



JOSÉ MARIA VILLELA PÁDUA

**CONTROLE GENÉTICO DA INCIDÊNCIA DE
FUMONISINAS EM MILHO TROPICAL**

LAVRAS – MG

2015

JOSÉ MARIA VILLELA PÁDUA

**CONTROLE GENÉTICO DA INCIDÊNCIA DE FUMONISINAS EM
MILHO TROPICAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção de título de Doutor.

Orientador

Dr. João Cândido de Souza

Coorientadores

Dr. Lauro José Moreira Guimarães

Dra. Maria Marta Pastina

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pádua, José Maria Villela.

Controle genético da incidência de fumonisinas em milho
tropical / José Maria Villela Pádua. – Lavras : UFLA, 2015.
75 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.
Orientador: João Cândido de Souza.
Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Micotoxinas. 3. Dialelo. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

JOSÉ MARIA VILLELA PÁDUA

**CONTROLE GENÉTICO DA INCIDÊNCIA DE FUMONISINAS EM
MILHO TROPICAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção de título de Doutor.

APROVADA em 03 de agosto de 2015.

Dr. Magno Antonio Patto Ramalho	UFLA
Dr. Adriano Teodoro Bruzi	UFLA
Dr. Lauro Jose Moreira Guimaraes	EMBRAPA Milho e Sorgo
Dra. Maria Marta Pastina	EMBRAPA Milho e Sorgo

Dr. João Cândido de Souza
Orientador

LAVRAS – MG
2015

À minha família e a Deus pela dádiva da vida,

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva de me conceder a alegria de viver.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o doutorado e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Maria e João Marcos, pelos ensinamentos e principalmente pelo exemplo de vida e aos meus irmãos pelo apoio.

A minha avó, Dona Aparecida, pelo exemplo de dedicação e perseverança.

A Priscilla, minha esposa, pelo amor, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Ao eterno orientador, Magno, por todo apoio e ensinamentos desde a graduação e principalmente pela perseverança e dedicação à profissão.

Ao João Cândido, pela importante orientação do doutorado.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Lauro Guimarães e Maria Marta, pelo apoio na realização do projeto de tese e pela amizade.

Ao professor Adriano Bruzi, pelas valiosas contribuições nos projetos realizados durante o doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, que com dedicação se empenham em formar mais do que pós-graduados, verdadeiros cidadãos.

Ao grupo do milho, em especial aos colegas Kaio e Bia, pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas Samira, Camila, Suellen, Fran, Bruna, Rafael, Braúlio, Vavá, Chico, Samuel, Istalone, Indalecio, pelos momentos de descontração e estudos.

Aos demais colegas de Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela amizade e ajuda.

Às funcionárias do Departamento de Biologia, Zélia, Rafela, Lilian, Irondina e Dú (*in memoriam*), pela amizade e ajuda com tudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADO.

RESUMO

Devido ao desenvolvimento de fungos patogênicos na espiga, a ocorrência de grãos ardidos em milho traz não somente perdas diretas com a redução da produtividade e qualidade dos grãos, mas também perdas indiretas, com a incidência de micotoxinas que são substâncias tóxicas aos humanos e aos animais. Dentre as diferentes micotoxinas que ocorrem em milho, destacam-se as fumonisinas, devido à sua alta toxicidade e ampla disseminação nos grãos colhidos no Brasil. As fumonisinas são produzidas principalmente pelo fungo *Fusarium verticillioides* e, apesar de sua importância, não existem relatos sobre o controle genético da incidência dessas micotoxinas em milho tropical. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o controle genético da incidência de fumonisinas em milho tropical, a partir de um dialelo completo sem cruzamentos recíprocos. Para isso, foram identificadas 13 linhagens contrastantes, considerando-se diferentes grupos heteróticos. Os híbridos obtidos foram avaliados em três experimentos, sendo dois em Sete Lagoas e um em Goiânia, utilizando delineamento experimental de blocos completos casualizados com duas repetições. As avaliações quanto à incidência de fumonisinas nos grãos de milho foram realizadas em laboratório, segundo o protocolo proposto por VICAM (VICAM SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1998). Com base na abordagem de modelos mistos, foram realizadas análises dialélicas individuais para cada experimento e conjunta. Na análise dialélica conjunta, foram comparados diferentes modelos para as matrizes de variância-covariância genética (**G**) e residual (**R**), com a incorporação das informações de parentesco aditivo entre linhagens. A precisão experimental, aferida pela acurácia seletiva, foi considerada adequada em todas as análises. Com base nos resultados desse trabalho, foi possível constatar que a incidência de fumonisinas em grãos de milho tropical apresenta controle genético com predominância de efeitos não aditivos.

Palavras-chave: *Zea mays*. Micotoxinas. Dialelo.

ABSTRACT

Due to the development of pathogenic fungi in the ear, the occurrence of grain rot in maize not only brings direct losses in yield and grain quality, but also brings indirect losses with the incidence of mycotoxins, which are toxic to humans and animals. Among the different mycotoxins occurring in maize, the fumonisins need special attention, due to their high toxicity and wide dissemination throughout Brazil. Fumonisins are produced mainly by the fungus *Fusarium verticillioides* and, despite their importance, there are no reports about the genetic control for the incidence of these mycotoxins in tropical maize. Thus, this study aimed to investigate the genetic control of the incidence of fumonisins in tropical maize, through a complete diallel design with no reciprocal crosses. The single-cross hybrids were evaluated in three experiments, two in Sete Lagoas and one in Goiânia, in a randomized complete block design with two replications. The incidence of fumonisins in maize kernels were evaluated in laboratory, according to the protocol proposed by VICAM (VICAM SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1998). Based on the mixed model approach, individual, for each experiment, and joint diallel analyzes were performed. In the joint diallel analysis, different models for the genetic (**G**) and residual (**R**) variance-covariance matrices were compared, including the additive genomic relationship matrix for lines. Experimental accuracies, measured by the index of selective accuracy, were considered adequate in all analyzes. Based on the results of this study, it was possible to infer that there is a predominance of non-additive effects in the genetic control of the incidence of fumonisins in tropical maize.

Key words: *Zea Mays*, mycotoxins, diallel.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Dendrograma obtido a partir da matriz de relacionamento genético entre as linhagens do dialelo, com base em dados de 10.439 marcadores SNP obtidos via GBS52
- Figura 2 Erros de predição associados aos BLUP da capacidade geral de combinação obtidos para as análises dialélicas implícita conjunta, para os ambientes de Sete Lagoas, na área da fitopatologia e pivô, e para Goiânia, antes (modelo 1) e após (modelo 2) o ajuste das matrizes **G** e **R**, e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo entre linhagens do dialelo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho55
- Figura 3 Valores BLUP da capacidade geral de combinação, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após o ajuste das matrizes **G** e **R**, e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho58
- Figura 4 Valores BLUP da capacidade específica de combinação, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após ajustadas as matrizes **G** e **R**, e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho.....59
- Figura 5 Médias BLUP dos híbridos, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após ajustadas as matrizes **G** e **R**, e também, com a incorporação das matrizes de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos do modelo de Griffing (1956)	26
Tabela 2	Descrição das linhagens utilizadas para compor o dialelo.....	34
Tabela 3	Estimadores dos componentes de variância.....	45
Tabela 4	Componentes de variância e coeficientes de acurácia seletiva obtidos a partir das análises dialélicas individuais para cada ambiente para a concentração de fumonisinas (ppm) em grãos de milho	48
Tabela 5	Componentes de variância e coeficiente de acurácia seletiva obtidos a partir da análise dialélica conjunta para a concentração de fumonisinas em grãos de milho	49
Tabela 6	Número de SNPs antes e após a aplicação de filtros para o controle de qualidade dos dados de marcadores moleculares	51
Tabela 7	Componentes de variância e coeficiente de acurácia seletiva obtidos a partir da análise dialélica implícita conjunta, com o ajuste de estruturas para as matrizes G e R , e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo entre linhagens do dialelo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho.	54
Tabela 8	Correlações entre os ambientes para os valores BLUP da capacidade específica de combinação, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após ajustadas as matrizes G e R , e também, com a incorporação das matrizes de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho.....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Grãos ardidos na cultura do milho	15
2.2	Micotoxinas em milho	18
2.2.1	Fumonisinias	21
2.3	Estudo do controle genético de características de interesse agrônômico em milho	23
2.3.1	Controle genético da incidência de fumonisinias em milho	28
2.4	Modelos mistos no melhoramento de plantas	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Material genético	34
3.2	Experimentos	35
3.3	Condução dos experimentos	36
3.4	Genotipagem das linhagens	37
3.5	Análise dos dados	40
3.5.1	Obtenção dos componentes de variância	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que podem causar redução na produtividade de grãos na cultura do milho (*Zea mays* L.). Entre os principais fatores bióticos responsáveis por tal redução, a ocorrência de doenças fúngicas merece destaque. Dentre os patógenos presentes na cultura do milho no Brasil, os fungos causadores dos grãos ardidos têm grande importância, pois, além de serem encontrados nas diferentes regiões produtoras, estão presentes em todas as safras de cultivo. As perdas causadas por esses fungos podem ser divididas em perdas diretas e indiretas. No caso das perdas diretas, podem ser citadas as reduções da produtividade e da qualidade dos grãos, além da redução do preço pago pelo produto (MENDES, 2009). Já no caso das perdas indiretas, o principal problema é a presença de substâncias que são, na maioria das vezes, tóxicas aos humanos e aos animais, denominadas micotoxinas (AIDOO, 1993).

As condições predisponentes para o aparecimento do patógeno são o clima úmido, o mau empalhamento das espigas e também injúrias causadas nas espigas (REID et al., 1996; SHURTLEFF, 1992). As chuvas frequentes no final do desenvolvimento da cultura, principalmente em lavouras com cultivares que apresentam espigas não decumbentes, também contribuem para o aparecimento da doença. Outros agravantes, que têm influência direta na incidência do patógeno, são: a prática da monocultura, o plantio direto e a ampliação das épocas de cultivo (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; KIMATI; CARDOSO; BERGAMIN FILHO, 1980).

