|  |  |
| --- | --- |
|  | **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**  **CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  **DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA** |

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA EFICIÊNCIA NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO E FOSFÓRO EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA**

Vinícius Costa Almeida

Viçosa – MG

Junho/2014

**MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA EFICIÊNCIA NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO E FOSFÓRO EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA**

Vinícius Costa Almeida

Orientador: Prof. José Marcelo Soriano Viana

Trabalho elaborado para cumprir a disciplina FIT 499 – Trabalho de Conclusão de Curso, como exigência obrigatória para integralização curricular do Curso de Agronomia.

Viçosa – MG

Junho/2014

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

ACADÊMICO:

CURSO: AGRONOMIA

ORIENTADOR(ES):

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

PERÍODO: Semestre \_\_\_\_\_ Ano \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

APROVADO COM CONCEITO: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

REPROVADO: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Membro: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Membro: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Viçosa, \_\_\_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Coordenador da FIT 499

**FOLHA-RESUMO**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Autor: Vinícius Costa Almeida | |
| Título: **MAPEAMENTO ASSOCIATIVO PARA EFICIÊNCIA NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO E FOSFÓRO EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA** | | |
|  | | |
| Orientador(es): José Marcelo Soriano Viana | | |
| Rodrigo Oliveira de Lima | | |
|  | | |
| Curso: Agronomia | | Ano:2014 |
| Resumo: O objetivo deste trabalho foi realizar o mapeamento associativo para eficiência na absorção de nitrogênio, fósforo e caracteres associados a essas eficiências em linhagens de milho-pipoca. Os experimentos foram conduzidos em esquema fatorial (linhagens x níveis do nutriente) no delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. Foram mensuradas os seguintes caracteres: eficiência na absorção de nitrogênio (EAbN, mg mg-1) e fósforo (EAbP, mg mg-1), massa de parte aérea seca (MPAS, mg) e de raiz seca (MRS, mg), comprimento (CTR, cm) e volume total de raízes (VR, cm³). As linhagens foram genotipadas com 90 marcadores de microssatélites do tipo (SSR) escolhidos em função de estarem localizados em regiões com QTLs previamente identificados para os caracteres relacionados à absorção e metabolismo de N e P. Foram observadas 44 associações significativas entre marcadores moleculares e os caracteres fenotípicos avaliados no experimento de N e 34 marcadores associados aos caracteres avaliados no experimento de P. Em relação aos diferentes níveis de cada nutriente, foram observadas 18 associações em alto N e 26 marcadores associados aos caracteres fenotípicos em baixo N. Os marcadores moleculares *phi120* e *umc1078* foram associados a todos os caracteres avaliados em alto N, enquanto que em baixo N, os marcadores *umc1073* e *umc1447* apresentaram associação significativa com todos os caracteres, exceto com a EAbN. A menor distância foi observada entre o marcador *umc1078* e o gene *gln3* (10,4 cM). Para o experimento de P, foram observadas 17 associações significativas em cada nível do nutriente, sendo que os marcadores *umc1073* e *umc1447* mostraram associação com todos os caracteres em alto P. As associações mais próximas foram entre o marcador *umc1073* e os genes *rtcs1* (22,1 cM) e *rth3* (14,6 cM) em alto P, enquanto que em baixo de P, houve associação dos marcadores *umc1114* e *umc2343* com MPAS, MRS, CTR e VR, com destaque para a associação entre o marcador *umc1114* e o gene *rth3* (17,4 cM). Conclui-se que o mapeamento associativo resultou na identificação de marcadores moleculares associados aos genes responsáveis pela expressão de caracteres fenotípicos relacionados à eficiência na absorção de N e P, podendo ser utilizados na seleção assistida por marcadores. | | |
|  | | |
|  | | |
|  | | |
| Palavras Chave: marcadores moleculares; eficiência nutricional; seleção fenotípica | | |
|  | | |

**Índice**

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **Introdução** | **6** |
| 1. **Objetivo** | **7** |
| 1. **Revisão de Literatura** | **7** |
| * 1. **Eficiência na absorção de N e P** | **7** |
| * 1. **Mapeamento associativo** | **9** |
| 1. **Material e métodos** | **12** |
| * 1. **Descrição das linhagens** | **12** |
| * 1. **Fenotipagem** | **13** |
| * 1. **Genotipagem** | **14** |
| * 1. **Análises estatísticas** | **15** |
| 1. **Resultados e discussão** | **15** |
| 1. **Conclusões** | **22** |
| 1. **Referências Bibliográficas** | **23** |
|  |  |

1. **Introdução**

O milho-pipoca, assim como o milho comum e os demais tipos especiais, pertence à espécie *Zea mays* L.. No Brasil, o consumo de milho-pipoca é, em sua maioria, proveniente de material genético importado dos Estados Unidos e Argentina. Entretanto, nas últimas safras, a quantidade de grãos que são importados diminuiu significativamente, devido ao fato de sementes de híbridos norte-americanos terem sido importados e registrados por empresas brasileiras. A dependência de sementes importadas e a importação de grãos podem ser eliminadas pelo desenvolvimento de materiais genéticos melhor adaptados, mais produtivos e com níveis de qualidade comparáveis aos híbridos norte-americanos. Assim, a execução de programas de melhoramento de milho-pipoca deve contribuir para diminuir os gastos com importação de sementes e grãos e para o desenvolvimento da cultura em todo o país, principalmente pelo aumento da área cultivada com material genético superior. Neste contexto, a integração de marcadores moleculares aos programas de melhoramento representa uma ferramenta valiosa, em razão do consenso de que a combinação dos procedimentos de seleção, recombinação e avaliação experimental com métodos e técnicas da biologia molecular, pode ser utilizada na construção de mapas de associação, tornando mais eficiente e confiável a seleção fenotípica utilizada no melhoramento genético.

O fósforo (P) é um elemento essencial para a produção agrícola e, portanto, o rendimento das culturas não pode ser aumentado se o solo não disponibiliza este nutriente na quantidade exigida pela cultura. Nos solos tropicais, ele representa um limitante à produção agricola, devido a sua baixa disponibilidade e mobilidade no solo. O nitrogênio (N) tem ação fundamental no metabolismo da planta, principalmente na síntese de aminoácidos e, consequentemente, na formação da cadeia polipeptídica. No entanto, a eficiência na absorção do N nem sempre é observada, uma vez que as perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação são intensas, dependendo das condições climáticas, características do solo, época de aplicação e morfologia do sistema radicular (SINCLAIR e VADEZ., 2002). Neste sentido, as aplicações de fertilizantes inorgânicos têm sido intensificadas nas lavouras para suportar o crescimento e desenvolvimento das culturas. Infelizmente, embora estes fertilizantes inorgânicos possam fornecer N e P para as plantas, eles também aumentam os custos de produção e vem causando grave poluição ao meio ambiente (LI et al., 2010).

