

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Associação genômica ampla para caracteres relacionados à
eficiência no uso de nitrogênio em linhagens de milho tropical

Júlia Silva Morosini

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

Júlia Silva Morosini
Engenheira Agrônoma

**Associação genômica ampla para caracteres relacionados à eficiência no uso
de nitrogênio em linhagens de milho tropical**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **ROBERTO FRITSCH NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2017

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Carlos e Olívia, e à
minha irmã, Natália, pelo amor,
incentivo e suporte incondicionais.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as bênçãos que derrama em minha família.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pelas valiosas oportunidades e rica formação. Especialmente ao Departamento de Genética.

Ao Prof. Dr. Roberto Fritsche Neto pela oportunidade, exemplo profissional e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

Aos Professores Dr. Carlos Alberto Labate, Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello e Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira pela significativa contribuição em minha caminhada acadêmica.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Melhoramento de Plantas Alógamas pela convivência harmoniosa e pelo auxílio fundamental em meu projeto de mestrado.

Aos meus amados pais, Carlos Alberto Morosini e Olívia Maria B. S. Morosini, por tudo o que fazem por nossa família, sempre com tanto empenho e determinação. À minha querida irmã Natália Silva Morosini pelo apoio, amizade e preciosos conselhos.

Ao Fernando Garcia Espolador pelo companheirismo na vida acadêmica e pessoal, pelo carinho e apoio constantes e por estar sempre ao meu lado mostrando-me que sou capaz.

Ao Laboratório Max Feffer de Plantas, onde passei quatro anos muito proveitosos durante a graduação e fiz amigos para a vida toda.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos. À FAPESP (processo nº 2013/24135-2) pelo auxílio financeiro para condução do projeto.

A todos aqui não mencionados que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"Caminhante, não há caminho; faz-se caminho ao andar".

Antônio Machado

RESUMO

Associação genômica ampla para caracteres relacionadas à eficiência no uso de nitrogênio em linhagens de milho tropical

A expansão dos locais e da época de cultivo do milho faz com que uma fração significativa da produção do cereal ocorra em condições de estresses abióticos. Grande parte desse cenário edafoclimático remete ao cultivo do milho safrinha, semeado entre janeiro e março e atualmente responsável por 65% da produção total. Dentre os diversos tipos de estresses abióticos, a deficiência de nitrogênio é comum e crítica nos solos brasileiros. Evidencia-se, portanto, a necessidade do desenvolvimento de genótipos mais eficientes no uso de nitrogênio, resultando em benefícios econômicos e ambientais. Caracteres morfofisiológicos podem auxiliar no processo seletivo de genótipos superiores para essas condições, como a mensuração do sistema radicular e a análise da taxa fotossintética. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi identificar regiões do genoma do milho tropical associadas ao comprimento de raiz, à fluorescência de clorofila e ao índice de resposta da planta ao estresse por nitrogênio. Para isto, foram avaliadas 64 linhagens endogâmicas de milho tropical em baixa e alta disponibilidade nitrogênio no solo e em dois locais de cultivo na Região de Piracicaba-SP, nas safras 2014/15 e 2015/16. Foram considerados o comprimento de raiz, a eficiência fotossintética do fotossistema II e o Índice de Tolerância à Baixa disponibilidade de nitrogênio (ITBN). As linhagens foram genotipadas com a plataforma Affymetrix® Axiom® Maize Genotyping Array de 616.201 marcadores SNP. A qualidade da informação genômica foi controlada pelos procedimentos *Minor Allele Frequency* e *Call Rate* e pela eliminação de heterozigotos. Os valores genotípicos foram preditos por meio de equações de modelos mistos do tipo REML/BLUP. Os dados de marcadores moleculares e fenotípicos foram analisados por Associação Genômica Ampla (GWAS). Verificou-se maior comprimento radicular em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. No total, sete marcadores significativos foram identificados, sendo quatro referentes ao ITBN, dois referentes ao comprimento de raiz em disponibilidade ideal e um referente ao comprimento de raiz em disponibilidade baixa do nutriente. Entre os principais processos biológicos identificados através da anotação funcional, estão o controle e regulação da transcrição, detectado para todos os caracteres avaliados, e a síntese de Guanosina Monofosfato Sintetase (GMP), enzima diretamente envolvida na disponibilização e reciclagem de nitrogênio. Também foi observada coincidência de região cromossômica entre marcadores significativos identificados e QTL potencialmente relacionados com a eficiência no uso de nitrogênio já reportados na literatura. Conclui-se que a técnica GWAS apresenta eficiência na detecção de marcadores associados aos caracteres de interesse, neste caso evidenciando processos e funções celulares relacionados aos diferentes processos da síntese e reciclagem de nitrogênio.