O controle das micotoxinas está relacionado, principalmente, ao controle do patógeno causador de grãos ardidos no campo, devido à sua alta correlação com a incidência de micotoxinas (ROBERTSON et al., 2006). Porém a eficiência de alternativas para o controle de fungos de espigas, como o controle químico, adubação equilibrada, rotação de culturas, controle de insetos, colheita

precoce, transporte rápido e secagem, é baixa (MENDES, 2009). Portanto, a utilização de híbridos resistentes a fungos causadores de grãos ardidos é a forma mais eficiente de se tentar controlar o aparecimento das micotoxinas.

Apesar da importância atribuída às fumonisinas, existem poucos relatos sobre o controle genético da incidência de fumonisinas na cultura do milho, e, além disso, os trabalhos já disponíveis foram realizados com milho temperado (HUNG; HOLLAN, 2012; SANCHEZ-RANGEL; SANJUAN-BADILLO; PLASENCIA, 2005; WILLIAMS; WINDHAM, 2009). O conhecimento da natureza e da magnitude dos efeitos genéticos – aditivos e de dominância - que controlam essa característica na cultura do milho é de grande importância nos programas de melhoramento, pois essas informações podem ser utilizadas pelos melhoristas para a tomada de decisões sobre as estratégias de melhoramento a serem utilizadas.

Existem diversos procedimentos que podem ser utilizados para a obtenção das estimativas dos componentes de variância genética. Entre estes, para realizar as análises e obter as estimativas dos efeitos genéticos, uma possibilidade é a utilização de modelos mistos (PIEPHO; MOHRING; MELCHINGER, 2008). Esse procedimento apresenta como vantagens a possibilidade de obter as estimativas mesmo com dados desbalanceados (perda de informação), bem como permite a incorporação de informações de parentesco nas análises (BERNARDO, 2010). Além das vantagens citadas anteriormente, na abordagem de modelos mistos também é possível comparar o ajuste de diferentes estruturas para as matrizes de variância e covariância genética (matriz G) e residual (matriz R), permitindo que se modelem as correlações entre os ambientes, para que o melhor modelo seja selecionado para a obtenção de estimativas que apresentem uma maior precisão (BURGUENO et al., 2012).

Tendo em vista, que atualmente são escassos os estudos publicados sobre os efeitos genéticos da incidência de fumonisinas em milho tropical, este

trabalho teve como objetivo obter informações sobre o controle genético desta característica em milho tropical, e avaliar diferentes modelos, com a incorporação da informação de parentesco aditivo, e também, com diferentes estruturas de variâncias e covariâncias (VCOV) genética e residual, para a obtenção das estimativas das capacidades gerais e específicas de combinação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Grãos ardidos na cultura do milho

Existem diversos fatores bióticos e abióticos que contribuem para a redução da produtividade de grãos na cultura do milho. Entre os fatores bióticos estão: a ocorrência de vírus, bactérias, fungos e determinados tipos de pragas. É preciso salientar que o principal estresse biótico que afeta a produtividade de grãos do milho no país, se dá pela ocorrência de doenças causadas por fungos (KIMATI; CARDOSO; BERGAMIN FILHO, 1980). Além da redução na produtividade, essas doenças fazem com que, na maioria dos casos, o custo de produção da cultura aumente expressivamente. Entre as doenças fúngicas da cultura do milho, as podridões de espigas e de grãos são encontradas nas diferentes regiões produtoras e em todas as safras de cultivo, sendo responsáveis, por perdas diretas e indiretas. Entre as perdas diretas, estão: a redução da produtividade de grãos, redução da qualidade dos grãos, além da redução do preço pago pelo produto (MENDES, 2009). Já nas perdas indiretas, o principal problema é devido à presença de substâncias que são, na maioria das vezes, tóxicas aos animais, denominadas micotoxinas (AIDOO, 1993).

De maneira geral, são considerados grãos ardidos todos aqueles que possuem pelo menos um quarto de sua superfície com descolorações, cujo matiz pode variar de marrom claro a roxo ou de vermelho claro a vermelho intenso (BRASIL, 1996).

As condições ambientais afetam expressivamente a incidência de grãos ardidos na cultura do milho. Acrescido a esse fato, deve ser ressaltado que, nas condições brasileiras, os produtores podem estender a colheita da cultura, pois o inverno não é rigoroso como nos países de clima temperado. Quanto maior essa extensão da colheita, maior é a exposição dos grãos às condições climáticas, e,

portanto aumentam-se as chances de incidência de doenças em grãos de milho. Essa incidência é agravada em regiões de clima úmido e quente, pelo mau empalhamento das espigas e também por injúrias causadas nas espigas (REID et al., 1996; SHURTLEFF, 1992). Chuvas frequentes no final do desenvolvimento da cultura, principalmente em lavouras que apresentam cultivares com espigas não decumbentes, também contribuem para o aparecimento de podridões de espigas e grãos. Além disso, a prática da monocultura e a ampliação das épocas de cultivo também têm influência direta na incidência de fungos causadores de grãos ardidos e micotoxinas (KIMATI; CARDOSO; BERGAMIN FILHO, 1980).

Os fungos causadores das podridões das espigas podem ser divididos em dois grupos: a) aqueles que apenas produzem grãos ardidos e b) aqueles que, além da produção de grãos ardidos, são biossintetizadores de toxinas, denominadas micotoxinas. No primeiro grupo, encontram-se os fungos: *Drechslera zeicola*, *Cladosporium herbarum*, *Ustilago maydis*, *Nigrospora aoryzae*, *Colletotrichum graminicola*, entre outros. No segundo grupo, são encontrados os fungos *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*), *Stenocarpella macrospora* (*Diplodia macrospora*), *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*), *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *Gibberella zeae* (PINTO, 2005). Sendo que os mais frequentemente detectados são: *Fusarium verticillioides*, *Diplodia maydis* (*Stenocarpella maydis*) e *Diplodia macrospora* (*Stenocarpella macrospora*).

Como principais fontes de inóculo de *Fusarium*, têm-se os restos de cultura de milho, como colmos e espigas, as sementes de milho contaminadas, as gramíneas de inverno (trigo, aveia e cevada) e também o solo. A disseminação dos esporos se dá através do vento e de insetos, sendo que o período de maior suscetibilidade às podridões da espiga ocorre de 7 a 10 dias após a polinização dos estigmas. Como sintomas, podem ocorrer pigmentação rosa (*F.*

verticillioides) ou roxa (*F. graminearum*) entre os grãos, e as espigas, normalmente, não apresentam decumbência após a maturidade fisiológica dos grãos (KIMATI; CARDOSO; BERGAMIN FILHO, 1980).

O estudo dos fungos do gênero *Fusarium ssp.* é de grande importância econômica, uma vez que são patogênicos, causando doenças em um grande número de espécies vegetais. Podem sobreviver na matéria orgânica por longos períodos ou na forma endofítica, colonizando a planta hospedeira (MARTINS, 2005). Estima-se que as perdas no campo devido à podridão do milho causada por *Fusarium ssp.* sejam na ordem de 10 a 30% (LOGRIECO et al., 2002).

Um dos métodos mais comuns para o controle das doenças, de maneira geral, é o controle químico. Entretanto, o controle químico para *Fusarium spp.*, visando o controle dos grãos ardidos não parece ser muito eficiente, uma vez que a aplicação do fungicida normalmente é realizada na fase vegetativa. Alguns resultados demonstraram que a aplicação dos fungicidas azoxistrobina e ciproconazol via foliar ocasionou uma redução de 2,6% na porcentagem de grãos ardidos quando comparado a experimentos em que foram avaliados os mesmos híbridos, porém sem aplicação de fungicida (STEFANELLO et al., 2012). Segundo os autores, a aplicação de fungicida foi eficiente para reduzir a porcentagem de grãos ardidos, apesar da baixa magnitude da redução. Mas os híbridos que apresentaram maior redução na intensidade de infecção do fungo foram aqueles mais resistentes à doença quando não houve aplicação do fungicida.

Além do controle químico, existem algumas alternativas para diminuir a incidência de grãos ardidos, que envolvem a utilização de cultivares resistentes, adubação equilibrada, rotação de culturas, controle de insetos, colheita precoce, transporte rápido e secagem. Todas essas medidas podem contribuir para minimizar a contaminação de grãos de milho por micotoxinas no campo e nos silos, especialmente aquelas produzidas por *Fusarium spp.* (MENDES, 2009).

Entre essas, a metodologia mais eficiente e sustentável é o uso de cultivares resistentes.

2.2 Micotoxinas em milho

O milho é um cereal com uma grande possibilidade de uso, tais como para alimentação animal, para uso industrial e, também, para o consumo humano. No Brasil, o milho é utilizado principalmente para a alimentação animal, mas em algumas regiões, como no Estado de Minas Gerais, este cereal é utilizado para preparar pratos típicos como bolo de milho, mingau de milho, "angu" (uma espécie de mingau firme e salgado), "canjiquinha" (um prato salgado à base de grãos de milho quebrados) dentre outros (QUEIROZ et al., 2012). Diante disso, a qualidade dos grãos tem importância fundamental para a segurança alimentar dos consumidores, e a baixa incidência de micotoxinas nos grãos representa uma característica de grande relevância para a cultura.

Os principais substratos para a produção das micotoxinas são os cereais, cujas perdas, segundo estimativa da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), situam-se ao redor de 25% dos grãos produzidos. O milho é um dos cereais mais cultivados e utilizados globalmente, por isso, se torna um dos mais predispostos à contaminação por fungos toxigênicos e ao acúmulo de micotoxinas nos grãos (HERMANNNS; PINTO; KITAZAWA, 2006). O termo micotoxina é derivado da palavra grega "mykes", que significa fungo, e do latim "toxican", que significa toxinas. As micotoxinas (produzidas por fungos patogênicos) são metabólitos secundários de fungos filamentosos, e são tóxicas ao homem e animais mesmo em pequenas concentrações (PITT et al., 2000). Metabólitos secundários são definidos de maneiras diversas por diferentes autores. Em geral, eles são compostos de baixo peso molecular, sintetizados por fungos filamentosos e são capazes de causar doença e morte em

plantas, animais e seres humanos (BENNETT; KLICH, 2003). A contaminação de grãos por micotoxinas pode chegar a perdas substanciais à economia, associadas ao comércio internacional destes produtos, pois, muitos países estabelecem limites para micotoxinas em alimentos. Segundo a FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2014), estas perdas chegam a milhões de toneladas por ano.

