. L.; BIGNOTTO, L. S.; CRUZ, C. D.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SCAPIM, C. A. Heterotic parametrization for economically important traits in popcorn, **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 411-419, 2009.

VON PINHO, R. G. **Metodologias de avaliação, quantificação de danos e controle genético da resistência do milho à *Puccinia polysora* e *Physopella zae***. 1998. 140 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTRS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, n.21, p. 4407- 4414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; VAN EIJK, M. J. T. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature protocols**, v. 2, n. 6, p. 1387–1398, 2007.

WANG, R. L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L.; DOEBLEY, J. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, London, v. 398, n. 6724, p. 236-239, 1999.

WANG, M.; YAN, J.; ZHAO, J.; SONG, W.; ZHANG, X.; XIAO, Y.; ZHENG, Y. Genome-wide association study (GWAS) of resistance to head smut in maize. **Plant Science**, v. 196, n. 1, p. 125–131, 2012.

WANLAYAPORN, K.; AUTHRAPUN, J.; VANAVICHIT, A.; TRAGOONRUNG, A. QTL Mapping for Partial Resistance to Southern Corn Rust Using RILs of Tropical Sweet Corn. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, n. 4, p. 878–889, 2013.

WEI, P.; FENG, H.; PIAO, Z.; LI, C.; LIU, Z.; WANG, Y.; JI, R.; ZOU, T.; JI, S. Identification of AFLP markers linked to Ms, a genic multiple allele inherited male-sterile gene in Chinese cabbage. **Breeding Science**, v. 59, n. 4, p. 333–339, 2009.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WU, X.; LI, N.; ZHAO, P.; HE, Y.; WANG, S. Geographic and genetic identification of RppS, a novel locus conferring broad resistance to southern corn rust disease in China. **Euphytica**, v. 205, n. 1, p. 17-23, 2015.

XU, M. L.; MELCHINGER, A. E.; XIA, X. C.; LUBBERSTED, T. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. **Molecular and General Genetics (MGG)**, v. 261, n.3m, p. 574-581, 1999.

YU, J.; BUCKLER, E. S. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 155-160, 2006.

YU, J.; PRESSOR, G.; BRIGGS, W. H.; VROH-BI, I.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY, J. F.; MCMULLEN, M. D.; GAUT, B. S.; NIELSEN, D. M.; HOLLAND, J. B.; KRESOVICH, S.; BUCKLER E. S. A unified mixed model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics** v. , n. 38, p. 203-208, 2006.

ZARGAR, S. M.; RAATZ, B.; SONAH, H.; NAZIR, M.; BHAT, J. A.; DAR Z. A.; AGRAWAL, G, K.; RAKWAL, R. Recent advances in molecular marker techniques: insight into QTL mapping, GWAS and genomic selection in plants. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 293–308, 2015.

ZHANG, Y.; XU, L.; ZHANG, D.; DAI, J.; WANG, S. Mapping of southern corn rust-resistant genes in the W2D inbred line of maize (*Zea mays* L.). **Molecular breeding**, v. 25, n. 3, p. 433–439, 2010.

ZHAO, N.; YU, X.; JIE, Q.; LI, H.; LI, H.; HU, J.; ZHAI, H.; HE, S.; LIU, Q. A genetic linkage map based on AFLP and SSR markers and mapping of QTL for dry-matter content in sweet potato. **Mol breeding**. v. 32, n. 4, p. 100-114, 2013.

ZHAO, P.; ZHANG, G.; WU, X.; LI, N.; SHI, D.; ZHANG, D.; JI, C.; XU, M.; WANG, S. Fine Mapping of RppP25, a Southern Rust Resistance Gene in Maize. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 55, n. 5, p. 462–472, 2013.

ZHOU, C.; CHEN, C.; CAO, P.; WU, S.; SUN, J.; JIN, D.; WANG, B. Characterization and fine mapping of RppQ, a resistance gene to southern corn rust in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, v.278, n.6, p. 723–728, 2007.

ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E. S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. **Plant Genome**, Madison, v. 1, n.1, p. 5–20, 2008.

ZIEGLER, K.E. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. **Specialty corns**. 2nd ed. Boca Raton, Florida; CRC Press, 2000, p. 199-234.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Identificações, nomes e origens de 77 acessos de milho comum pertencentes ao banco de germoplasma de milho da Universidade Estadual de Maringá.