Palavras-chave: MAS; Nitrogênio; GWAS; SNP

ABSTRACT

Genome-wide association for characters related to nitrogen use efficiency in tropical maize lines

The expansion of locals and season period of maize crop makes a significant portion of the cereal production to occur under abiotic stress conditions. Much of this environmental scenario refers to the second growing season maize, sowed between January and March and responsible for 65% of total production currently. Among the different types of abiotic stresses, nitrogen deficiency is common and critical in Brazilian soils. Therefore, it becomes necessary to develop genotypes more efficient in nitrogen use, resulting in economic and environmental benefits. Morphophysiological characters may assist in the selective process of superior genotypes for these conditions, such as root system measurement and photosynthetic ratio analysis. In this context, this project aimed to identify tropical maize genomic regions associated with root morphological character, physiological parameter of photosystem II, and with the plant response index to nitrogen stress. To this end, 64 tropical maize inbreeding lines contrasting for nitrogen use efficiency were evaluated in low and ideal soil nitrogen availability in two cultivation sites in the region of Piracicaba-SP, in seasons 2014/15 and 2015/16. The characters root total length, chlorophyll fluorescence, and Low Nitrogen Tolerance index (LNTI) were considered. The lines were genotyped SNP using the Affymetrix® Axiom® Maize Genotyping Array with 616,201 SNP. The quality of the genomic information was controlled by Minor Allele Frequency and Call Rate procedures and by the elimination of heterozygous loci. The genotypic values were predicted using REML/BLUP mixed model equations. Genome-Wide Association Studies (GWAS) was performed to analyze molecular and phenotypic data. Greater root length under low availability nitrogen conditions was verified. In total, seven significant markers were identified, four referring to LNTI, two referring to root length under ideal nitrogen availability and one referring to root length under low nitrogen availability. Among the main biological processes identified through functional annotation are the transcription control and regulation, detected to all evaluated characters, and the synthesis of Guanosine Monophosphate Synthetase (GMP), enzyme directly involved in the provision and recycling of nitrogen. It was also observed coincidence of chromosomal region between significant markers identified and QTLs potentially related in nitrogen use efficiency previously reported. As conclusion, GWAS technique shows efficiency in the detection of markers associated to the characters in focus, in this evidencing cellular processes and functions associated to the different process of nitrogen synthesis and recycling.

Keywords: MAS; Nitrogen; GWAS; SNP

1. INTRODUÇÃO

A expansão dos locais e da época de cultivo do milho (*Zea mays* L.), impulsionada pela crescente demanda mundial por alimentos e pelas mudanças climáticas, faz com que uma fração significativa da produção do cereal ocorra em áreas marginais. Nestas áreas, o cultivo é conduzido em condições estressantes regidas por fatores abióticos decorrentes da baixa fertilidade natural dos solos, insuficiente aplicação de fertilizantes nitrogenados e ocorrência de seca (GIÁCOMO et al., 2015; MONNEVEUX et al., 2005).

Entre os diversos tipos de estresses abióticos, a deficiência de nitrogênio (N) é comum nos solos brasileiros, afetando negativamente o desenvolvimento das plantas e reduzindo a produtividade (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2012). Ademais, a eficiência na adubação nitrogenada geralmente é menor que 50% devido aos processos de perda por volatilização, desnitrificação e lixiviação (GALLAIS; HIREL, 2004). Deste modo, este fator torna-se preponderante na produção de biomassa, de grãos e nos custos de produção do milho (PENG et al., 2013), assim como na segurança alimentar, uma vez que a cultura do milho é a principal consumidora do adubo nitrogenado (IFA, 2013).