Além das perdas econômicas diretas, as micotoxinas são responsáveis por causar micotoxicoses que são ocasionadas pela ingestão de alimentos ou rações contaminadas com micotoxinas ou pela inalação destas em forma de partículas suspensas. A severidade das micotoxicoses depende da toxicidade da substância, da extensão da exposição, do estado nutricional do indivíduo e dos efeitos sinérgicos com outros agentes químicos ou biológicos (PERAICA et al., 1999).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é uma questão de saúde pública em todo o mundo, além de acarretar milhões de dólares em prejuízos anualmente, devido a gastos com a saúde humana, animal e produtos agrícolas (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Resíduos de micotoxinas podem se acumular nos tecidos de animais e serem excretados no leite (QUINN; MARKEY; CARTER, 2005) ou nos ovos (OLIVEIRA et al., 2000) de animais que consumiram ração contaminadas. Os alimentos de origem animal contaminados com resíduos constituem fontes de exposição aos humanos que consomem estes produtos.

Assim como para o desenvolvimento do fungo, existem algumas condições que predispõem a produção de micotoxinas pelos fungos, sendo elas: umidade, temperatura, aeração, tipo e disponibilidade de substrato, alguns métodos de processamento, produção e armazenamento dos produtos (PITT; HOCKING, 2009). Para que os fungos se desenvolvam adequadamente no substrato, é necessário que haja água disponível. Alguns substratos retêm

fortemente a água, dificultando sua disponibilidade para o fungo (MALLOZZI; CORRÊA, 1998). Outro fator importante para o desenvolvimento das micotoxinas é a temperatura. Em grãos, a faixa viável para a sua produção situa-se entre 11 e 37 °C. Os fungos toxigênicos podem contaminar os cultivos em crescimento, em consequência de danos causados por insetos e outros agentes e produzir toxinas antes ou até mesmo após a colheita, durante o seu armazenamento. Períodos de seca durante o cultivo do milho também são apontados como predisponentes à produção de aflatoxinas (MALLMANN; SANTURO; WENTZ, 1994; ZLOTOWSKI et al., 2004).

A produção de micotoxina está diretamente relacionada com o crescimento do fungo, entretanto a presença de fungo não indica necessariamente que haja a presença de micotoxina (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001). Estima-se que existam entre 100 mil e 250 mil espécies fúngicas, destas, cerca de 200 são capazes de produzir micotoxinas, mas somente 30 são efetivamente responsáveis por casos de micotoxicoses (GOMPertz et al., 2008). Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, assim como, uma única espécie pode produzir mais de um tipo de toxina (BACK, 2004).

Os principais gêneros produtores de micotoxinas em produtos agrícolas, principalmente em grãos de milho correspondem ao *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CAST, 2003). Outros fungos podem fazer parte do complexo de grãos ardidos, tais como espécies de *Stenocarpella*. O tipo e a quantidade de micotoxina produzida por um fungo dependem de fatores ecológicos e do processamento particular de cada produto (FILTENBORG; FRISVAD; THRANE, 1996). Estes fungos estão associados à produção de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxinas, esterigmatocistina, patulina, rubratoxina B, ácido penicílico, citrina, zearalenona e tricotecenos. Todas estas micotoxinas são comprovadamente tóxicas em alimentos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

A International Agency for Research on Cancer (1993) classifica as substâncias de acordo com seu potencial carcinogênico. A aflatoxina foi classificada por esta agência como carcinogênica para humanos (Grupo 1), ocratoxina e fumonisina como possíveis carcinogênicos (Grupo 2B) e zearalenona, deoxinivalenol (DON) e toxina T2 como substâncias não classificadas (Grupo 3). As micotoxinas mais importantes produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* são as fumonisinas e zearalenonas (KAWASHIMA; VALENTE-SOARES, 2006).

Dentre as micotoxinas mais encontradas e de grande potencial toxigênico destacam-se as fumonisinas, as ocratoxinas e as aflatoxinas. Avaliando amostras de milho das regiões Sul, Centro e Centro-sul do Brasil, foi detectada a presença de fumonisina em 99% delas (VARGAS et al., 2001). Cruz (2010) investigou a ocorrência de fumonisinas B1 e B2 em 72 amostras de alimentos industrializados à base de milho, coletadas em quatro cidades do Estado de São Paulo, Brasil e encontraram 65,3% amostras com fumonisinas B1. Tamames (2008) afirma que a importância das aflatoxinas no passado, como as micotoxinas com maior frequência e responsáveis pelos maiores problemas produtivos, tem atualmente menor importância se comparadas com as fumonisinas, toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*.

2.2.1 Fumonisin

Inicialmente descritas e caracterizadas em 1988 (BEZUIDENHOUT et al., 1988; GELDERBLOM; JASKIEWICZ; MARASAS, 1988), as fumonisinas são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *Fusarium verticillioides* (anteriormente classificado como *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* e *Fusarium gamai*, além da *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* (BENNETT; KLICH, 2003). Considerando essa

população fúngica e que as fumonisinas são produzidas, na sua maioria, sob alta umidade e em temperaturas de aproximadamente 20 a 26 °C, o clima brasileiro oferece boas condições para que fungos do gênero *Fusarium* estejam presentes nos grãos, causando inclusive várias doenças em milho, como a podridão de sementes e de colmo. Estas espécies, que infectam a planta no campo, podem também ser encontradas no armazenamento, caso as condições de temperatura e umidade sejam adequadas para o desenvolvimento destes fungos (ORSI et al., 2000).

A principal espécie responsável pela produção da fumonisina em milho é *Fusarium verticillioides* (VOSS; SMITH; HASCHECK, 2007). Este patógeno produz 16 tipos de fumonisina: A1, A2, A3, AK1, B1, B2, B3, B4, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1A e PH1B (MUSSER; PLATTNER, 1997). A fumonisina B1 é a forma molecular mais produzida pelo fungo, sendo também a que apresenta maior toxicidade (COULOMBE, 1993). A fumonisina B1, normalmente, representa 70% a 80% das fumonisinas produzidas, a fumonisina B2 entre 15 a 25% e a fumonisina B3 usualmente representa de 5 a 8% (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

O mecanismo de ação das fumonisinas está relacionado com o bloqueio na síntese dos esfingolipídeos, substância importante para a integridade da membrana celular e transporte iônico através das células. Os esfingolipídeos são predominantes no sistema nervoso central e periférico, principalmente como lipídeo da mielina, estando localizados nos oligodendrócitos e células de Schwann (WANG et al., 1991).

As fumonisinas são estáveis nas temperaturas de processamento dos alimentos, na luz e em solução de água/acetoneitrila (1:1) e instáveis em metanol (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). Alberts et al. (1990) estudando material de cultivo de *F. verticillioides*, verificaram que a fumonisina B1, após fervura por 30 minutos, continuava estável e sem diminuição nos níveis. Mas em

temperatura por volta de 200 °C durante 15 minutos, ocorre a inativação quase completa da fumonisina B1 (CASTELO; SUMNER; BULLERMAN, 1998).

Outro importante ponto a ser considerado, é o de que a legislação brasileira regulamenta os teores máximos de micotoxinas nos alimentos, para diversos tipos de processamento e consumo. Baseado na normativa de 2012, no caso das fumonisinas (B1 + B2), considerando o milho em grão para posterior processamento, o limite tolerável é de 5.000 µg/kg ou 5 ppm, já para farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha, como o consumo é direto esse limite é de 2,5 ppm (BRASIL, 2011).

2.3 Estudo do controle genético de características de interesse agrônômico em milho

O conhecimento da natureza e da magnitude dos efeitos gênicos que controlam um determinado caráter é de grande valia nos programas de melhoramento, pois auxiliam os melhoristas na tomada de decisões sobre o método de melhoramento a ser utilizado. Além disso, gera informações que permitem a utilização de métodos mais eficientes de seleção e propiciam maiores ganhos com a seleção.

Entre os diversos procedimentos utilizados para a obtenção das estimativas dos componentes da variância genética, os mais comumente utilizados para a cultura do milho, são: 1) método de Mather (1949), em que são utilizados, normalmente, os genitores, linhagens contrastantes fenotipicamente para o caráter considerado. Nesse caso são obtidas as gerações F1, F2 e os retrocruzamentos, os quais são simultaneamente avaliados com as linhagens genitoras. 2) delineamentos genéticos de Comstock e Robinson (1952), também chamados de delineamentos da Carolina do Norte. Este modelo é composto por três delineamentos genéticos. No primeiro modelo, em uma população “m”

machos são cruzados com “f” fêmeas diferentes. Já no segundo modelo “m” machos são cruzados com as mesmas “f” fêmeas. Já no terceiro método, “p” plantas da geração F_2 , do cruzamento de duas linhagens são retrocruzadas com ambos os genitores (testadores). 3) Dialetos, que se referem a todos os casos em que n genitores são combinados dois a dois. Este último pode ser empregado com algumas finalidades, como na escolha de genitores, na obtenção de informações do controle genético de caracteres e na predição de compostos ou cultivares sintéticas (RAMALHO et al., 2012).

Um dos problemas relatados sobre a utilização dos dialetos é que à medida que se aumenta o número de genitores envolvidos, aumenta-se também o número de cruzamentos que tem que ser realizados, muitas vezes inviabilizando o uso desse método. Desta forma foram propostos inúmeros tipos de dialetos, para que um maior número de genitores possa ser incluído, são eles: 1) Dialetos completos ou balanceados: são os dialetos que incluem os híbridos entre todos os genitores. 2) Dialetos parciais: são assim denominados aqueles dialetos que envolvem a obtenção de híbridos de dois grupos de genitores, sem a realização do cruzamento de linhagens do mesmo grupo. Tem como vantagem a possibilidade de incluir maior número de genitores. 3) Dialetos circulantes: são incluídos nessa categoria os dialetos em que os genitores são representados nas combinações híbridas em número menor de cruzamentos que nos demais tipos. Por isto, para ser denominado circulante o número de vezes que um genitor participa dos cruzamentos é sempre inferior a $n-1$. 4) Dialetos desbalanceados: são denominados àquelas situações em que algumas das combinações híbridas não foram obtidas (RAMALHO et al., 2012).