Desse modo, outra opção para a manutenção do rendimento das culturas com menor impacto sobre os custos de produção e o meio ambiente é a utilização de materiais genéticos melhorados que tenham uma maior eficiência na absorção de N e P. Neste sentido, a seleção de materiais genéticos superiores pode ser realizada através do mapeamento associativo, identificando marcadores específicos relacionados à expressão de caracteres fenotípicos associados à eficiência na absorção de N e P, uma vez que, a cultura do milho-pipoca não dispõe de genótipos devidamente selecionados para eficiência nutricional.

1. **Objetivo**

A seguinte proposta teve como prioridade realizar o mapeamento associativo para eficiência na absorção de nitrogênio e fósforo, e caracteres associados a estas eficiências em linhagens de milho-pipoca.

1. **Revisão de Literatura**
   1. **Eficiência na absorção de N e P**

No melhoramento de plantas para a identificação de cultivares eficientes na absorção e utilização de nutrientes é necessário estabelecer métodos rápidos, de baixo custo e que permitam discriminar genótipos com alta repetibilidade dos resultados e avaliar grande quantidade de plantas, famílias ou populações. Os melhores critérios para avaliar cultivares mais eficientes na absorção e utilização de determinado nutriente têm sido aqueles que utilizam o crescimento e desenvolvimento das plantas em condições de baixo nível do nutriente, verificando se a resposta se deve ao mecanismo de absorção e/ou de utilização do nutriente para produção de matéria seca (FURLANI et al., 1985).

Considerando a eficiência na absorção de N, MUNDIM et al. (2013) realizaram um estudo para identificação e avaliação da diversidade genética de 25 linhagens de milho-pipoca em condições de alta e baixa disponibilidade de N, além de investigar os efeitos causais de vários caracteres na eficiência no uso de nitrogênio (EUN). A avaliação da diversidade genética foi realizada com base nos caracteres fenotípicos, agrupando as linhagens em quatro grupos em ambas doses de N. Com isso foram identificadas linhagens eficientes e ineficientes em baixo e alto N, podendo ser úteis para gerar populações segregantes para identificação de QTLs.

PENG et al. (2010) realizaram um trabalho para verificar se a quantidade de nitrogênio absorvido em plantas de milho com diferentes capacidades de absorção é determinada pelo potencial de crescimento da parte aérea ou pelo tamanho da raiz. Para isto, as linhagens N-eficiente '*478*' e N-ineficiente '*Wu312*' foram avaliadas em experimentos de campo, nos quais foram mensurados o comprimento total de raízes, divididas nas classes axial, lateral e embrionárias; densidade de comprimento radicular; teor de N na planta inteira; e incremento total de N. O teor de N na planta inteira da linhagem N-eficiente '*478*' foi significativamente maior do que o da linhagem N-ineficiente ' *Wu312*'. Esta linhagem teve também o maior comprimento total de raízes e maior densidade de comprimento radicular. Apesar do menor tamanho de raiz, a linhagem N-ineficiente '*Wu312*' apresentou maior concentração de N do que a linhagem N-eficiente '*478*' durante todo o período de crescimento, o que implica que o N não foi limitante para o crescimento da linhagem '*Wu312*'. Embora um sistema radicular grande e alta densidade de comprimento radicular no perfil do solo tenham sido benéficos para a aquisição eficiente de N, a quantidade de N absorvida pelos dois genótipos na presença de fonte de N suficiente foi determinada pelo potencial de crescimento da parte aérea, e não pelo tamanho do sistema radicular.

SOARES et al. (2011) caracterizaram uma população de milho para caracteres agronômicos e teor de clorofila em alto e baixo N. A população apresentou variabilidade genética para produtividade de grãos em baixo e alto N, com redução na média de altura de espiga, teor de clorofila, número de espigas, peso de espiga e produtividade de grãos em relação ao ambiente sem estresse. Os coeficientes de correlação genética entre produtividade de grãos e os outros caracteres variaram de acordo com as doses de nitrogênio aplicadas. O número de espigas apresentou alta correlação genética com produtividade de grãos sob estresse, além de maior herdabilidade comparada à obtida em alto nitrogênio, possibilitando assim seu uso na seleção indireta de linhagens produtivas de milho cultivadas sob estresse de nitrogênio.

Em relação à eficiência na absorção de P, FIDELIS et al. (2010) objetivaram selecionar genótipos do Programa Milho® da Universidade Federal de Viçosa (UFV) que apresentaram maior eficiência e resposta a doses de fósforo em solos de cerrado. O ensaio foi constituído de 47 genótipos correspondentes a 36 híbridos interpopulacionais provenientes de um bloco de recombinação entre nove populações genitoras e de 11 testemunhas. Para simular ambientes com baixo e alto nível de fósforo, foram utilizadas doses de 25 e 113 kg.ha-1 de P2O5 na semeadura, respectivamente. Para identificar os cultivares adequados aos ambientes, utilizou-se o método proposto por FAGERIA e KLUTHCOUSKI (1980), que sugerem a classificação das cultivares quanto à eficiência no uso e resposta à aplicação do fósforo (eficiência e resposta - ER). A utilização do nutriente foi definida pela média de produtividade de grãos em baixo nível. A resposta à utilização do nutriente é obtida pela diferença entre a produtividade de grãos nos dois níveis dividida pela diferença entre as doses. Utilizou-se a representação gráfica no plano cartesiano para classificar as cultivares. Eles concluíram que os genótipos eficientes na absorção e utilização de fósforo e responsivos ao incremento de P foram UFVM77-0331, UFVM77-0307, UFVM77-0333, UFVM77-0381, UFVM77-0313, UFVM77-0305, UFVM77-0377 e UFVM77-0345.

MAIA et al*.* (2011) verificaram em milho tropical a relação entre melhoramento para tolerância a estresse por baixos níveis de nutrientes no solo e para eficiência nutricional. Foram avaliadas 15 linhagens endogâmicas de milho em dois experimentos conduzidos em casa de vegetação, em condições contrastantes de N e P. A relação entre eficiência nutricional e tolerância a escassez de nutrientes foi estimada por meio da correlação de postos de Spearman entre o rank das linhagens para os caracteres relacionados à eficiência do uso de N e P e os índices de plasticidade fenotípica. A falta de relação entre os caracteres avaliados, tanto pela significância como pela magnitude, indicam que esses são controlados por grupos gênicos diferentes. Desse modo, haveria a possibilidade da seleção simultânea tanto para eficiência do uso de nutrientes como para tolerância a estresse, se mecanismos que conferem eficiência e tolerância não forem competitivos.