Aliado a isso, o cultivo de milho de segunda safra (milho safrinha), o qual ocorre em regiões e épocas com maior frequência de estresses abióticos, demanda fatores mais complexos para o aumento de produtividade (DUARTE; KAPPES, 2015). Ainda assim, este cultivo apresenta taxa de crescimento de 10% ao ano, enquanto o cultivo de primeira safra cresce cerca de 2% ao ano (GALVÃO et al., 2015). Apesar de apresentar menor custo total em relação ao milho de primeira safra, a aplicação de fertilizantes para atingir melhorias na produtividade no milho safrinha representa uma elevada parcela do custo variável de produção, chegando a 30% no Estado de Mato Grosso (IMEA, 2016) e até 38% em São Paulo (PECCHIO, 2015).

Por meio do melhoramento genético, é possível desenvolver cultivares de milho mais eficientes no uso de nitrogênio (EUN), ou seja, que produzam mais ou a mesma quantidade de grãos, com menor demanda por N. O aumento da EUN não implica apenas benefícios econômicos, mas também reduz a poluição ambiental. As perdas de N por lixiviação de nitrato chegam a 6% (PEDROSA, 2013), enquanto que as por volatilização podem ultrapassar 50% do total aplicado na cultura (TASCA et al., 2011).

Trabalhos com melhoramento para a EUN já vêm sendo realizados, simultaneamente, em condições ótimas e estressantes de cultivo, através da utilização de índices que reúnem o desempenho dos genótipos nos dois ambientes. Um importante índice

nesse contexto é o Índice de Tolerância à Baixa Disponibilidade de Nitrogênio (ITBN), proposto por Miti et al. (2010). Este relaciona a produtividade de grãos nas duas condições (disponibilidade ideal e baixa), obtendo o percentual de redução da produtividade do ambiente estressante em relação ao ambiente ótimo. Este índice vai ao encontro do conceito de tolerância ao estresse, sendo que, quanto menor a perda de produtividade da condição estressante para a ótima, menor será o valor do índice e maior será a tolerância da planta ao estresse.

Neste contexto, caracteres relacionados à morfologia do sistema radicular podem fornecer informações relevantes sobre a eficiência no uso do nitrogênio em genótipos de milho (MAJEROWICZ et al., 2002). Isto porque o sistema radicular exerce papel essencial na captação do nitrogênio via água (HORST et al., 2003; MACKAY; BARBER, 1986; SATTELMACHER et al., 1990). Assim, sob estresse nutricional ou hídrico, por exemplo, um maior desenvolvimento radicular pode auxiliar a obter o nutriente em camadas de solo mais profundas e, dessa forma, evitar a deficiência de nitrogênio (CHUN et al., 2005). Entretanto, a influência genética de caracteres de raiz na eficiência no uso do nitrogênio ainda é pouco conhecida, tanto a nível fenotípico como genômico.

Além destes, caracteres fisiológicos também podem exercer contribuição importante para a seleção de genótipos eficientes no uso de nitrogênio. A análise de taxa fotossintética, por exemplo, pode ser um indicador de uma planta com alta ou baixa eficiência na absorção e utilização de N, dada a participação direta do nitrogênio na síntese de Rubisco e clorofila (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

A avaliação de genótipos em relação à EUN através desses caracteres por métodos tradicionais pode ser muito informativa, mas se baseia em análise destrutiva dos órgãos vegetais envolvidos na maioria das vezes, o que implica alta demanda de tempo e custo, além de alta contribuição de efeitos ambientais nos resultados, indesejados em programas de melhoramento (VARSHNEY et al., 2011). Esses desafios tornam a seleção precoce direta uma alternativa atrativa para essas características morfofisiológicas, pois permite a realização de seleção de forma rápida, com menor custo e com maximização do ganho de seleção (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011).

Assim, em conjunto com uma caracterização morfofisiológica, a caracterização detalhada dos genótipos com base em dados moleculares pode contribuir estrategicamente para otimizar a utilização do germoplasma disponível em programas de melhoramento de milho (ROMAY et al., 2013), assim como para o entendimento da base genética de caracteres de interesse. Para isso, os estudos de associação genômica ampla (GWAS – *Genome-wide*

Association Studies) representam um método de alta resolução para mapear *loci* quantitativos com base em desequilíbrio de ligação (LD) (DHANAPAL et al., 2015). Essa abordagem estima a associação entre locos e o caráter fenotípico em nível populacional por meio de testes de hipóteses visando detectar efeitos de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) significativos.