Nas análises dialélicas, após se obter os cruzamentos entre os genitores, são originadas combinações que serão avaliadas, em experimentos com repetição e, com base nesses dados, são estimados os componentes de variância da capacidade de combinação geral (CGC) e específica (CEC). Uma das

questões que deve ser discutida sobre as metodologias empregadas nos dialelos, é a de que os genótipos podem ser considerados tanto fixos como aleatórios, dependendo dos tratamentos experimentais fornecerem conclusões que lhes são particulares ou que possam ser extrapoladas para uma população na qual os tratamentos representam a amostra da população. Segundo Hallauer, Carena e Miranda Filho (2010), essa resposta tem grandes implicações nas interpretações a serem tiradas das análises dialélicas, e são também, responsáveis por várias discussões, prós e contras à utilização dos dialelos. Dentre os modelos propostos para os dialelos, dois podem ser utilizados para estimar os componentes da variância genética, por considerarem os efeitos de genótipos como aleatórios, sendo eles: o de Jinks e Hayman (1953) e o de Griffing (1956).

O modelo de Jinks e Hayman (1953) é conhecido por gerar uma grande quantidade de informações (VENCOSKY, 1970). Esse método tem sido utilizado para estimar a presença dos efeitos genéticos aditivos e de dominância, os componentes da variância genética e parâmetros genéticos, como as herdabilidades e o grau médio de dominância. Contudo, este método apresenta algumas restrições, como o caráter deve apresentar ausência de epistasia, ausência de alelismo múltiplo, distribuição independente dos genes e só se aplica a linhas puras, sendo mais utilizada em culturas autógamas (OTUBO, 1994). Os dados da tabela dialélica permitem, ainda, efetuar uma análise gráfica que classifica os genótipos quanto à proporção de alelos dominantes e recessivos e estimar os limites seletivos das populações avaliadas (HAYMAN, 1954; SANTOS, 1984).

Já o modelo de Griffing (1956), de maneira geral, é utilizado para se obter valores da capacidade geral de combinação (CGC) e da capacidade específica de combinação (CEC) (EISENHART, 1955). Os procedimentos de análise utilizando essas metodologias são apresentados em inúmeras publicações, tais como Ramalho, Santos e Zimmermann (1993) e Cruz et al.

(2004). Esse modelo é dividido em quatro métodos (Tabela 1): i) o método 1 inclui todas as combinações n^2 , ou seja, os híbridos, seus cruzamentos recíprocos e os genitores; ii) o método 2 é semelhante ao anterior não incluindo os cruzamentos recíprocos; iii) o método 3 inclui os híbridos e seus recíprocos, mas sem os genitores e iv) o método 4 considera apenas as combinações híbridas. A opção por um ou outro método dependerá do material utilizado. Em milho, quando são obtidos cruzamentos entre linhagens, a escolha mais lógica seria a de se utilizar um ou dois grupos de cruzamentos sem os genitores (HALLAUER; CARENA; MIRANDA FILHO, 2010). Vale lembrar que, quando os cruzamentos recíprocos são utilizados, podem ser estimados efeitos maternos.

Tabela 1 Métodos do modelo de Griffing (1956)

Método	Inclusão dos genitores	Inclusão dos recíprocos	Número de genótipos avaliados
1	sim	sim	n^2
2	sim	não	$\frac{n(n+1)}{2}$
3	não	sim	$n(n-1)$
4	não	não	$\frac{n(n-1)}{2}$

Fonte: Adaptado de Wricke e Weber (1986).

Segundo Sprague e Tatum (1942), o termo capacidade geral de combinação (CGC) refere-se ao comportamento médio de cada linhagem em cruzamento com as demais do conjunto, ou seja, o comportamento do genitor em relação ao cruzamento com um grupo de genitores. Portanto, quanto mais altas forem estas estimativas, positivas ou negativas, determinado genitor será considerado superior ou inferior aos demais, já se estas forem próximas de zero, o seu comportamento não difere da média geral dos cruzamentos (CRUZ et al.,

2004). Já a capacidade específica de combinação (CEC) é definida como um desvio em relação ao comportamento médio dos pais, ou seja, um efeito na expressão do híbrido que é adicional aos efeitos da CGC dos pais, podendo ser positiva ou negativa, sendo que esta enfatiza a importância de interações não aditivas resultantes da complementação gênica entre os parentais. Têm-se, portanto, que a combinação híbrida mais favorável deve ser aquela que apresente a maior estimativa de CEC e pelo menos um dos parentais com alta CGC (CRUZ et al., 2004).

As estimativas de CGC e CEC em cruzamentos entre linhagens permitem determinar a contribuição de cada genitor, bem como identificar combinações híbridas de interesse agrônomo. Além disso, essas estimativas podem ser utilizadas para se inferir o controle genético de características de interesse. Os conceitos desses termos são úteis tanto para caracterização de linhagens em cruzamentos como para estabelecer padrões heteróticos entre populações de milho (CROSSA; TABA; WELLHAUSEN, 1990; HALLAUER; CARENA; MIRANDA FILHO, 2010; VASAL et al., 1992), sendo também utilizados em vários estudos de controle genético. Neste caso, os tipos de capacidade de combinação são diferenciados de acordo com a natureza da ação gênica envolvida. A capacidade geral de combinação está associada a genes de efeitos predominantemente aditivos, além de efeitos de dominância e interações epistáticas do tipo aditivo-aditivo. Já a capacidade específica de combinação é decorrente dos efeitos de dominância e de outras interações epistáticas. Contudo, em geral, considera-se que os efeitos epistáticos são de pequena magnitude e, portanto, podem ser negligenciados (VENCOVSKY; BARRIGA, 1992).

2.3.1 Controle genético da incidência de fumonisinas em milho

Para o sucesso de um programa de melhoramento, um dos aspectos mais importantes antes de se conhecer o controle genético de uma determinada doença, é encontrar variabilidade genética entre os genitores. Em milho temperado, a presença de variabilidade genética para a resistência à produção de fumonisina foi constatada por Miedaner et al. (2008). No entanto, em milho tropical, existem poucos relatos. Por exemplo, Ramos, Brasil e Geraldine (2008), com base em seis linhagens contrastantes para a resistência a *Fusarium verticillioides*, sendo três resistentes e três suscetíveis, não encontrou diferenças significativas na incidência de fumonisinas.

Em outro estudo com o objetivo de avaliar cultivares quanto ao nível de incidência de fumonisina, Camargos et al. (2000) observaram que existem diferenças entre o comportamento de cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas, o que evidencia a resistência de alguns genótipos, sugerindo a possibilidade de seleção destes para locais específicos.

Para estudar o controle genético da resistência à síntese de fumonisinas em milho temperado, Hung e Holland (2012) utilizaram 18 linhagens contrastantes, considerando distintos grupos heteróticos, para compor um esquema de dialelo completo, obtendo-se também os cruzamentos recíprocos. Nesse trabalho, os autores identificaram tanto a presença dos efeitos aditivos, como de efeitos dominantes, com predominância dos efeitos aditivos. Além disso, as estimativas da correlação da CGC com o desempenho das linhagens foram de alta magnitude indicando que uma das maneiras de se obter resistência à fumonisina se dá pela avaliação e seleção prévia das linhagens que darão origem aos híbridos.

Entretanto, atualmente, não existem relatos publicados sobre o controle genético da incidência de fumonisinas em milho tropical. Além disso, são

necessárias mais informações sobre os efeitos predominantes no controle do caráter.

2.4 Modelos mistos no melhoramento de plantas

Um dos requisitos mais importantes na avaliação de experimentos é o controle do erro experimental (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002; RAMALHO et al., 2012). Dessa forma além de se tentar manejar de maneira mais uniforme os experimentos, visa-se também, prevenir a perda de parcelas, ou qualquer informação referente às mesmas. Isso nem sempre é possível porque, normalmente, o melhorista trabalha com um número muito elevado de genótipos, especialmente na fase inicial dos programas de melhoramento (RAMALHO et al., 2012). Além disso em condições de campo, existem inúmeros fatores bióticos, abióticos e de manejo que podem exercer alguma influência na condução dos ensaios, fazendo com que em algumas situações, ocorram perdas de parcelas experimentais. Essa perda de informação, apesar de trazer problemas, não chega a ser uma situação que leve à perda dos experimentos, no entanto, pode se fazer necessária a utilização de métodos mais eficientes nas análises dos dados obtidos. Já foram descritos alguns procedimentos que permitem que as análises com dados desbalanceados sejam realizadas. Uma das alternativas está na abordagem de modelos mistos, utilizando REML (*Restricted Maximum Likelihood*) e BLUP (*Best Linear Unbiased Predictor*) para a obtenção dos componentes de variância e das médias preditas, respectivamente (BERNARDO, 2010).

Modelos mistos são caracterizados pela presença de efeitos fixos (além da média geral) e de efeitos aleatórios (além do erro experimental). Uma das questões que surgem nestes casos é sobre quais efeitos devem ser considerados fixos e quais devem ser considerados aleatórios no modelo estatístico. De

maneira geral, quando o efeito é considerado fixo, as conclusões devem ser mantidas apenas para a população que está sendo avaliada, já quando o efeito for considerado aleatório essas conclusões podem ser extrapoladas para outras situações. A decisão de tratar um efeito como sendo fixo ou aleatório, tem reflexo nos resultados das análises, podendo muitas vezes causar a modificação na classificação e, portanto na seleção dos genótipos (BEARZOTI, 2002).

Além da possibilidade de aplicação em casos em que se tem perda de parcelas experimentais, ou seja, dados desbalanceados, a abordagem de modelos mistos também apresenta como vantagem a possibilidade de se explorar as informações do grau de parentesco existente entre os indivíduos (TECHNOW et al., 2014). Segundo Bernardo (2010), a incorporação de informações de relacionamento genético entre indivíduos maximiza o uso dos dados disponíveis para a comparação entre diferentes genótipos, ou seja, pode-se aproveitar as informações de indivíduos aparentados para a obtenção de estimativas mais precisas.