* 1. **Mapeamento associativo**

A tendência nos centros de pesquisa agrícola e institutos de melhoramento tem sido a integração de marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético. Vários caracteres de interesse agronômico como produtividade, altura de planta, arquitetura de raiz, entre outras são caracteres quantitativo controlados por muitos genes e muito influenciado pelo ambiente. Estas regiões localizadas dentro do genoma da planta associados à expressão de determinados caracteres são conhecidos como locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs) (COLLARD et al., 2005). O mapeamento associativo consiste na identificação de associação significativa entre fenótipo e polimorfismo molecular, devido ao desequilíbrio de ligação. Suas etapas são: escolha do germoplasma, análise da estrutura populacional, avaliação fenotípica, identificação de polimorfismo molecular e análise genético estatística dos dados.

FLINT-GARCIA et al. (2005) caracterizaram uma população para mapeamento associativo, formada por 302 linhagens representativas do pool gênico do milho, em relação a 89 locos SSR e 60 caracteres de planta, espiga e grão. As estimativas de herdabilidades foram em geral elevadas, apesar da comprovação de interação genótipo x ambiente. A análise de estrutura populacional, empregando o software Structure, revelou quatro grupos, caracterizados como 'non stiff-stalk' (NSS), 'stiff-stalk' (SS), 'tropical/subtropical' (TS) e 'mixed'. As linhagens de milho-pipoca e milho-doce foram incluídas no grupo NSS.

STICH et al. (2006a) compararam marcadores AFLP (dominante) e SSR (multialélico co-dominante) em estudos de LD. Foram empregados 72 linhagens elites de milho da Europa, 452 locos AFLP e 93 locos SSR. As distâncias médias entre locos AFLP e SSR foram 2,9 e 12,6 cM, respectivamente. Nos grupos flint e dent foram verificados 15% e 49% de pares de locos AFLP e SSR em LD respectivamente, mas a proporção de locos em desequilíbrio em relação aos em equilíbrio foi maior em relação às marcas AFLP. Eles observaram maior número de blocos de LD, mas de menor tamanho, para marcas AFLP (11,6 vs. 9, em média), mas os comprimentos médios foram equivalentes (13,2 vs. 13,6 cM). Apenas em populações submetidas a muitas recombinações os autores recomendam o uso de marcadores dominantes.

YU et al. (2006) propuseram um método corretivo para mapeamento associativo aplicável a painéis de linhagens (grupo de linhagens). O método permite eliminar associações espúrias atribuídas à estruturação populacional das linhagens e emprega BLUP (Melhor Predição Linear Não Viesada) com informação de parentesco. Os resultados relativos a um painel de 277 linhagens de milho, genotipadas em relação a 533 SNPs, com ampla diversidade molecular e fenotípica, demonstrou melhor controle das taxas de erros Tipos 1 e 2, em relação aos métodos de associação estruturada e controle genômico. O teste de desequilíbrio proposto por STICH et al. (2006b), aplicável a programas de desenvolvimento de linhagens, também proporcionou maior poder de detecção de QTL, comparativamente ao teste da razão de verossimilhança de regressão logística. Eles analisaram o florescimento de 49 linhagens de milho da Europa, genotipadas com 722 marcas AFLP, e validaram um QTL detectado em estudo anterior.

STICH et al. (2007), com base em um estudo da importância da seleção, mutação e deriva genética em gerar LD em populações de milho submetidas a processos padrões de melhoramento, recomendam que os testes de mapeamento de associação sejam realizados com base em progênie. O estudo de simulação revelou que seleção e deriva são as maiores forças geradoras de LD, sendo negligenciável o efeito da mutação.

STICH E MELCHINGER (2009) compararam nove métodos de mapeamento associativo quanto às taxas de erro Tipos 1 e 2, empregando dados simulados e reais relativos a cinco espécies. Segundo os autores, melhor método combina o uso das matrizes de estrutura populacional e de parentesco, em uma abordagem BLUP. Os métodos de mapeamento associativo sem controle de estrutura populacional e de parentesco (GLM ou ANOVA), com controle apenas de estrutura populacional ou parentesco e com controle dos dois fatores foram avaliados por YANG et al. (2010). Eles empregaram um novo painel de 155 linhagens de milho de clima temperado, fenotipadas para 34 caracteres e genotipadas em relação a 82 locos SSR e 1536 SNPs. O melhor método foi o que o controla o parentesco, o qual foi equivalente ao método completo, mas superior ao que controla apenas a estrutura populacional.

Também empregando simulação, STICH et al. (2010) estudaram como maximizar o poder de detecção a detecção de QTL, considerando RILs (Recombinant Inbred Lines). Os fatores avaliados foram o controle genético do caractere, os custos de desenvolver, genotipar e avaliar as RILs, o número de RILs, o número de ambientes e o número de repetições por ambiente. Foram analisadas 26 linhagens, genotipadas em relação a 653 SNPs. Comparando o poder de detecção de QTL em condições ótimas e subótimas de alocação de recursos, eles concluíram que um mapeamento associativo eficiente requer a avaliação da população de mapeamento em um elevado número de ambientes com elevado número de repetições em cada ambiente.

CHEN et al. (2009) objetivaram identificar QTLs para eficiência de utilização de fósforo pela parte aérea, eficiência de utilização de fósforo por toda a planta e relação raiz/parte aérea em níveis contrastantes de P, que podem ser usados na melhoria da eficiência de uso de fósforo por meio de seleção assistida por marcadores. Para isto, um total de 241 famílias F2:3 derivadas do cruzamento entre dois genótipos de milho contrastantes de P foram avaliadas em condição normal e deficiente de P. O conteúdo de P foi determinado em plantas colhidas e separadas em duas porções (raízes e parte aérea). A soma das duas porções foi utilizada como uma expressão para P na planta inteira. Usando mapeamento de QTL por intervalo composto, um total de 5-8 QTLs distintos foi identificado em condições de baixo e alto P, respectivamente. A avaliação em condições de fósforo deficiente mostrou que genes que controlam a eficiência de utilização de fósforo ou relação raiz/parte aérea podem ser diferentes.

LI et al. (2010) realizaram um trabalho com o objetivo de mapear QTLs em milho para produtividade de grãos e componentes de produtividade em condições de alto e baixo P em dois locais, utilizando um conjunto de 210 famílias F2:3 desenvolvidas a partir de duas linhagens contrastantes. Seis caracteres agronômicos, incluindo produtividade de grãos por planta, peso de 100 grãos, comprimento da espiga, número de linhas de grãos por espiga, número de grãos por linha e diâmetro da espiga foram avaliados. Um total de 69 QTLs foram identificados para os seis caracteres nos dois locais. ZHU et al. (2005, 2006), detectaram nove QTLs para características de raízes seminais, 14 para raízes laterais e 11 para comprimento dos pêlos radiculares em condições de baixo e alto P. CHEN et al. (2008), também citado por LI et al. (2010) mapearam um total de 75 QTLs para eficiência nutricional de P e características biológicas relacionadas.