Em milho, dado o rápido decaimento do LD (aproximadamente 2 kb) e a grande diversidade genética, o GWAS evidencia-se como um método acurado para identificação de genes específicos. Prova disso é que a metodologia GWAS vem sendo extensivamente usada em estudos genéticos de plantas para condições de estresses abióticos (BOUCHET et al., 2013; XUE et al., 2013; ZHANG et al., 2013) e características agronomicamente importantes do milho, como arquitetura foliar (TIAN et al., 2011), concentração e composição do óleo da semente (LI et al., 2013), resistência a doenças (GOWDA et al., 2015; MAMMADOV et al., 2015), desenvolvimento radicular (PACE et al., 2015) e altura de planta (PEIFFER et al., 2014).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Identificar regiões do genoma do milho tropical associadas a caracteres morfológicos de raiz, a parâmetros fisiológicos do fotossistema II e ao índice de resposta da planta ao estresse por nitrogênio.

1.1.2. Objetivos específicos

- Identificar marcadores SNP associados a índice de resposta da planta ao estresse por nitrogênio e a caracteres de morfologia de raiz e fisiologia do fotossistema II;
- Fazer a anotação funcional dos SNP identificados como significativos e identificar possíveis fatores moleculares que controlam estas características.
- Comparar a coincidência e/ou localização das marcas significativas nos diferentes caracteres no genoma, assim como possíveis relações genômicas entre elas.

6. CONCLUSÃO

- As análises de GWAS evidenciaram associações significativas para os caracteres relacionados com eficiência no uso de nitrogênio em milho tropical, sendo que alguns SNP detectados localizam-se em regiões já reportadas na literatura, evidenciando a acurácia da análise e a importância dessas regiões genômicas.
- Dentre os principais processos biológicos identificados por meio da anotação funcional, está o controle e regulação da transcrição, detectado para todos os caracteres avaliados, e a síntese de GMP, enzima diretamente envolvida na disponibilização e reciclagem de N.
- Utilizando-se apenas os SNP identificados, não seria possível realizar seleção com acurácia para EUN. No entanto, esses marcadores podem auxiliar no processo seletivo ao serem usados como fatores de efeito fixo no modelo genético-estatístico.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANI, A. H. et al. Genotypic variation and relationships between seedling and adult plant traits in maize (*Zea mays* L.) inbred lines grown under contrasting nitrogen levels. **Euphytica**, v. 189, p. 123–133, 2013.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. et al. MADS-box Gene Evolution Beyond Flowers: Expression in Pollen, Endosperm, Guard Cells, Roots and Trichomes. **The Plant Journal**, v. 24, p. 457-466, 2000.
- ATLIN, G. N.; FREY, K. J. Breeding crop varieties for low-input agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 2, p. 53-66, 2000.
- Bernardo R.; YU, J. Prospects for genome wide selection for quantitative traits in maize. **Crop Science**, v. 47, p. 1082-1090, 2007.
- BOOMSMA, C. R. Maize per plant and canopy-level morpho-physiological responses to the simultaneous stresses of intense crowding and low nitrogen availability. **Agronomy Journal**, v. 101, p. 1426–1452, 2009.
- BOUCHET, S. et al. Adaptation of Maize to Temperate Climates: Mid-Density Genome-Wide Association Genetics and Diversity Patterns Reveal Key Genomic Regions, with a Major Contribution of the Vgt2 (ZCN8) Locus. *Plos One*, v. 8, e71377, 2013.
- BRADBURY, P. J. et al. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2633-2635, 2007.
- CECARELLI, S. Adaptation to low/high input cultivation. **Euphytica**, v.92, p.203-214, 1996.
- CHAO, D. et al. Sphingolipids in the Root Play an Important Role in Regulating the Leaf Ionome in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 23, p. 1061–1081, 2011.
- CHUN, L. et al. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. *Plant and Soil*, v. 276, p. 369-382, 2005.
- CIAMPITTI, I. A.; VYN, T. J. A comprehensive study of plant density consequences on nitrogen uptake dynamics of maize plants from vegetative to reproductive stages. **Field Crops Research**, v.121, p.02-18, 2011.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, segundo levantamento, novembro 2016**. Brasília: CONAB, 2016. 156 p.
- COOK, J. P. et al. Genetic Architecture of Maize Kernel Composition in the Nested Association Mapping and Inbred Association Panels. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 824-834, 2012.