Para dados de múltiplos ambientes, a abordagem de modelos mistos também apresenta como vantagem a possibilidade de incorporar diferentes estruturas para as matrizes de variância e covariância (VCOV) genética (matriz **G**) e residual (matriz **R**). As matrizes **G** e **R** apresentam na diagonal principal os parâmetros relacionados às variâncias genéticas e residuais, respectivamente, para cada ambiente, e fora da diagonal os elementos de covariância para cada par de ambientes considerados. Com essas matrizes, é possível modelar as correlações genéticas e residuais entre os diferentes ambientes para que sejam obtidas estimativas mais precisas da variável resposta (BURGUENO et al., 2012).

Outro ponto que pode ser desenvolvido no caso dos modelos mistos é a predição de combinações não testadas (BERNARDO, 2010). Nesse caso o uso de técnicas preditivas é uma alternativa para diminuir os custos e também o

tempo de avaliação de híbridos pela diminuição substancial do número de híbridos a serem avaliados. Nesse caso, por meio de variâncias e covariâncias entre os híbridos testados e aqueles não testados pode-se obter a predição do comportamento de híbridos não testados (BERNARDO, 1994). Além dessas variâncias e covariâncias, a incorporação da informação de parentesco, tende a melhorar a acurácia preditiva, portanto, quando tal informação está disponível essa deve ser avaliada quanto à melhora na estimativa da predição (BURGUENO et al., 2012).

Existem vários procedimentos que se destinam à predição dos efeitos aleatórios no contexto do melhoramento de plantas, sendo o procedimento BLUP, o mais comumente utilizado (BERNARDO, 2010; MENDES; ABREU; RAMALHO, 2012). Esse procedimento foi inicialmente proposto por Henderson (1949), com o intuito de prever a produção de leite em animais, em conjuntos de dados desbalanceados (MRODE, 1996). Por sua complexidade matemática este método só veio a ser utilizado quando as ferramentas computacionais foram desenvolvidas. Sendo seu primeiro uso relatado em 1970, para a predição do valor genético de touros para a produção de leite em um programa de inseminação artificial (SCHAEFFER, 1991).

No BLUP (melhor preditor linear não viesado), a sigla “melhor” indica que a diferença entre a variância do que está sendo estimado é mínima, “linear” significa que é uma função linear dos dados e “não viesado ou não tendencioso” indica que a esperança do estimador é igual ao valor do parâmetro (BERNARDO, 2010). As propriedades pertinentes ao BLUP foram descritas de maneira detalhada por Henderson (1984) e evidenciam a superioridade teórica do BLUP como metodologia de predição de valores reprodutivos.

Para se realizar as análises de modelos mistos, utiliza-se o seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}$$

Em que:

\mathbf{y} é vetor de observações ou fenótipos;

\mathbf{X} é a matriz do modelo referente aos efeitos fixos;

$\boldsymbol{\beta}$ é o vetor de efeitos fixos;

\mathbf{Z} é a matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios;

\mathbf{a} é o vetor de efeitos aleatórios, com $\mathbf{a} \sim N(0, \sigma_g^2)$;

\mathbf{e} é o vetor de resíduos com $\mathbf{e} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Quando nesses modelos mistos são considerados dados de múltiplos ambientes, os efeitos aleatórios seguem uma distribuição normal multivariada (*MVN*), centrada em zero (0), e com matrizes de variância-covariância genética e residual igual a $\mathbf{G} \otimes \mathbf{A}$ e $\mathbf{I} \otimes \mathbf{R}$, respectivamente, em que \mathbf{I} é uma matriz identidade com dimensão $g \times g$, g é o número de genótipos avaliados; \mathbf{G} é a matriz de variância-covariância dos efeitos genéticos dos indivíduos nos diferentes ambientes; \otimes indica o produto de Kronecker e \mathbf{A} é a matriz de parentesco aditivo entre os indivíduos e \mathbf{R} é a matriz de variância-covariância dos efeitos residuais nos diferentes ambientes (BURGUENO et al., 2012).

Para plantas alógamas, uma revisão sobre dialelos é apresentada por Bernardo (2010), sobre sua utilização para a estimação de componentes de variância em cruzamentos simples. Nestes casos, o que é importante para o melhorista é obter informações sobre as capacidades de combinação, geral e específica. Portanto, faz-se necessário estimá-las. Para exemplificar, o autor propôs um dialelo parcial entre dois grupos de linhagens. Nesse caso, o modelo seria o seguinte:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{U}\mathbf{g} + \mathbf{Z}\mathbf{s} + \mathbf{e}$$

Em que:

\mathbf{y} é o vetor de observações ou fenótipos;

\mathbf{X} é a matriz do modelo referente aos efeitos fixos;

$\boldsymbol{\beta}$ é o vetor dos efeitos fixos;

\mathbf{U} é a matriz de incidência referente aos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC);

\mathbf{g} é o vetor dos efeitos aleatórios, referentes à capacidade geral de combinação (CGC), dos genitores com $\mathbf{g} \sim N(0, \sigma_{cgc}^2 \mathbf{A})$;

\mathbf{Z} é a matriz de incidência referente aos efeitos da capacidade específica de combinação (CEC);

\mathbf{s} é o vetor dos efeitos aleatórios, referentes à capacidade específica de combinação (CEC) dos híbridos com $\mathbf{s} \sim N(0, \sigma_{cec}^2 \mathbf{D})$;

\mathbf{e} é o vetor de resíduos com $\mathbf{e} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Estudando a utilização dos modelos mistos para a análise de dialelos, Mohring, Melchinger e Piepho (2011) compararam diferentes modelos, envolvendo, por exemplo, os métodos de Griffing (1956) e de Gardner e Eberhart (1966). Nesse trabalho, os autores concluíram que é possível analisar todos os tipos de dialelos de Griffing (1956) via modelos mistos. Além disso, permitiu a análise de dialelos com perdas de informação (dados desbalanceados), bem como a manipulação de estruturas complexas de blocos e erros com variâncias heterogêneas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

A partir de 13 linhagens de milho oriundas do programa de melhoramento da EMPRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (Tabela 2) foi realizado um dialelo completo, sem os cruzamentos recíprocos. As linhagens para compor o dialelo foram selecionadas com base em um experimento prévio, no qual um grande grupo de linhagens foi caracterizado quanto à incidência de grãos ardidos e fumonisinas. Nessa avaliação, foram identificadas, entre os grupos heteróticos (baseados na produtividade) da Embrapa Milho e Sorgo, as linhagens resistentes e suscetíveis aos grãos ardidos e, também, quanto à incidência de fumonisinas, 13 linhagens escolhidas para compor um dialelo completo, sendo seis linhagens do grupo Dentado (D); seis linhagens do grupo Flint (F) e uma linhagem que combina bem com os dois grupos heteróticos básicos (neste caso, grupo C). Tais linhagens representam indivíduos resistentes e suscetíveis dentro de cada grupo heterótico (Tabela 2).

Tabela 2 Descrição das linhagens utilizadas para compor o dialelo

Codificação	Grupo Heterótico	Classificação*
1	D	Resistente
2	D	Resistente
3	D	Suscetível
4	D	Suscetível
5	D	Resistente
6	D	Moderadamente Resistente
7	F	Resistente
8	F	Resistente

“Tabela 2, conclusão”

Codificação	Grupo Heterótico	Classificação*
9	F	Suscetível
10	F	Suscetível
11	F	Moderadamente Resistente
12	F	Suscetível
13	C	Resistente

*: Classificação prévia quanto à incidência de grãos ardidos/fumonisinias.

3.2 Experimentos

Para a caracterização dos híbridos dialélicos quanto à incidência de fumonisinas, foram conduzidos dois experimentos em Sete Lagoas - Minas Gerais, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo (coordenadas geográficas: 19° 28' lat. S e 44° 15' long. W) e um em Goiânia - Goiás na área experimental da Embrapa Arroz e Feijão (coordenadas geográficas: 16° 50' lat. S e 49° 25' long. W). Em Sete Lagoas, os dois ambientes avaliados foram um no Pivot Central, destinado ao melhoramento de milho e outro na área da fitopatologia. A precipitação média anual de Sete Lagoas é de 1.361 mm, com temperatura média anual de 21 °C. Em Goiânia, a temperatura média é de 23,2 °C e precipitação média de 1.570 mm anuais, com chuvas concentradas no verão (dezembro e janeiro). Essas áreas foram escolhidas devido à conhecida presença dos patógenos relacionados à incidência de grãos ardidos e à síntese de fumonisinas.

De todas as combinações sintetizadas, não foram obtidas sementes em quantidade suficiente para o cruzamento entre as linhagens 6 e 12, e, portanto, este híbrido não foi avaliado em nenhum dos três ambientes. Devido ao baixo número de sementes disponível para algumas combinações híbridas, ocorreram

diferentes desbalanceamentos entre os ambientes avaliados. No ambiente de Goiânia, não foram testadas as combinações 2 x 5, 4 x 6, 4 x 7, 6 x 12, 8 x 12 e 9 x 12. Já no ambiente da área da Fitopatologia em Sete Lagoas, não foram avaliados os híbridos 2 x 4, 2 x 5, 3 x 10, 4 x 9, 4 x 10, 5 x 6, 5 x 7, 6 x 12. No Pivot em Sete Lagoas, a única combinação não testada foi o cruzamento entre os genitores 6 x 12.

3.3 Condução dos experimentos

Na safra de 2009/2010, as 77 combinações híbridas obtidas e mais 11 testemunhas foram avaliadas no delineamento de blocos completos casualizados com duas repetições. As parcelas foram constituídas por uma linha de 4 metros, adotando-se como densidade de semeadura de cinco sementes por metro e espaçamento de 0,8 metros entre linhas, com o intuito de se obter em média uma densidade de 60.000 plantas por hectare.

A adubação de semeadura foi de 500 kg/ha do formulado 08-28-16 (N-P-K) + 0,3% de Zinco e, em cobertura, foi utilizado 200 kg/ha de 44-0-0 (Ureia). O controle das plantas daninhas foi realizado com a aplicação dos princípios ativos Atrazina (Concentração de 4 litros por hectare) e Nicosulfuron (Concentração de 0,6 litros por hectare), 30 dias após a emergência das plantas. Para o controle de pragas (como a lagarta do cartucho), foram utilizadas três aplicações de Diflubenzuron (Concentração de 100 g por hectare), Espinosade (Concentração de 100 mL por hectare) e Metomil (Concentração de 600 mL por hectare), até que a altura das plantas permitisse a entrada do pulverizador na lavoura. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação para a cultura do milho.