ID	Acesso	Origem	ID	Acesso	Origem
L4	AG8080-7H3.1-3	-	L80	AVANT-13H5.4-21	-
L5	AVANT-14H5.5-24	-	L81	W57	-
L6	POP103 -88.1	AS1572	L83	PREMIUM-28H13.2-67	-
L7	30F33-71H26.2-194	-	L84	CML19	CIMMYT
L10	POP101-201-3	GARRA	L86	DKB747-45H17.5-115	-
L11	DKB350-78H30.1-219	-	L88	FORT-85H6.2-242	-
L12	DKB747-50H17.6-130	-	L89	DKB747-29H17.3-95	-
L15	FORT-87H6.4-248	-	L90	AG8080-8H3.2-6	-
L20	STRIKE-67H25.1-182	-	L92	DKB747-37H17.2-89	-
L22	POP201-195.1	P30R50	L95	CD303-88H4.1-255	-
L23	30F33-69H26.1-188	-	L99	30F33-70H23.1-191	-
L28	DKB747-43H17.4-107	-	L105	CD303-90H4.3-261	-
L29	CD303-89H4.2-258	-	L107	TORK-53H20.2-143	-
L34	AVANT-10H5.1-12	-	L108	POP203-56.1	SG6015
L38	DKB350-76H30.1-213	-	L109	POP102-166.5	P30B39
L39	AG6018-23H12.1-55	-	L110	A2560-62H23.2-167	-
L42	AVANT-12H5.3-18	-	L111	POP101-195.2	GARRA
L45	DKB747-38H17.2-92	-	L113	FLASH-22H11.1-52	-
L50	POP202-177.1	AS1570	L116	A2560-63H23.2-170	-
L51	FLASH-20H11.1-46	-	L119	TORK-55H20.3-149	-
L52	DAS422-80H31.2-227	-	L121	FORT-84H6.1-239	-
L56	30-23	P30P70 x Dow8460	L124	DAS2C599-95H34.4- 276	-
L57	POP201-198.4	P30R50	L125	CML12	CIMMYT
L58	A2560-66H23.4-179	-	L127	A2560-65H23.3-176	-
L62	POP102-90.1	P30B39	L129	SPEED-81H33.1-230	-
L63	29-14	Penta x P30F53	L132	POP102-91.2	P30B39
L64	POP202-88.2	AS1570	L133	30.11	P30P70 x Dow846
L65	30-15	P30P70 x Dow8460	L134	POP101-197.1	GARRA
L67	POP201-192.1	P30R50	L135	29-154	Penta x P30F53
L68	29-92	Penta x P30F53	L136	DAS422-79H31.1-222	-
L69	POP203-51.2	SG6015	L137	A2560-170	-
L70	CML13	CIMMYT	L138	A2560-164	-
L71	POP103-80.5	AS1572	L139	DKB747-41-101	-
L72	30-29	P30P70 x Dow8460	L140	DKB747-47-121	-
L73	POP103-81.4	AS1572	L141	DKB747-48-124	-
L74	POP202-76.1	AS1570	L142	DAS422-8-222	-
L75	31-33	Penta	L143	DKB747-42-104	-
L77	CML22	CIMMYT	L145	53f-p37	-
L79	DKB350-19H9.1-43	-			

Fonte: Adaptado de Camacho (2017, no prelo).