# Material e métodos

# Descrição das linhagens

Foram caracterizadas 48 linhagens endogâmicas de milho-pipoca (S6-S8) do Programa de Melhoramento de Milho-pipoca do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. As linhagens foram obtidas a partir das populações ‘Viçosa’ e ‘Beija-Flor’. As linhagens foram selecionadas com base em desempenho '*per se*' e no desempenho dos híbridos obtidos a partir do cruzamento das mesmas, com relação à produtividade de grãos e capacidade de expansão, principal caractere de qualidade de milho-pipoca para o mercado. Entre as 48 linhagens, 25 foram avaliadas quanto à eficiência absorção de N e 23 foram avaliadas quanto à eficiência na absorção de P.

* 1. **Fenotipagem**

As sementes das linhagens foram germinadas em bandejas de isopor contendo areia lavada e transplantadas para tubos de PVC de 150 mm de diâmetro e 50 cm de altura, utilizados como vasos. Os vasos tinham, aproximadamente, 9,0 dm³ de substrato, sendo este composto por areia lavada e vermiculita inerte, numa proporção de 1:1 para o experimento com N, enquanto para o experimento com P, 25% de areia foram substituídos por solo, para aumentar a capacidade de adsorção de fósforo. A irrigação foi feita diariamente, por meio da aplicação de solução nutritiva descrita por CHUN et al. (2005). Cinco dias após o transplantio, foram fornecidos 0,3 litros da solução nutritiva por vaso em intervalos de dois dias. Nos dias em que não foi fornecida a solução nutritiva, as plantas foram irrigadas com água deionizada, mantendo-se a umidade próxima da capacidade de campo. No experimento com N, as doses de alto e baixo N foram fornecidas por meio de solução nutritiva contendo Ca(NO3)2, enquanto no experimento com fósforo, a adubação foi realizada por meio de superfosfato-triplo, moído e peneirado para aumentar a adsorção do nutriente, enquanto os demais nutrientes foram fornecidos por meio de solução nutritiva, conforme descrito acima.

Os experimentos foram conduzidos no delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial 25 x 2 (linhagens x níveis de N) e 23 x 2 (linhagens x níveis de P), sendo que cada vaso contendo uma única planta foi considerado como uma unidade experimental. As doses de alto e baixo N e P foram obtidas por meio de um experimento preliminar, no qual algumas linhagens foram avaliadas em doses crescentes dos nutrientes. As doses contrastantes foram aquelas que causaram redução de 50% na massa de parte aérea seca da planta. As avaliações foram realizadas quando as plantas atingiram o estádio de seis folhas completamente desenvolvidas (V6), aproximadamente 30 dias após o transplantio.

No momento da colheita, as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas sobre duas peneiras sobrepostas (0,25 e 0,50 mm), com a de maior malha por cima e utilizando jato de água dirigido para separá-las do substrato e evitar a perda de raízes. O sistema radicular foi armazenado em frascos com álcool 25% para posterior avaliação por meio de análise de imagens, utilizou-se o software WinRHIZO Pro 2007a, acoplado ao scanner EpsonXL 1000 equipado com luz adicional (TPU), seguindo os procedimentos sugeridos por BOUMA et al. (2000). As raízes foram classificadas em classes de diâmetro e foram mensurados os seguintes caracteres: comprimento total de raízes (CTR, cm) e volume de raízes (VR, cm³). Após a avaliação do sistema radicular, as raízes foram levadas para secagem em estufa a 70°C, para se obter a massa de raízes secas (MRS, mg). A parte aérea das plantas foi acondicionada em sacos de papel e seca a 70°C em estufa com circulação forçada de ar, até atingirem massa constante, para se obter a massa de parte aérea seca (MPAS, mg).

Para determinação dos teores de N e P na parte aérea, amostras de 0,5 g foram submetidas à digestão nítroperclórica (JOHNSON e ULRICH, 1959) para determinação do teor de P por meio de espectrofotometria de absorção atômica. Outras subamostras de 0,1 g da massa da parte aérea seca foram submetidas à digestão sulfúrica para determinação do teor de N utilizando o método Kjeldahl (BREMNER e MULVANEY, 1982). O conteúdo total de N e P na parte aérea foi obtido pelo produto do teor de nutriente pela massa da parte aérea.

Uma vez obtidos todos esses dados, foi calculada a eficiência na absorção de N e P, segundo MOLL et al. (1982), como se segue:

* Eficiência na absorção de N (EAbN, mg mg-1):
* Eficiência na absorção de P (EAbP, mg mg-1):
  1. **Genotipagem**

Recentemente, em razão de protocolos conhecidos de extração de DNA de milho não terem produzido resultados satisfatórios, foi ajustado um protocolo adequado para milho-pipoca e testou-se a extração usando duas marcas de kits de extração de DNA. Em razão do uso do kit ser mais rápido (4 horas *versus* 24 horas) e proporcionar DNA de melhor qualidade em relação ao protocolo ajustado, toda extração foi feita empregando okit da Promega (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*).

As linhagens foram genotipadas em relação a 90 *primers* de microssatélites (SSR) escolhidos em função de estarem localizados em regiões com QTLs previamente identificados para caracteres de qualidade de milho-pipoca (capacidade de expansão, volume de pipoca, percentagem de grãos não estourados, etc.), caracteres agronômicos (produtividade de grãos, peso de 100 grãos, altura de planta e espiga, etc.) e para caracteres relacionados à absorção e metabolismo de N e P (arquitetura de raízes, eficiência no uso de nitrogênio e fósforo, etc.) (Figura 1), usando as informações do banco de dados MaizeGDB ([*www.maizegdb.org*](file:///C:\Users\GABRIEL\Documents\GABRIEL\Mestrado\Estagiários\Universal%20Fapemig\www.maizegdb.org)). Parte dos *primers* SSR foi escolhida ao acaso, para servirem como referenciais de marcadores neutros, equitativamente distribuídos nos 10 grupos de ligação do milho-pipoca.