A característica avaliada nesses experimentos foi a concentração de fumonisinas nos grãos (ppm – partes por milhão) quantificada nos laboratórios

da Embrapa Milho e Sorgo, seguindo o protocolo descrito por Ferreira et al., (2013) e Lanza et al. (2014), com base no método detalhado no manual do equipamento VICAM (VICAM SCIENCE AND TECHNOLOGY, 1998). Para isso, foram obtidas amostras provenientes da mistura de grãos obtidos de todas as plantas de cada parcela útil. Primeiramente, as amostras foram moídas para a obtenção de uma mistura homogênea. Deste material homogêneo, foi retirada uma subamostra de 500 g e, a partir desta, em uma porção de 50 g foi adicionado 5 g de cloreto de sódio e 100 mL de metanol/água (80:20). Esta solução foi misturada em alta velocidade durante 1 minuto e filtrada por um papel de filtro. O extrato (10 mL) foi diluído com 40 mL de solução salina tamponada com fosfato PBS/0,1% de Tween-20, e filtrado através de um filtro de microfibras de 1,0 microm. O extrato diluído foi colocado na coluna de imunoafinidade, o qual foi lavado com 10 mL de tampão de lavagem PBS/0.1% Tween-20, seguido por 10 mL de PBS. O extrato foi retirado da coluna com 1 mL de metanol de grau HPLC. Uma mistura de revelador (1 mL) foi adicionada ao extrato recolhido. O teor de fumonisinas totais foi quantificado em um fluorímetro (VICAM Fluorometer Série 4, Watertown, EUA) para a quantificação das fumonisinas.

3.4 Genotipagem das linhagens

Para a genotipagem das 13 linhagens utilizadas no dialelo, foi realizada a extração de DNA a partir de tecido jovem (folhas), com base no método CTAB (SAGHAI-MAROOF et al., 1984). Para o preparo das amostras, foram necessários os seguintes materiais e equipamentos: alicate de coleta, pinça, caixa de isopor, freezer -80 °C, nitrogênio líquido, liofilizador, placa e tubos.

Para cada genótipo, foram coletados quatro discos de tecido fresco de folhas jovens, dispondo-os em tubos específicos distribuídos em placas de capacidade para 96 amostras. As placas com as amostras foram identificadas e

armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o início do processo de liofilização. As amostras foliares foram liofilizadas por 48 horas, sendo armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da maceração e extração de DNA.

Para a extração do DNA, foram necessários os seguintes materiais e equipamentos: banho-maria, centrífuga de placas, capela de exaustão, esferas de aço, estufa, freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pipeta multicanal eletrônica, porta-esferas e triturador (Geno/Grinder 2000). Também foram necessários os seguintes reagentes, soluções e tampões: tampão CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) 2%, β -Mercaptoetanol p.a., Clorofórmio-octanol 24:1 (v/v), Isopropanol p.a. gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, etanol 70% (v/v) gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tampão TE pH 8,0 (Tris-EDTA), RNase A (10 mg/mL)

O procedimento de extração consistiu em: preparar previamente o tampão CTAB contendo β -mercaptoetanol a 2% (m/v). O β -mercaptoetanol foi adicionado na hora do uso. As esferas de aço foram colocadas em cada tubo contendo as amostras liofilizadas em gelo com auxílio de um porta-esferas, e, posteriormente, os tubos, devidamente tampados e dispostos em placas, que foram introduzidas no equipamento de maceração, fixando-as no suporte. O equipamento foi regulado para 1.750 batidas/min (*strokes/min*), por 6 minutos, interrompendo-se a trituração a cada dois minutos para verificação das características do tecido macerado, que deve apresentar-se como um pó fino e verde. As placas foram retiradas e, na capela de exaustão, foram adicionados, a cada tubo, 400 μL de tampão de CTAB 2% (m/v), previamente preparado. Posteriormente, procedeu-se centrifugação por 15 segundos, a 4.000 rpm, em centrífuga de placas. As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora, com homogeneização a cada 10 min, agitando levemente. Posteriormente, as placas foram retiradas do banho-maria e resfriadas na capela de exaustão por 5 minutos e centrifugadas, por 15 segundos a 4.000 rpm em centrífuga de placas. As tampas das amostras foram retiradas em capela de

exaustão para adição de 300 μL de clorofórmio-octanol 24:1 (v/v). Posteriormente, os tubos e as placas foram tampados e homogeneizados cuidadosamente por inversão cerca de 30 vezes. Procedeu-se a centrifugação por 5 min a 2.500 rpm. Em capela de exaustão, foram transferidos, cerca de 200 μL do sobrenadante de cada amostra, com a pipeta multicanal eletrônica, para outra placa contendo tubos e tampas novos, com o cuidado para não contaminá-los com o precipitado. Ao sobrenadante foram adicionados 300 μL de isopropanol p.a. gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as placas foram homogeneizadas por inversão cerca de 15 vezes e levadas para incubar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação por 15 min a 4.000 rpm e o descarte do sobrenadante por inversão, removendo individualmente cada tubo. Ao precipitado foram adicionados 300 μL de etanol 70% (v/v) gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo os tubos e as placas levados para centrifugar a 4.000 rpm por 5 min. Cuidadosamente, foi descartado o sobrenadante por inversão, removendo-se individualmente cada fileira (oito tubos). As amostras foram, então, levadas para secagem em estufa a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a evaporação completa do etanol (por aproximadamente 5 minutos). Procedeu-se a resuspensão de cada amostra adicionando-se 100 μL de TE pH 8,0 contendo 0,2 μL de RNase A (10 mg/mL) em cada tubo, agitando-se brevemente em vórtex. Os tubos e as placas foram novamente tampados e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, o DNA das amostras foi enviado para o *Institute for Genomic Diversity* (IGD), da Universidade de Cornell, nos Estados Unidos, para a obtenção de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) via *Genotyping-by-Sequencing* (GBS) (ELSHIRE et al., 2011).

Para garantir a qualidade necessária do DNA para se obter marcadores moleculares SNP via GBS, é necessário que o DNA seja livre de contaminantes e possuir menos de 5% de DNA organelar (se possível). Além disso, é recomendado o uso de conjuntos de DNeasy miniprep (QIAGEN) para a

purificação do DNA das amostras (mais detalhes podem ser encontrados no *site* do Cornell University Institute of Biotechnology - www.biotech.cornell.edu).

3.5 Análise dos dados

Para cada ambiente, a análise dialélica para os teores de fumonisinas totais foi realizada com base no seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{W}\mathbf{a} + \mathbf{U}\mathbf{g} + \mathbf{Z}\mathbf{s} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

Em que:

\mathbf{y} é o vetor de observações ou fenótipos;

\mathbf{X} é a matriz de incidência para os efeitos fixos $\boldsymbol{\beta}$;

$\boldsymbol{\beta}$ é o vetor dos efeitos fixos de blocos;

\mathbf{W} é a matriz de incidência para os efeitos fixos \mathbf{a} ;

\mathbf{a} é o vetor de efeitos fixos de testemunhas;

\mathbf{U} é a matriz de incidência para os efeitos aleatórios \mathbf{g} ;

\mathbf{g} é o vetor aleatório da capacidade geral de combinação, com $\mathbf{g} \sim N(0, \sigma_{cgc}^2)$;

\mathbf{Z} é a matriz de incidência para os efeitos aleatórios \mathbf{s} ;

\mathbf{s} é o vetor da capacidade específica de combinação, com $\mathbf{s} \sim N(0, \sigma_{cec}^2)$ e;

$\boldsymbol{\varepsilon}$ é o vetor de resíduos, com $\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(0, \sigma_e^2)$.

Para a análise dialélica conjunta, primeiramente, foi ajustado o modelo dialélico explícito, com o objetivo de testar os efeitos principais de CGC e CEC, e as interações de CGC e CEC com os ambientes. Assim, o modelo utilizado foi:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Pc} + \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Ug} + \mathbf{Vh} + \mathbf{Zs} + \mathbf{Tr} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

Em que:

\mathbf{y} é o vetor de observações ou fenótipos;

\mathbf{P} é a matriz de incidência para os efeitos fixos \mathbf{c} ;

\mathbf{c} é o vetor dos efeitos fixos de ambientes;

\mathbf{X} é a matriz de incidência para os efeitos fixos $\boldsymbol{\beta}$;

$\boldsymbol{\beta}$ é o vetor dos efeitos fixos de repetição dentro de ambientes;

\mathbf{U} é a matriz de incidência para os efeitos aleatórios \mathbf{g} ;

\mathbf{g} é o vetor aleatório da capacidade geral de combinação, com $\mathbf{g} \sim N(0, \sigma_{cgc}^2)$;

\mathbf{V} é a matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios \mathbf{h} ;

\mathbf{h} é o vetor com os efeitos da interação entre capacidade geral de combinação e ambientes com $\mathbf{h} \sim N(0, \sigma_{cgc.amb}^2)$;

\mathbf{Z} é a matriz de incidência para os efeitos aleatórios \mathbf{s} ;

\mathbf{s} é o vetor da capacidade específica de combinação com $\mathbf{s} \sim N(0, \sigma_{cec}^2)$;

\mathbf{T} é a matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios \mathbf{r} ;

\mathbf{r} é o vetor com os efeitos da interação entre capacidade específica de combinação e ambientes com $\mathbf{r} \sim N(0, \sigma_{cec.amb}^2)$;

$\boldsymbol{\varepsilon}$ é o vetor de resíduos com $\boldsymbol{\varepsilon} \sim MVN(0, \mathbf{R}_I)$ considerando a matriz identidade.

Para verificar a significância dos efeitos principais de CGC e CEC, e dos efeitos das interações de CGC e CEC com os ambientes, foi utilizado o teste LRT (*Likelihood Ratio Test*) (CASELLA; BERGER, 2002) que apresenta distribuição qui-quadrado aproximada com 1 grau de liberdade:

$$LRT = -2 \times \log \left(\frac{L_R}{L_C} \right)$$

Em que L_R é a verossimilhança do modelo reduzido, ou seja, sem o parâmetro a ser testado, e L_C é a verossimilhança do modelo completo.