APÊNDICE B

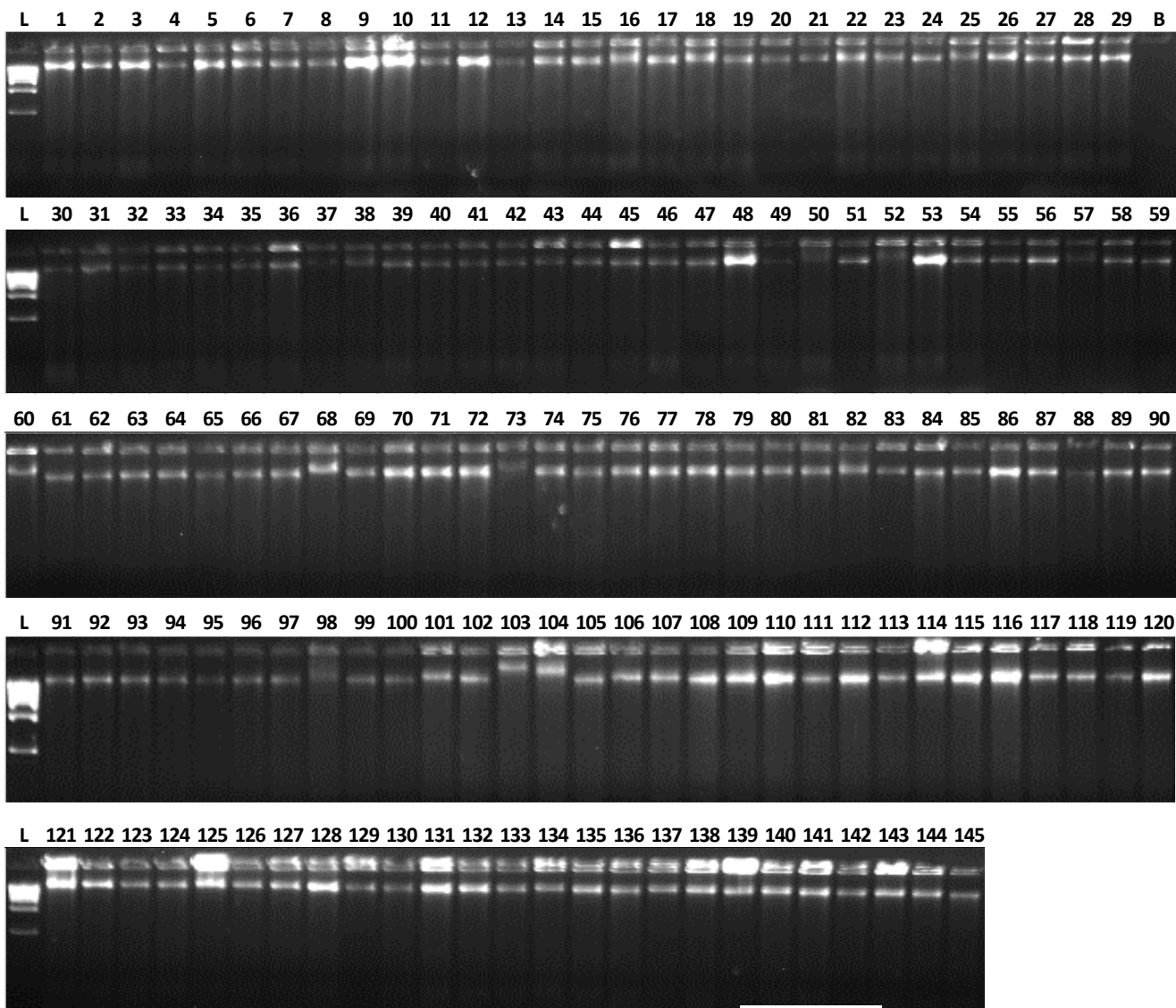
Identificações, nomes e origens de 68 acessos de milho-pipoca pertencentes ao banco de germoplasma de milho da Universidade Estadual de Maringá.

ID	Acesso	Origem	ID	Acesso	Origem
L1	GP1	Zélia	L59	P7-4-5	UEM-M2
L2	GP4	CMS43	L60	P9-12-1	IAC112
L3	P9-4-6	IAC112	L61	P9-6-3	IAC112
L8	P7-L7-1	UEM-M2	L66	P9-3-2	IAC112
L9	P16	P1283	L76	P8-2-2-4	Zaeli
L13	P8-1-1	Zaeli	L78	P19	-
L14	P20	-	L82	P7-2-3	UEM-M2
L16	P1-9	Zélia	L85	P1-3	Zélia
L17	P11-1	IAC125	L87	ANGELA-L70	Ângela: Embrapa
L18	P3-3T	CMS42	L91	BEIJAFLORE-L54	Beija-Flor: UFV
L19	P8-2	Zaeli	L93	BEIJAFLORE-L59	Beija-Flor: UFV
L21	P8-1-5-4	Zaeli	L94	GP14	Maradona
L24	P1-12	Zélia	L96	VIÇOSA-L77	Viçosa: UFV
L25	GP13	Jade	L97	P15	Colombiana
L26	P9-1	IAC112	L98	ANGELA-L71	Ângela: Embrapa
L27	P7-2-4	UEM-M2	L100	UFV-L80	Viçosa: UFV
L30	P9-4-5	IAC112	L101	ANGELA-L66	Ângela: Embrapa
L31	VIÇOSA-L75	Viçosa: UFV	L102	P3-1-2	CMS42
L32	P6-1	Catedral	L103	P1-8	Zélia
L33	GP15	Colombiana	L104	BEIJAFLORE-L52	Beija-Flor: UFV
L35	P8-1-5-9	Zaeli	L106	P9-5-3	IAC112
L36	P1-19	Zélia	L112	P9-1-3	IAC112
L37	P18	-	L114	P9-11-1	IAC112
L40	P4-4	CMS43	L115	BEIJAFLORE-L76	Beija-Flor: UFV
L41	P8-2-2-2	Zaeli	L117	P8-1-5-5	Zaeli
L43	P9-7-2	IAC112	L118	P9-8-1	IAC112
L44	P8-2-MULT	Zaeli	L120	P7-2-1	UEM-M2
L46	P11-2	IAC125	L122	P8-1-5-13	Zaeli
L47	GP10	Ângela	L123	GP3	CMS42
L48	P7-4-11	UEM-M2	L126	GP12	IAC125
L49	P9-5-1	IAC112	L128	GP5	UEM-J1
L53	P8-2-2-5	Zaeli	L130	P6-11	Catedral
L54	P8-1-5-10	Zaeli	L131	P1780	-
L55	P9-1-2	IAC112	L144	P9-1-6	IAC112