* 1. **Análises estatísticas**

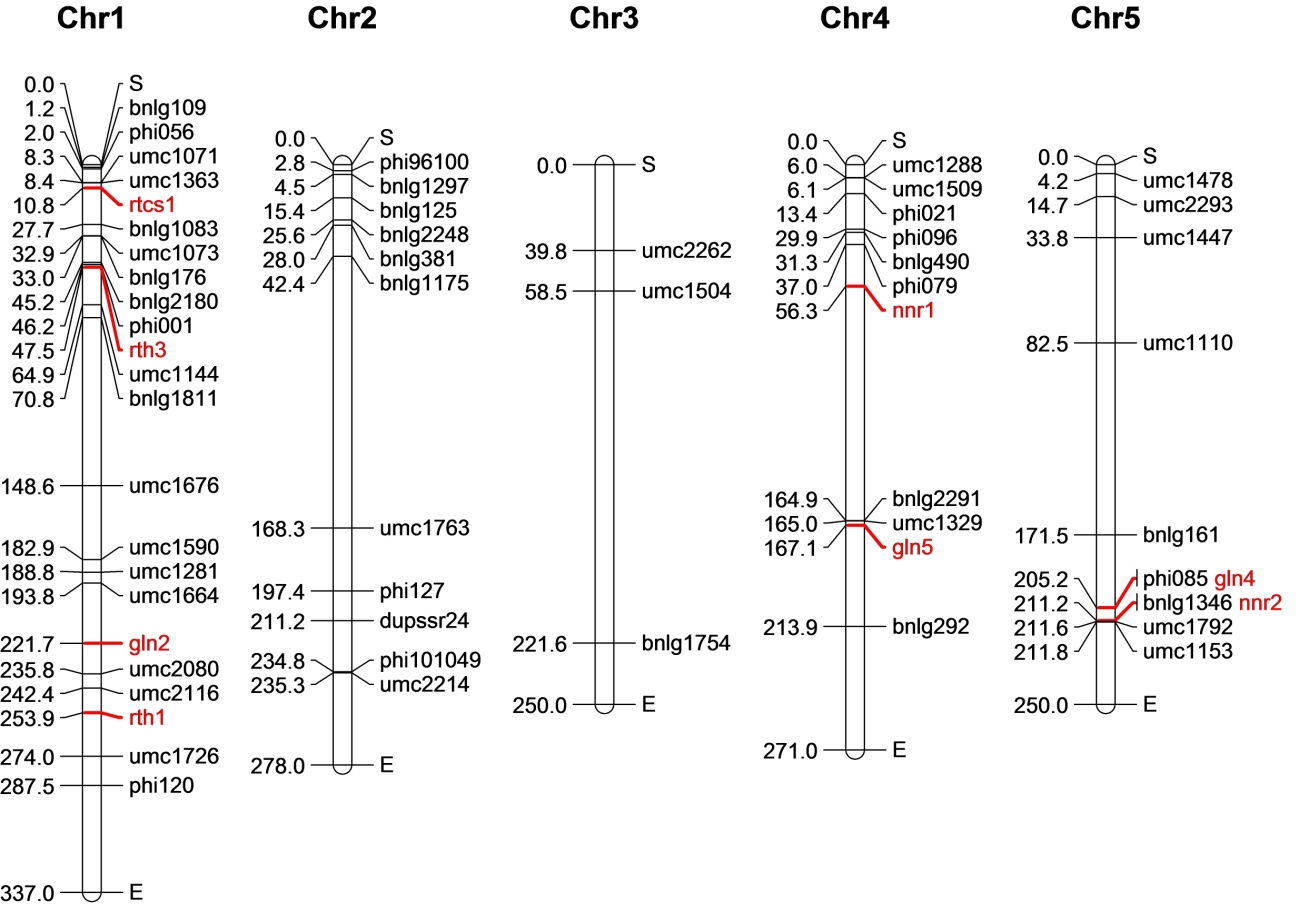
Foi realizada a análise de variância (ANOVA) conjunta para todos os caracteres com desdobramento da interação linhagens x níveis de N e linhagens x níveis de P em cada nível dos nutrientes. Em seguida, as medias genotípicas foram ajustadas, com o auxílio do software SAS (SAS Institute, 2007). A partir das médias genotípicas, foi realizado o mapeamento associativo por meio da análise de marcas simples com base na ANOVA, utilizando o software PowerMarker (LIU e MUSE, 2005). Por meio desta análise, foram determinadas as associações significativas entre marcadores moleculares e as características relacionadas à eficiência na absorção de N e P.

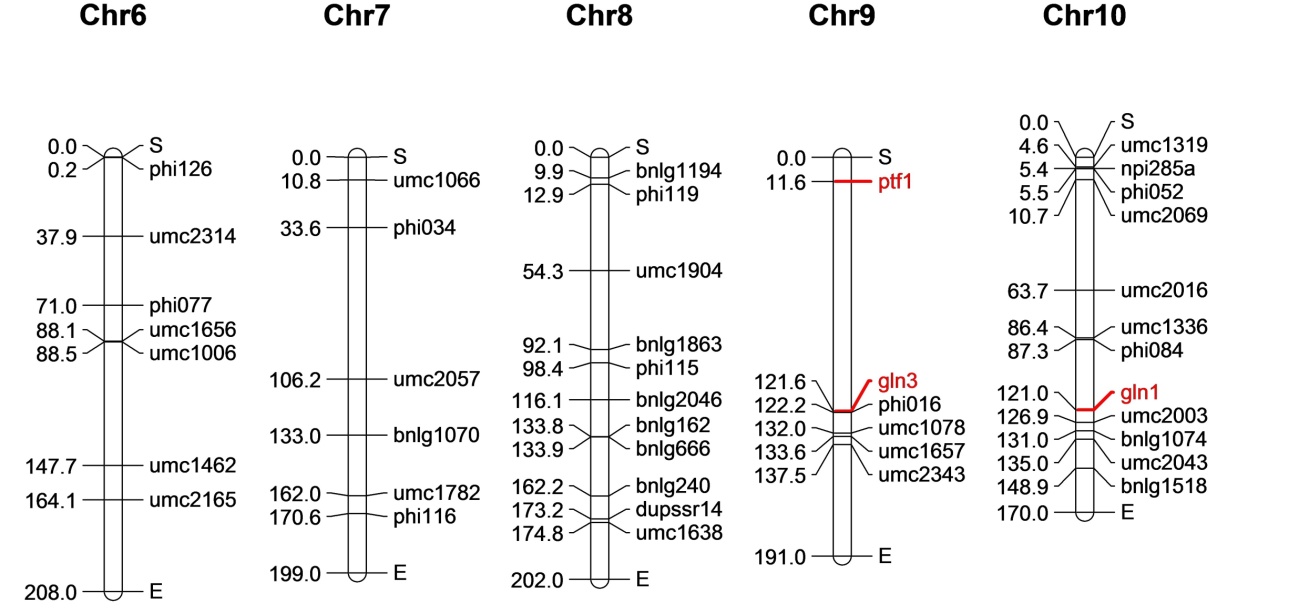
1. **Resultados e discussão**

Dentre os 90 *primers* de microssatélites utilizados para genotipagem das linhagens, apenas 52 marcadores foram considerados na análise de mapeamento associativo. A opção pela escolha destes marcadores baseia-se no fato de os mesmos estarem localizados em cromossomos que contem genes responsáveis pela expressão de caracteres fenotípicos relacionados à eficiência na absorção de N e P e arquitetura de raízes. Estes genes estão descritos na Tabela 1. A Figura 1 apresenta as posições dos genes (em vermelho) e marcadores moleculares (em preto) associados à expressão de características relacionadas à absorção e metabolismo de N e P, distribuídos nos 10 grupos de ligação de milho-pipoca. Pode-se observar que alguns dos genes responsáveis pelos caracteres avaliados estão localizados nos cromossomos 1, 4, 5, 9 e 10. Portanto, apenas os marcadores localizados nestes cromossomos foram considerados na análise de mapeamento associativo.