- CORSOUL, S. et al. Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. **Nature**, v. 423, p. 651-654, 2003.
- COSTA, C. et al. Root morphology of contrasting maize genotypes. **Agronomy Journal**, v. 94, p. 96–101, 2002.
- CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiology*, v. 40, p. 1187-1193, 1999.
- DAMATTA, F. M. et al. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Science**, v. 128, n. 01, p. 43-50, 1997.
- DHANAPAL, A. P. et al. Genome-Wide Association Analysis of Diverse Soybean Genotypes Reveals Novel Markers for Nitrogen Traits. **The Plant Genome**, v. 8, n. 3, 2015.
- DOVALE, J. C. et al. Efeitos gênicos de caracteres associados à eficiência no uso de nitrogênio em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 385-392, 2012.
- DOVALE, J. C. et al. Melhoramento para eficiência no uso de nitrogênio. In: FRITSCHENETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. p. 81-99.
- DUARTE, A. P. Milho safrinha: características e sistema de produção. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2008. p. 109-138.
- DUARTE, A. P.; KAPPES, C. Evolução dos sistemas de cultivo de milho no Brasil. **Informações Agrônomicas**, n. 152, p. 15-18, 2015. INPI.
- DUBOIS, F. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 565-576, 2003.
- DUNN, T. M. et al. A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, v. 93, p. 483-497, 2004.
- EGHBALL, B.; MARANVILLE, J. W. Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and N stress. **Agronomy Journal**, v. 85, p. 147–152, 1993.
- EISENBERG, D. Structure–function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 122-145, 2000.
- EMBRAPA. **Cultivo do milho**. Disponível em: < <https://www.spo.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 29 julho de 2016.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403 p.

- FARFAN, I. D. B. et al. Genome wide association study for drought, aflatoxin resistance, and important agronomic traits of maize hybrids in the sub-tropics. **Plos One**, 10(2):e0117737, 2015.
- FIDELIS, R. R. et al. Fontes de germoplasma de milho para estresse de baixo nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 3, p. 147-153, 2007.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 250 p.
- FRITSCHÉ-NETO, R. et al. Herança de caracteres associados à eficiência de utilização do fósforo em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 465-471, 2010.
- FRITSCHÉ-NETO, R. et al. Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho. **Ceres**, v. 59, p. 794-802, 2012.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance**. 1th ed. Heidelberg: Springer, 2012. 172 p.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 295-306, 2004.
- GALVÃO, J. C. C.; TROGELLO, E.; PEREIRA, L. P. L. Milho segunda safra. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. **Milho do plantio à colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2015. p. 207-223.
- GAUDIN, A. C. M. et al. Novel temporal, fine-scale and growth variation phenotypes in roots of adult-stage maize (*Zea mays* L.) in response to low nitrogen stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 2122-2137, 2011.
- GIÁCOMO, R. G.; PEREIRA, M.G.; GUARESCHI, R.F.; MACHADO, D.L. Atributos químicos e físicos do solo, estoques de carbono e nitrogênio e frações húmicas em diferentes formações vegetais. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 617-631, 2015.
- GILMOUR, A. R. et al. **ASReml user guide release 3.0**. Hemel Hempstead: VSN International, 2009. 398 p.
- GORE, M. A. et al. A First-Generation Haplotype Map of Maize. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1115-1117, 2009.
- GOWDA, M. et al. Genome-wide association and genomic prediction of resistance to maize lethal necrosis disease in tropical maize germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 10, p. 1957–1968, 2015.
- HORST, W. J. et al. Genotypic differences in nitrogen use-efficiency in crop plants. In: LYNCH, J. M., SCHEPERS, J. S., ÜNVER, I (eds). **Innovative Soil–Plant Systems for Sustainable Agricultural Production**. Paris: OECD Publishing, 2003. p. 75–92.