Fonte: Adaptado de Camacho (2017, no prelo).

APÊNDICE C

Integridade do DNA de 145 linhagens de milho em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

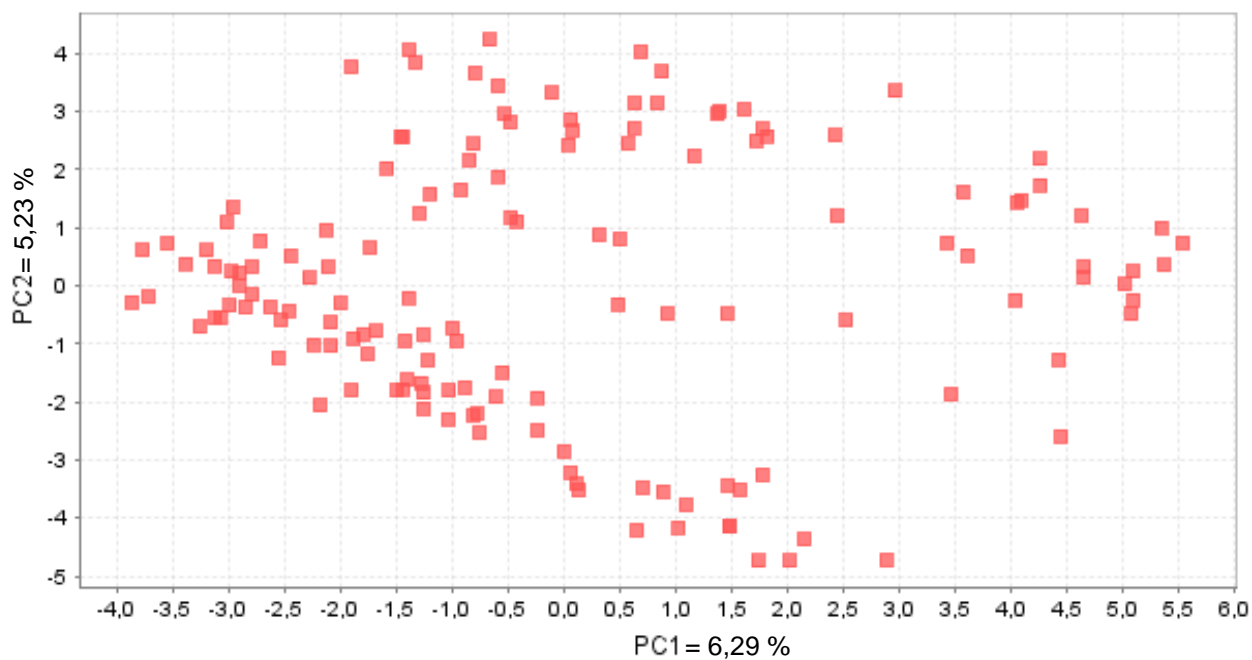


L: High DNA Mass Ladder. B: Branco

Fonte: O próprio autor

APÊNDICE D

Análise de componentes principais de 145 linhagens de milho baseada no polimorfismo gerado por AFLP.