**Tabela 1** - Descrição de genes candidatos responsáveis pela expressão de características fenotípicas relacionadas à eficiência na absorção de N e P e arquitetura de raízes.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nome | Descrição | Cromossomo | Posição (cM) |
| *rtcs1* | rootless concerning crown and seminal roots1 | 1 | 10.8 |
| *rth1* | roothair defective1 | 1 | 253.9 |
| *rth3* | roothair defective3 | 1 | 47.5 |
| *ptf1* | Pi starvation-induced transcription factor1 | 9 | 11.6 |
| *nnr1* | nitrate reductase(NADH)1 | 4 | 56.3 |
| *nnr2* | nitrate reductase2 | 5 | 211.2 |
| *gln1* | glutamine synthetase1 | 10 | 121.0 |
| *gln2* | glutamine synthetase2 | 1 | 221.7 |
| *gln3* | glutamine synthetase3 | 9 | 121.6 |
| *gln4* | glutamine synthetase4 | 5 | 205.2 |
| *gln5* | glutamine synthetase5 | 4 | 167.1 |





**Figura 1** - Posição dos genes e marcadores moleculares associados à expressão de características relacionadas à absorção e metabolismo de N e P, distribuídos nos 10 grupos de ligação de milho-pipoca.

A análise de mapeamento associativo revelou 44 associações significativas entre marcadores moleculares e os caracteres fenotípicos avaliados no experimento de N (Tabelas 2 e 3) e 34 marcadores associados os caracteres avaliados no experimento de P (Tabelas 4 e 5). O maior número de marcadores associados de forma significativa foi obtido para o CTR em ambos os experimentos, sendo 10 marcadores associados ao CTR no experimento de N e 14 marcadores associados ao CTR no experimento de P. Em relação aos diferentes níveis de cada nutriente, foi observada a existência de 18 marcadores associados aos caracteres fenotípicos em alto N (Tabela 2) e 26 associações significativas em baixo N (Tabela 3).

**Tabela 2** - Marcadores associados (P-valor < 0.05) à eficiência na absorção de nitrogênio (EAbN, mg mg-1), massa de parte aérea (MPAS, mg) e de raízes secas (MRS, mg), comprimento total (CTR, cm) e volume de raízes (VR, cm³), avaliados em 25 linhagens de milho-pipoca em alto nível de N.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Característica | Cromossomo | Posição (cM) | Marcador | P-valor |
| EAbN (mg mg-1) | 1 | 182.9 | umc1590 | 0.0039 |
|  | 1 | 287.5 | phi120 | 0.0200 |
|  | 4 | 165.0 | umc1329 | 0.0043 |
|  | 9 | 132.0 | umc1078 | 0.0100 |
|  | 9 | 133.6 | umc1657 | 0.0352 |
| MPAS (mg) | 1 | 287.5 | phi120 | 0.0132 |
|  | 4 | 37.0 | phi079 | 0.0383 |
|  | 4 | 165.0 | umc1329 | 0.0429 |
|  | 9 | 132.0 | umc1078 | 0.0012 |
|  | 10 | 10.7 | umc2069 | 0.0340 |
|  | 10 | 135.0 | umc2043 | 0.0374 |
| MRS (mg) | 1 | 287.5 | phi120 | 0.0299 |
|  | 4 | 165.0 | umc1329 | 0.0270 |
|  | 9 | 132.0 | umc1078 | 0.0195 |
| CTR (cm) | 1 | 287.5 | phi120 | 0.0180 |
|  | 9 | 132.0 | umc1078 | 0.0417 |
| VR (cm³) | 1 | 287.5 | phi120 | 0.0147 |
|  | 9 | 132.0 | umc1078 | 0.0143 |

**Tabela 3** - Marcadores associados (P-valor < 0.05) à eficiência na absorção de nitrogênio (EAbN, mg mg-1), massa de parte aérea (MPAS, mg) e de raízes secas (MRS, mg), comprimento total (CTR, cm) e volume de raízes (VR, cm³), avaliados em 25 linhagens de milho-pipoca em baixo nível de N.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Caracteristica | Cromossomo | Posição (cM) | Marcador | P-valor |
| EAbN (mg mg-1) | 5 | 4.2 | umc1478 | 0.0133 |
|  | 5 | 14.7 | umc2293 | 0.0251 |
|  | 10 | 135.0 | umc2043 | 0.0171 |
| MPAS (mg) | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0230 |
|  | 5 | 82.5 | umc1110 | 0.0032 |
|  | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0491 |
| MRS (mg) | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0113 |
|  | 1 | 8.4 | umc1363 | 0.0306 |
|  | 1 | 33.0 | bnlg176 | 0.0167 |
|  | 5 | 171.5 | bnlg161 | 0.0240 |
|  | 5 | 82.5 | umc1110 | 0.0121 |
|  | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0382 |
| CTR (cm) | 1 | 235.8 | umc2080 | 0.0235 |
|  | 1 | 33.0 | bnlg176 | 0.0400 |
|  | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0321 |
|  | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0171 |
|  | 5 | 82.5 | umc1110 | 0.0232 |
|  | 5 | 211.8 | umc1153 | 0.0094 |
|  | 5 | 171.5 | bnlg161 | 0.0344 |
|  | 10 | 5.5 | phi052 | 0.0329 |
| VR (cm³) | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0358 |
|  | 5 | 211.8 | umc1153 | 0.0081 |
|  | 5 | 82.5 | umc1110 | 0.0012 |
|  | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0228 |
|  | 5 | 171.5 | bnlg161 | 0.0261 |
|  | 10 | 5.5 | phi052 | 0.0230 |

Para o experimento de P, foram observadas 17 associações significativas em ambos os níveis do nutriente (Tabelas 4 e 5). Os resultados revelaram a existência de maior associação entre marcadores e genes responsáveis pela expressão de caracteres relacionados à absorção e metabolismo de N, em razão alta demanda deste nutriente pela planta. CAI et al. (2012a) e CAI et al. (2012b) avaliaram 218 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) de milho a fim de identificar QTLs para altura de planta, altura de espiga, produtividade de grãos, área foliar, conteúdo de clorofila nas folhas e intervalo de florescimento em condições de baixa disponibilidade de N e P. Estes autores também identificaram um maior número de associações significativas em condições limitantes dos nutrientes, uma vez que uma maior variabilidade genética pôde ser observada nestas condições.