Em seguida, foi utilizado o modelo dialélico implícito para o ajuste de diferentes estruturas para as matrizes de variância e covariância (VCOV) genética (\mathbf{G}) e residual (\mathbf{R}), e também, para a incorporação da matriz de relacionamento genético aditivo entre linhagens. Assim, o modelo utilizado foi:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Pc} + \mathbf{Yd} + \mathbf{Ug} + \mathbf{Zs} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

Em que:

\mathbf{y} é o vetor de observações ou fenótipos;

\mathbf{P} é a matriz do modelo referente aos efeitos fixos \mathbf{c} ;

\mathbf{c} é o vetor dos efeitos fixos de ambientes;

\mathbf{Y} é a matriz do modelo referente aos efeitos fixos \mathbf{d} ;

\mathbf{d} é o vetor dos efeitos fixos de repetição dentro de ambientes;

\mathbf{U} é a matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios \mathbf{g} ;

\mathbf{g} é o vetor aleatório da capacidade geral de combinação dentro de ambientes com $\mathbf{g} \sim N(0, \mathbf{G}_{cgc} \otimes A)$;

\mathbf{Z} é a matriz do modelo referente aos efeitos aleatórios \mathbf{s} ;

\mathbf{s} é o vetor com os efeitos da capacidade específica de combinação dentro de ambientes com $\mathbf{s} \sim \text{MVN}(0, \mathbf{G}_{cec} \otimes \mathbf{I})$ e, em que \mathbf{I} é uma matriz identidade com dimensão $N \times N$, sendo N o número de híbridos avaliados;

$\boldsymbol{\varepsilon}$ é o vetor de resíduos com $\boldsymbol{\varepsilon} \sim \text{MVN}(0, \mathbf{R})$.

Para os efeitos aleatórios do modelo, assume-se que \mathbf{G}_{cgc} é a matriz VCOV para os efeitos das capacidades gerais de combinação, \mathbf{G}_{cec} é a matriz VCOV para os efeitos das capacidades específicas de combinação; \otimes corresponde ao produto de Kronecker; \mathbf{A} é a matriz de parentesco para os efeitos genéticos aditivos (capacidade geral de combinação) e \mathbf{R} é a matriz de VCOV para o efeito residual não genético entre os ambientes.

Foram utilizadas diferentes estruturas para as matrizes VCOV genética (matriz \mathbf{G}) e residual (matriz \mathbf{R}). Essas matrizes são caracterizadas por apresentarem na diagonal principal os parâmetros relacionados às variâncias para cada ambiente e, fora da diagonal, as covariâncias entre pares de ambientes. Assim, foram ajustadas e comparadas as seguintes estruturas de VCOV:

a) Identidade (\mathbf{I})

Neste caso, assume-se homogeneidade de variâncias e ausência de correlação entre ambientes:

$$\begin{bmatrix} \sigma^2 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma^2 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma^2 \end{bmatrix}$$

b) Diagonal (DIAG)

Nesta estrutura, assume-se heterogeneidade de variâncias e ausência de correlação:

$$\begin{bmatrix} \sigma_1^2 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_2^2 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_3^2 \end{bmatrix}$$

c) Não Estruturada (US)

Esta estrutura de VCOV permite que os parâmetros de variância e covariância assumam quaisquer valores, sendo a mais parametrizada, com $t(t+1)/2$ parâmetros, em que t corresponde ao número de ambientes avaliados:

$$\begin{bmatrix} \sigma_{11}^2 & \sigma_{12}^2 & \sigma_{13}^2 \\ \sigma_{12}^2 & \sigma_{22}^2 & \sigma_{23}^2 \\ \sigma_{13}^2 & \sigma_{23}^2 & \sigma_{33}^2 \end{bmatrix}$$

Após o ajuste das diferentes estruturas para as matrizes **G** e **R**, as informações obtidas a partir dos marcadores moleculares foram utilizadas para a incorporação do grau de relacionamento aditivo entre indivíduos para o efeito de CGC.

Para a obtenção dos dados de marcadores SNP, os dados brutos de sequências de DNA recebidos do *Institute for Genomic Diversity* (IGD), da Universidade de Cornell, foram, primeiramente, processados utilizando o *pipeline GBS* (GLAUBITZ et al., 2014) disponível no *software* TASSEL (BRADBURY et al., 2007). Para garantir a qualidade dos dados de marcadores moleculares do tipo SNP, foram descartados locos que apresentavam *Minor Allele Frequency* (MAF) inferior a 10%, pelo menos um indivíduo em heterozigose e pelo menos um indivíduo com dado perdido.

Para a obtenção da matriz de parentesco aditivo entre as linhagens, foi utilizado o método proposto por VanRaden (2008). Para esse cálculo, foi utilizado o pacote *synbreed* (WIMMER et al., 2015) disponível no *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). Em seguida, com base nessa matriz de relacionamento genético aditivo entre as linhagens, foi realizada uma análise de agrupamento utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para a obtenção de um dendrograma.

Por fim, a informação do grau de parentesco aditivo entre as linhagens foi incorporada nas análises com base na abordagem GBLUP (*Genomic Best Linear Unbiased Predictor*). Todas as análises dialélicas, com base na abordagem de modelos mistos foram realizadas no pacote *ASReml-R* (GILMOUR, 2006) desenvolvido para o *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3.5.1 Obtenção dos componentes de variância

A partir dos componentes de variância obtidos nas análises dialélicas individuais e conjuntas, os seguintes parâmetros foram estimados (MOHRING; MELCHINGER; PIEPHO, 2011):

Tabela 3 Estimadores dos componentes de variância

Componente de Variância	Estimador
CGC	σ_{CGC}^2
CEC	σ_{CEC}^2
CGC x Ambiente	$\sigma_{CGC \times AMB}^2$
CEC x Ambiente	$\sigma_{CEC \times AMB}^2$
Erro	σ_e^2

Variância aditiva: $\sigma_a^2 = 4x\sigma_{CGC}^2$

Variância de dominância: $\sigma_d^2 = 4x\sigma_{CEC}^2$

Variância genética: $\sigma_g^2 = \sigma_a^2 + \sigma_d^2$

Variância do erro: σ_e^2

Variância fenotípica: $\sigma_f^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2$

Herdabilidade no sentido restrito: $h_a^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_f^2}$

Herdabilidade no sentido amplo: $h_a^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2}$

Para verificar a precisão das análises dialélicas, foi estimada a acurácia seletiva ($\hat{r}_{\hat{g}g}$) (RESENDE; DUARTE, 2007):

$$\hat{r}_{\hat{g}g} = \left[1 - \frac{PEV}{\sigma_g^2} \right]^{1/2}$$

Em que: PEV é a variância do erro de predição (do inglês, *Prediction Error Variance*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as análises dialélicas individuais, ou seja, realizadas para cada ambiente, as estimativas da acurácia seletiva foram superiores a 66,4%, podendo ser consideradas de média a alta magnitude (Tabela 4) (RESENDE; DUARTE, 2007). A partir dessas análises individuais, detectou-se, para todos os ambientes considerados, que os efeitos das capacidades gerais (CGC) e específicas (CEC) de combinação foram significativos. Este resultado indica a presença tanto de efeitos aditivos como de efeitos não aditivos no controle da característica avaliada. No entanto, os valores obtidos para as variâncias aditivas e não aditivas mostram que, no caso das análises individuais, os valores não aditivos são os predominantes para o controle genético da incidência de fumonisinas. As estimativas da herdabilidade no sentido restrito variaram de 10% a 18% em Goiânia e no Pivô em Sete Lagoas respectivamente. Já as estimativas da herdabilidade no sentido amplo variaram de 73% em Goiânia a 76% na área da Fitopatologia em Sete Lagoas. Para cada ambiente avaliado, as médias de concentração de fumonisinas das testemunhas e dos híbridos foram, respectivamente, de 1,96ppm e 3,09ppm em Goiânia; 3,89ppm e 3,56ppm na área da Fitopatologia em Sete Lagoas; e 3,05ppm e 3,55ppm no Pivô em Sete Lagoas. Além disso, a média geral de concentração de fumonisinas para as testemunhas foi de 3,4ppm, enquanto que a média geral para os híbridos dialélicos foi de 3ppm, sendo todos esses valores menores que os limites aceitáveis na legislação brasileira (BRASIL, 2011).

Tabela 4 Componentes de variância e coeficientes de acurácia seletiva obtidos a partir das análises dialélicas individuais para cada ambiente para a concentração de fumonisinas (ppm) em grãos de milho

Componente de Variância	Goiânia	Fitopatologia(SL)	Pivo(SL)
CGC	0,18*	0,52**	0,18*
CEC	1,09**	1,89**	0,52**
Erro	1,84	3,04	1,03
σ_a^2 ¹	0,71	2,09	0,71
σ_d^2	4,38	7,59	2,10
h_r^2	0,10	0,16	0,18
h_a^2	0,73	0,76	0,73
\hat{r}_{gg} (%)	79,9	82,8	79,6
<i>Média testemunhas</i>	3,09	3,56	3,55
<i>Média híbridos dialélicos</i>	1,96	3,89	3,05

***: Teste LRT significativo a 5% e 1% de probabilidade respectivamente¹: σ_a^2 = variância aditiva; σ_d^2 = variância de dominância; h_r^2 = herdabilidade no sentido restrito; h_a^2 = herdabilidade no sentido amplo; \hat{r}_{gg} = acurácia seletiva.

Na análise conjunta explícita, os componentes de variância da CGC, CEC e da interação entre a capacidade específica de combinação e os ambientes (CEC x Ambiente) foram significativos (Tabela 5). Esse resultado mostra que tanto os efeitos aditivos como os não aditivos têm influência sobre o controle da característica, ratificando trabalhos encontrados na literatura (HUNG; HOLLAND, 2012). Além disso, com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5 é possível verificar que a CGC apresenta um comportamento estável ao longo dos diferentes ambientes avaliados, uma vez que o componente de variância da interação entre CGC e ambientes foi não significativo, ao contrário do que é visualizado para o caso da CEC.