Fonte: O próprio autor

APÊNDICE E

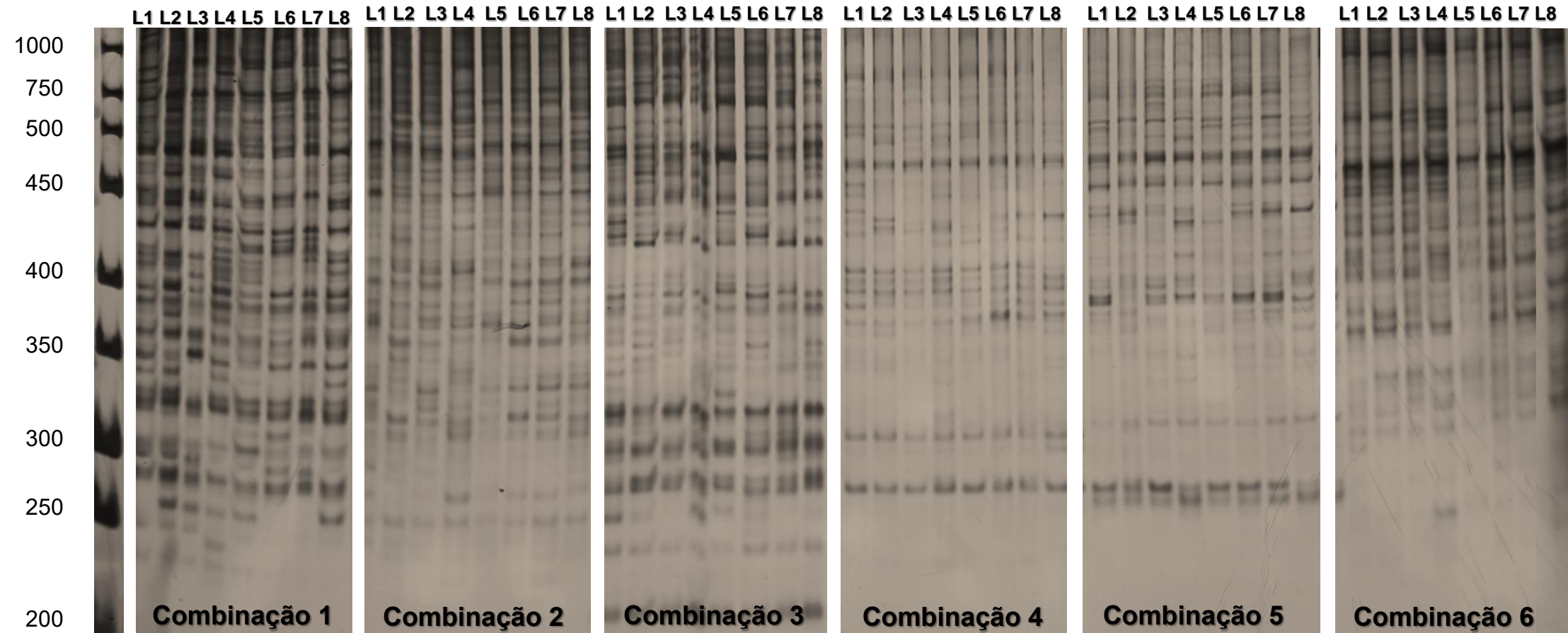
Acessos classificados como altamente resistentes (notas inferiores a 2) de acordo com a média dos experimentos de safra (2014) e segunda safra (2014/2015).

Acesso	ID	Nota
A2560-62H23.2-167	L110	1
A2560-63H23.2-170	L116	1.25
W57	L81	1.25
A2560-65H23.3-176	L127	1.5
CD303-89H4.2-258	L29	1.75
30F33-69H26.1-188	L23	1.75
30F33-70H23.1-191	L99	1.75
CML12	L125	1.75
AVANT-14H5.5-24	L5	2
DKB350-78H30.1-219	L11	2
CML19	L84	2
DAS2C599-95H34.4-276	L124	2
DKB747-42-104	L143	2

Fonte: O próprio autor.

APÊNDICE F

Polimorfismo de AFLP de oito linhagens de milho, gerado por seis diferentes combinações de *primers* seletivos, em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.



L1– Linhagem 1, L2– Linhagem 4, L3- Linhagem 11, L4– Linhagem 5, L5- Linhagem 6, L6– Linhagem 8, L7- Linhagem 9, L8- Linhagem 19. **Combinação 1-** E-ACG/M-CAG, **Combinação 2-** E-AGC/M-CAG, **Combinação 3-** E-ACT/M-CTG, **Combinação 4-** E-ACT/M-CTAG, **Combinação 5-** E-AAC/M-CTAG, **Combinação 6-** E-AGG/M-CTG.
 Fonte: O próprio autor.