**Tabela 4 -** Marcadores associados (P-valor < 0.05) à eficiência na absorção de fósforo (EAbP, mg mg-1), massa de parte aérea (MPAS, mg) e de raízes secas (MRS, mg), comprimento total (CTR, cm) e volume de raízes (VR, cm³), avaliados em 25 linhagens de milho-pipoca em alto nível de P.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Caracteristica | Cromossomo | Posição (cM) | Marcador | P-valor |
| EAbP (mg mg-1) | 1 | 27.7 | bnlg1083 | 0.0156 |
|  | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0240 |
|  | 4 | 164.9 | bnlg2291 | 0.0251 |
|  | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0257 |
|  | 10 | 87.3 | phi084 | 0.0384 |
| MPAS (mg) | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0345 |
|  | 4 | 164.9 | bnlg2291 | 0.0277 |
|  | 4 | 31.3 | bnlg490 | 0.0262 |
|  | 10 | 87.3 | phi084 | 0.0305 |
| MRS (mg) | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0334 |
| CTR (cm) | 1 | 235.8 | umc2080 | 0.0010 |
|  | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0185 |
|  | 1 | 148.6 | umc1676 | 0.0148 |
|  | 1 | 46.2 | phi001 | 0.0103 |
|  | 4 | 37.0 | phi079 | 0.0079 |
|  | 5 | 82.5 | umc1110 | 0.0146 |
| VR (cm³) | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0329 |

**Tabela 5** - Marcadores associados (P-valor < 0.05) à eficiência na absorção de fósforo (EAbP, mg mg-1), massa de parte aérea (MPAS, mg) e de raízes secas (MRS, mg), comprimento total (CTR, cm) e volume de raízes (VR, cm³), avaliados em 25 linhagens de milho-pipoca em baixo nível de P.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Caracteristica | Cromossomo | Posição (cM) | Marcador | P-valor |
| EAbP (mg mg-1) | 1 | 2.0 | phi056 | 0.0210 |
|  | 1 | 70.8 | bnlg1811 | 0.0255 |
| MPAS (mg) | 1 | 64.9 | umc1144 | 0.0477 |
|  | 1 | 33.0 | bnlg176 | 0.0496 |
| MRS (mg) | 1 | 64.9 | umc1144 | 0.0172 |
|  | 5 | 33.8 | umc1447 | 0.0367 |
|  | 9 | 137.5 | umc2343 | 0.0171 |
| CTR (cm) | 1 | 33.0 | bnlg176 | 0.0338 |
|  | 1 | 32.9 | umc1073 | 0.0359 |
|  | 4 | 213.9 | bnlg292 | 0.0369 |
|  | 5 | 14.7 | umc2293 | 0.0231 |
|  | 5 | 82.5 | umc1110 | 0.0308 |
|  | 9 | 137.5 | umc2343 | 0.0137 |
|  | 9 | 133.6 | umc1657 | 0.0473 |
|  | 9 | 132.0 | umc1078 | 0.0490 |
| VR (cm³) | 1 | 64.9 | umc1144 | 0.0256 |
|  | 9 | 137.5 | umc2343 | 0.0078 |

Em relação a cada nível dos nutrientes, os marcadores moleculares *phi120* e *umc1078* estiveram associados com todos os caracteres avaliados em alto nível de N (Tabela 2), enquanto que em baixo nível de N, os marcadores *umc1073* e *umc1447* apresentaram associação significativa com todos os caracteres, exceto com a EAbN (Tabela 3). Em se tratando dos diferentes níveis de P, os marcadores *umc1073* e *umc1447* estiveram associados à EAbP, MPAS e CTR, e à EAbP, MRS e VR, respectivamente, em alto nível de P (Tabela 4), enquanto que em baixo nível de P, os marcadores *umc1114* e *umc2343* apresentaram associação significativa com MPAS, MRS, CTR e VR (Tabela 5). Os resultados revelam a possibilidade de ganho por seleção direta assistida por marcadores para EAbN em ambiente com alto N e P, uma vez que foram identificados marcadores associados à este caractere nestes ambientes. Por outro lado, em ambiente com baixo nível de N e P, a melhor alternativa é a seleção indireta assistida por marcadores que se associaram com outros caracteres fenotípicos relacionados à EAbN e EAbP. Não foi observado nenhum marcador em comum associado à EAbN ou à EAbP em níveis contrastantes do mesmo nutriente. Entretanto, o marcador *umc1447* apresentou associação significativa com a MRS nos dois níveis de P, e os marcadores *umc1110* e *umc1073* associaram-se significativamente ao CTR em alto e baixo nível de P. Dessa forma, estes marcadores podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores para aumentar a MRS e o CTR nos dois níveis de P.

Os resultados relativos à posição dos marcadores moleculares significativamente associados em relação aos genes de interesse evidenciaram que as menores distâncias foram observadas entre os marcadores *umc1329* e *umc1078* e os genes *gln5* (2.1 cM) e *gln3* (10.4 cM), respectivamente, no experimento de N (Figura 1). Em relação ao experimento de P, as menores distâncias foram observadas entre o marcador *umc1073* e os genes *rtcs1* (22.1 cM) e *rth3* (14.6 cM), e entre o marcador *umc1144* e o gene *rth3* (17.4 cM). Em razão da pequena distância entre estes marcadores e os genes de interesse, é possível realizar seleção assistida por estes marcadores, uma vez que, quanto menor a distância entre o marcador e o gene, menor a chance de ocorrer recombinação.

1. **Conclusões**

Foram verificadas associações significativas entre marcadores moleculares e genes responsáveis pela expressão de caracteres fenotípicos relacionados à eficiência na absorção de N e P. Os marcadores moleculares com menores distâncias em relação aos genes de interesse podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento de milho-pipoca, uma vez que estes marcadores possuem intima associação com tais genes.

1. **Referências Bibliográficas**

BOUMA, T. J.; NIELSON, K. L.; KOUTSTAAL, B. A. S. **Sample preparation and scanning protocol for computerized analysis of root length and diameter.** Plant and Soil, 218: 185-196, 2000.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. **Nitrogen total.** In: PAGE, A. L.; MILLER, L. H.; KEENEY, D. R. (Ed.) **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties.** v.2, p. 595-624, 1982.