- IFA – INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION. **Assessment of fertilizer use by crop at the global level**. Paris: IFA, 2013. 10 p.
- IMEA – Instituto Mato-Grossense de Economia Agropecuária. **Custo de produção de soja e de milho-safras**: Mato Grosso. Cuiabá, 2016. Disponível em: <<http://www.imea.com.br>>. Acesso em: 30 de setembro de 2016.
- KANT, S. et al. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, vol. 62, n. 4, p. 1499–1509, 2011.
- KNUEPPEL, S. et al. **Package ‘HapEstXXR’- Multi-Locus Stepwise Regression (MSR)**. 2015. 23 p.
- KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. **Plant Methods**, v. 9, p. 29, 2013.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 39-46, 2001.
- LEA, P. J; IRELAND, R. J. Plant amino acids. In: SINGH, B. K, ed. **Nitrogen metabolism in higher plants**. New York: Marcel Dekker Inc, 1999. p. 1-47.
- LI, H. et al. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels. **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 43–50, 2013.
- LINKOHR, B. I. et al. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 29, p.751–760, 2002.
- LIU, N. et al. Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Genes for Starch Content Regulation in Maize Kernels. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 1046, 2016.
- LIU, X. et al. Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome-Wide Association Studies. **Plos One**, 12(2):e1005767, 2016.
- LYNCH, D. V.; DUNN, T. M. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. **New Phytologist**, v. 161, p. 677-702, 2004.
- MACKAY, A. D.; BARBER, S. A. Effect of nitrogen on root growth of two corn genotypes in the field. **Agronomy Journal**, v. 78, p. 699–703, 1986.
- MAJEROWICZ, N. et al. Estudo da eficiência de uso do N em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, p.129-136, 2002.
- MAMMADOV, J. et al. Combining powers of linkage and association mapping for precise dissection of QTL controlling resistance to gray leaf spot disease in maize (*Zea mays* L.). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2015.

- MEDICI, L. O. et al. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, v. 31, p. 1-9, 2004.
- MICHAELSON, L. V. et al. Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 1329–1335, 2016.
- MITI, F.; TONGOONA, P.; DERERA, J. S1 selection of local maize landraces for low soil nitrogen tolerance in Zambia. **African Journal of Plant Science**, v. 4, p.67-81, 2010.
- MONNEVEUX, P.; ZAIDI, P. H.; SANCHEZ, C. Population Density and Low Nitrogen Affects Yield-Associated Traits in Tropical Maize. **Crop Science**, vol. 45, p. 535-545, 2005.
- MORAIS, P. P. P. Eficiência no uso de nitrogênio ao longo dos estádios fenológicos e utilização de dados públicos na seleção genômica de milho tropical. 2016. 78 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.
- MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.
- PACE, J. et al. Genome-wide association analysis of seedling root development in maize (*Zea mays* L.). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 16-47, 2015.
- PECCHIO, M. S. Sistemas de produção do milho safrinha no Médio Vale Paranapanema, estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 13., 2015. **Anais...** Maringá: UEM/IAPAR/EMAER, 2015. p. 592-602.
- PEDROSA, A. W. **Eficiência da adubação nitrogenada ao consórcio entre cafeeiro e *Brachiaria brizantha***. 2013. 74 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- PEIFFER, J. A. et al. The genetic architecture of maize height. **Genetics**, v. 196, n. 4, p. 1337–1356, 2014.
- PENG, Y.; YU, P.; LI, X.; LI, C. Determination of the critical soil mineral nitrogen concentration for maximizing maize grain yield. **Plant and Soil**, v. 372, p. 41-51, 2013.
- PETROBRAS. Petróleo Brasileiro S.A. **Análise do Mercado de Fertilizantes**, 2009. Disponível em: <<http://www.cetem.gov.br/agrominerais/livros/AnaliseMercado.pdf>>. Acesso em 03 de setembro de 2016.
- PNUELI, L. et al. Isolation of the tomato AGAMOUS Gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. **Plant Cell**, v. 6, p. 163-173, 1994.
- R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014.

- RAFALSKY, J. A. Association genetics in crop improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 174-180, 2010.
- REICHMANN, J., MEYEROWITZ, E. MADS-domain Proteins in Plant Development. **Biology Chemistry**, v. 378, p. 1079-1101, 1997.
- RESENDE, M. D. Seleção Genômica Ampla (GWS). In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. ed. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde de Rio Branco: Suprema, 2013. 336 p.
- RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 3, p. 182–194, 2007.
- ROMAY, M. et al. Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. **Genome Biology**, v.14, R55, 2013.
- SANT'ANNA, G. C. **Relação da estrutura genética com a eficiência no uso de nitrogênio e com a acurácia de GWAS em milho tropical**. 2015. 77 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- SATTELMACHER, B.; KLOTZ, F.; MARSCHNER, H. Influence of the nitrogen level on root growth and morphology of two potato varieties differing in nitrogen acquisition. **Plant Soil**, v. 123, p. 131–137, 1990.
- SAUCEDO-GARCIA, M. et al. MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 191, p. 943-957, 2011.
- SCHNABLE, P. S. et al. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics . **Science**, v. 326, p. 1112-1115, 2009.
- SINCLAIR, T. R.; GARDNER, F. P. Environment limits to plant production. In: SINCLAIR, T. R.; GARDNER, F. P. **Principles of ecology in plant production**. New York: CAB International, 1998. p. 63-78.
- SMITH, C. SIMPSON, S. P. The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 103, p. 205-217, 1986.
- SOUZA, L. V. et al. Combining ability of maize grain yield under different levels of environmental stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1297-1303, 2009.
- SOUZA, L. V. et al. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1517-1523, 2008.
- STELPFLUG, S. C. et al. An expanded maize gene expression atlas based on RNA-sequencing and its use to explore root development. **The Plant Genome**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2016.

- STEPONKUS, P. L.; LYNCH, D. Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 21, p. 21-41, 1989.
- TASCA, F. A. et al. Volatilização de amônia no solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p.493-502, 2011.
- THEISSEN, G.; KIM, J.; SAEDLER, H. Classification and Phylogeny of the MADS-box Multigene Family Suggest Defined Roles of MADS-box Gene Subfamilies in the Morphological Evolution of Eukaryotes. **Journal Molecular Evolution**, v. 43, p. 484-516, 1996.
- TIAN, F. et al. Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. **Nature Genetics**, v. 43, p. 159-162, 2011.
- TOALDO, D. et al. Selection in early generations and the occurrence of heterosis for the character root distribution. **Euphytica**, v. 190, p. 335–344, 2013.
- UEMURA, M.; JOSEPH, R. A.; STEPONKUS, P. L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). **Plant Physiology**, v. 109, p. 15-30, 1995.
- UNTERSEER, S. et al. A powerful tool for genome analysis in maize: development and evaluation of the high density 600k SNP genotyping array. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 823, 2014.
- VANRADEN, P. M. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 11, p. 4414–4423, 2008.
- VARSHNEY, R. K. et al. Genomics and physiological approaches for root trait breeding to improve drought tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) In: OLVEIRA, A. C.; VARSHNEY, R. K. Root Genomics. Heidelberg: Springer, 2011. cap. 10, p. 233-250.
- WANG, Q. et al. A SUPER Powerful Method for Genome Wide Association Study. **Plos One**, v. 9, n. 9, e107684, 2014.
- WANG, Y. Response of root morphology to nitrate supply and its contribution to nitrogen accumulation in maize. **Journal of Plant Nutrition**, v. 27, p. 2189– 2202, 2004.
- WHITT, S. R.; BUCKLER, E. S. Using natural allelic diversity to evaluate gene function. **Methods in Molecular Biology**, v. 236, p. 123-140, 2003.
- WORRALL, D. et al. Involvement of sphingosine kinase in plant cell signaling. **The Plant Journal**, v. 56, p. 64-72, 2008.

- WU, Y. et al. Low-nitrogen stress tolerance and nitrogen agronomic efficiency among maize inbreds: comparison of multiple indices and evaluation of genetic variation. **Euphytica**, Amsterdam, v. 180, p. 281-290, 2011.
- XIE, L. J. et al. Unsaturation of very-long-chain ceramides protects plant from hypoxia-induced damages by modulating ethylene signaling in Arabidopsis, **Plos Genetics**, v. 11, e1005143, 2015.
- XU, Y. F. et al. Mapping QTLs for yield and nitrogen-related traits in wheat: influence of nitrogen and phosphorus fertilization on QTL expression. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, n. 1, p. 59-72, 2014.
- XUE, Y. et al. Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 2587–2596, 2013.
- ZHANG, X. et al. Identification of Major QTL for Waterlogging Tolerance Using Genome-Wide Association and Linkage Mapping of Maize Seedlings. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, p. 594–606, 2013.
- ZONTA, E. et al. O sistema radicular e suas interações com o ambiente edáfico. In: FERNANDES, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 7-52.