CAI H, CHU Q, YUAN L, LIU J, CHEN X, CHEN F, MI G, ZHANG F. **Identification of quantitative trait loci for leaf area and chlorophyll content in maize (*Zea mays*) under low nitrogen and low phosphorus supply.** Mol Breeding 30:251-266, 2012a.

CAI H, CHU Q, GU R, YUAN L, LIU J, ZHANG X, CHEN F, MI G, ZHANG F. **Identification of QTLs for plant height, ear height and grain yield in maize (*Zea mays L.*) in response to nitrogen and phosphorus supply.** Plant Breed 131:502–510, 2012b.

CHEN, J. Y.; XU, L.; CAI, Y. L.; XU, J. **QTL mapping of phosphorus efficiency and relative biologic characteristics in maize (*Zea mays* L.) at two sites**. Plant Soil 313, 251–266, 2008.

CHEN, J. Y.; XU, L.; CAI, Y. L.; XU, J. **Identification of QTLs for phosphorus utilization efficiency in maize (*Zea mays* L.) across P levels.** Euphytica, 167:245-252, 2009.

CHUN, L.; MI, G.; LI, J.; CHEN, F.; ZHANG, F. **Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress.** Plant and Soil*,* 276: 369-382, 2005.

COLLARD, B. C. Y.; JAHUFER, M. Z. Z.; BROUWER, J. B.; PANG, E. C. K. Introdução a marcadores moleculares, mapeamento de locos **controladores de características quantitativas (QTLs) e seleção assistida por marcadores no melhoramento vegetal: conceitos básicos.** Euphytica, 142: 169–196, 2005.

FAGERIA, N. D.; KLUTHCOUSKI, J. **Metodologia para avaliação de cultivares de arroz e feijão para condições adversas de solo**. Brasília: Embrapa-CNPAF, 1980.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; PELÚZIO, J. M.; GALVÃO, J. C. C. **Classificação de populações de milho quanto à eficiência e resposta ao uso de fósforo.** Acta Scientiarum Agronomy, Maringá, v. 32, n. 2, p. 241-246, 2010.

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

FURLANI, A. M. C.; BATAGLIA, O. C.; LIMA, M. **Diferenças entre linhagens de milho cultivadas em solução nutritiva quanto à absorção e utilização de nitrogênio.** Bragantia, Campinas, 44 (2): 599-618, 1985.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. **The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches.** Journal of Experimental Botany 58:2369-2387, 2007.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plant analysis.** Los Angeles, University of California, p. 32-33, 1959.

LI, M.; GUO, X.; ZHANG, M.; WANG, X.; ZHANG, G.; TIAN, Y.; WANG, Z. **Mapping QTLs for grain yield and yield components under high and low phosphorus treatments in maize (*Zea mays* L.).** Plant Science, 178, 454–462, 2010.

LI, M.; GUO, X.; ZHANG, M.; WANG, X.; ZHANG, G.; TIAN, Y.; WANG, Z. **Mapping QTLs for grain yield and yield components under high and low phosphorus treatments in maize (*Zea mays* L.).** Plant Science, 178, 454–462, 2010.

LIU K, MUSE SV. **PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data.** Bioinformatics 21:2128-2129, 2005.

MAIA, C.; DOVALE, J. C.; FRITSCHE-NETO, R.; CAVATTE, P. C.; MIRANDA, G. V. **The difference between breeding for nutrient use efficiency and for nutrient stress tolerance.** Crop BreedAppl Biotechnol, 11:270–275, 2011.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. L.; JACKSON, A. **Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization.** Agronomy Journal, v. 74. 562-564, 1982.

MUNDIM, G. B.; VIANA, J. M. S.; MAIA, C.; PAES, G. P.; DELIMA, R. O. **Genetic diversity and path analysis for nitrogen use efficiency in popcorn inbred lines.** Euphytica, 191, p. 291–299 2013.

PENG, Y.; NIU, J.; PENG, Z.; ZHANG, F.; LI, C. **Shoot growth potential drives N uptake in maize plants and correlates with root growth in the soil.** Field Crops Research, v. 115, p. 85-93, 2010.

SAS INSTITUTE. **The SAS system for Windows, version 9.2.** SAS Institute Inc, Cary, 2007.

SINCLAIR, T. R.; VADEZ, V. **Physiological traits for crop yield improvement in low N and P environments.** Plant and Soil, 245: 1-15, 2002.

SOARES, M. O.; MIRANDA, G. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MARRIEL, I. E.; GUIMARÃES, C. T. **Parâmetros genéticos de uma população de milho em níveis contrastantes de nitrogênio.** Revista Ciência Agronômica, v. 42, n. 1, p. 168-174, jan-mar, 2011.

STICH, B., MELCHINGER, A.E., PIEPHO, H.P., HECKENBERGER, M., MAURER, H.P., REIF, J.C. **A new test for family-based association mapping with inbred lines from plant breeding programs**. Theor Appl Genet 113: 1121-1130, 2006b.

STICH, B., MELCHINGER, A.E. **Comparison of mixed-model approaches for association mapping in rapeseed, potato, sugar beet, maize, and Arabidopsis.** BMC genomics 10: 94, 2009.

STICH, B., MAURER, H.P., MELCHINGER, A.E., FRISCH, M., HECKENBERGER, M., VAN DER VOORT, J.R., PELEMAN, J., SØRENSEN, A.P., REIF, J.C. **Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers**. Molecular Breeding 17: 217-226, 2006a.

STICH, B., MELCHINGER, A.E., PIEPHO, H.P., HAMRIT, S., SCHIPPRACK, W., MAURER, H.P., REIF, J.C. **Potential causes of linkage disequilibrium in a European maize breeding program investigated with computer simulations**. Theor Appl Genet 115: 529-536, 2007.

STICH, B., UTZ, H.F., PIEPHO, H.P., MAURER, H.P., MELCHINGER, A.E. **Optimum allocation of resources for QTL detection using a nested association mapping strategy in maize.** Theor Appl Genet 120: 553-561, 2010.

YANG, X.*et a*l. **Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection**. Theor Appl Genet 121: 417-431, 2010.

YU, J. *et al.* **A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness.** Nature Genetics 38: 203-208, 2006.

ZHU, J.M., KAEPPLER, S.M., LYNCH, J.P. **Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (Zea mays L.) under differential phosphorus supply.** Theor. Appl. Genet., 111, 688–695, 2005.

ZHU, J.M., MICKELSON, S.M., KAEPPLER, S.M., LYNCH, J.P. **Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (Zea mays L.) seedlings grown under differential phosphorus levels.** Theor. Appl. Genet, 113, 1–10, 2006.