Tabela 5 Componentes de variância e coeficiente de acurácia seletiva obtidos a partir da análise dialélica conjunta para a concentração de fumonisinas em grãos de milho

Componente de Variância	Valor
CGC	0,26**
CEC	0,06**
CGC x Ambiente	0,04 ^{ns}
CEC x Ambiente	1,11**
Erro	1,27

** : Teste LRT significativo a e 1% de probabilidade; e, ^{ns}: não significativo.

Nas análises com modelos mistos, uma alternativa muito útil é a possibilidade da utilização de diferentes estruturas para as matrizes de variâncias-covariâncias (VCOV) para os efeitos genéticos (matriz **G**) e residuais (matriz **R**). Assim, com o objetivo de utilizar modelos dialélicos que resultassem em predições mais acuradas, optou-se por utilizar diferentes estruturas de VCOV para as matrizes **G** e **R**. Esta é uma estratégia que vem sendo cada vez mais explorada nas abordagens de modelos mistos (ANDRDADE, 2013; BURGUENO et al., 2012), uma vez que tais estruturas de VCOV permitem explorar as correlações genéticas e residuais entre ambientes, levando a predições mais acuradas ou mais próximas da realidade dos programas de melhoramento. Apesar de existirem diferentes estruturas de VCOV, nesse trabalho foram utilizadas a Não Estruturada (US) para a matriz **G** e a Diagonal (DIAG) para a matriz **R**, pois a estrutura US permite que as variâncias e covariâncias genéticas entre ambientes assumam quaisquer valores, sendo, portanto, a que apresenta ajuste mais próximo da realidade dos experimentos de um programa de melhoramento quando há convergência do modelo. Essas estruturas vêm sendo utilizadas em inúmeros trabalhos, por exemplo, em dados experimentais obtidos para múltiplos ambientes em trigo e café, observou-se que

o ajuste de estruturas de VCOV que consideram a existência de covariâncias entre ambientes foi fundamental para se obter predições mais acuradas para os efeitos genéticos (ANDRDADE, 2013; BURGUENO et al., 2012).

Além da utilização de diferentes estruturas de VCOV para as matrizes **G** e **R**, outro método que recentemente tem sido muito empregado é o *Genomic Best Linear Unbiased Prediction* (GBLUP) (EL-KASSABY; KLAPSTE; GUY; 2012; GAO et al., 2012; HAYES; GODDARD, 2008; ZENG et al., 2012). Esta metodologia permite a incorporação, nos modelos genético-estatísticos, de matrizes de relacionamento genético entre indivíduos, obtidas a partir da informação de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma.

Assim, neste trabalho, foram utilizados dados de SNP dos genitores (linhagens) do dialelo para a incorporação das informações de parentesco aditivo entre indivíduos. Para garantir a qualidade dos dados de marcadores moleculares do tipo SNP, foram descartados os locos que apresentavam *Minor Allele Frequency* (MAF) inferior a 10%, pelo menos um indivíduo em heterozigose, e pelo menos um indivíduo com dado perdido (Tabela 6). Observou-se que a redução no número total de SNPs após a aplicação dos filtros foi de 81 vezes, com um total de 10.439 marcadores SNP selecionados para utilização nas análises. Após o controle de qualidade dos dados de marcadores SNP, os dados moleculares das linhagens foram utilizados para a obtenção da matriz de parentesco aditivo, de acordo com a abordagem de VanRaden (2008). Assim, com base nessa matriz, foi construído o dendrograma apresentado na Figura 1. Observou-se a formação de agrupamentos para as linhagens de acordo com o grupo heterótico, grupo Flint (F) e grupo Dent (D), de modo que os dados moleculares proporcionaram a obtenção de coeficientes de similaridade genética, coerentes com o esperado pelo *pedigree* das linhagens.

Tabela 6 Número de SNPs antes e após a aplicação de filtros para o controle de qualidade dos dados de marcadores moleculares

Chr	Nº de SNPs^a	Nº de SNPs^b
1	129369	1641
2	102762	1289
3	95413	1240
4	88617	1109
5	94647	1345
6	69079	758
7	71889	806
8	72779	774
9	63256	954
10	59137	523
Total	846944	10439

Chr: cromossomo; ^a: número de SNPs obtidos após o processamento das sequências brutas de DNA; ^b: número de SNPs obtidos após a aplicação dos filtros para MAF superior a 10%, e descarte de locos que apresentavam pelo menos um indivíduo em heterozigose e pelo menos um indivíduo com dado perdido.

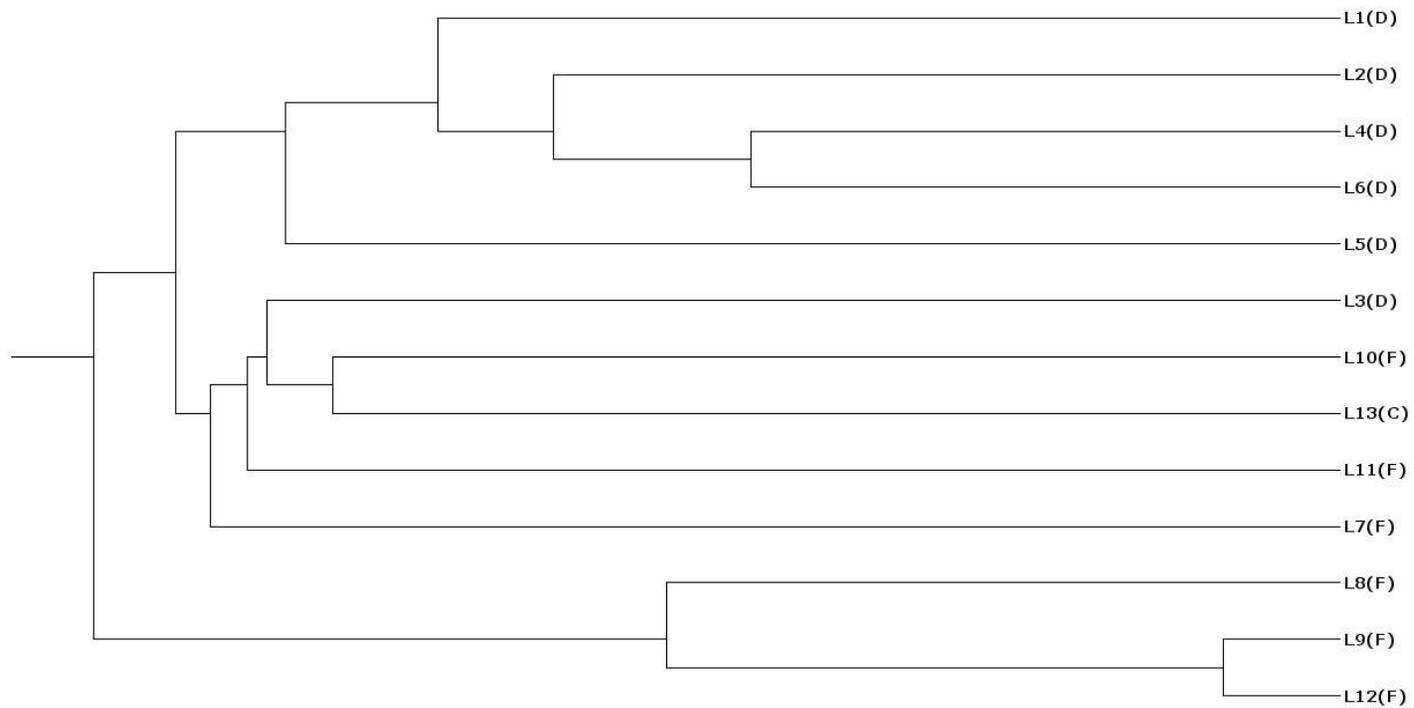


Figura 1 Dendrograma obtido a partir da matriz de relacionamento genético entre as linhagens do dialelo, com base em dados de 10.439 marcadores SNP obtidos via GBS

Neste trabalho, após o ajuste das estruturas de VCOV para as matrizes **G** e **R**, foi incorporada, na análise dialélica conjunta com modelo implícito, a matriz de relacionamento genético aditivo para a CGC. Vale ressaltar que a inclusão de informações de parentesco genômico nos modelos estatísticos, tem proporcionado maior acurácia na obtenção das predições de valores genotípicos, ou seja, com menores erros de predição quando comparadas a não incorporação da informação de parentesco (BURGUENO et al., 2012; MUNHOZ et al., 2014; TECHNOW et al., 2014).

Considerando as vantagens da incorporação das informações de parentesco nos modelos genético-estatísticos, para verificar se tal abordagem é viável para um programa de melhoramento, é preciso ponderar sobre os custos com a genotipagem dos indivíduos, uma vez que, em geral, técnicas para a obtenção de alta densidade de marcadores demandam alto investimento financeiro, o que pode não ser viável, dependendo da quantidade de genótipos que devem ser avaliados e do tamanho do programa de melhoramento. No entanto, espera-se que os custos destas técnicas sejam menores no futuro o que permitirá uma maior incorporação das informações obtidas via marcadores moleculares na rotina de programas de melhoramento. Deve-se considerar, ainda, que a genotipagem de linhagens elites pode proporcionar agregação de informação genômica no programa de melhoramento, visto que as linhagens elites são a base da formação de novas populações fonte. Além disso, estas linhagens são utilizadas como testadores para a obtenção de híbridos *top-crosses* e, frequentemente, participam em híbridos avançados, possibilitando a expansão da utilização dos dados moleculares para várias etapas do programa de melhoramento e para diversas características de interesse.

Observa-se na Tabela 7 que nas análises com modelos que incorporam a matriz de relacionamento genético aditivo para a CGC, houve um aumento das estimativas do valor da acurácia seletiva para o ambiente de Goiânia, enquanto

que para a área do Pivô em Sete Lagoas houve uma redução, quando comparados aos resultados das análises individuais (Tabela 4). No entanto, observa-se que houve menor erro padrão associado aos BLUPs da capacidade geral de combinação (Figura 2) quando foram incorporadas as informações de parentesco nos modelos genético-estatísticos (modelo 2), corroborando com resultados já publicados por alguns autores (BURGUENO et al., 2012; MUNHOZ et al., 2014; TECHNOW et al., 2014). Pode-se observar, a partir das estimativas dos componentes de variância, que a estimativa da variância de dominância foi maior em todos os ambientes. As estimativas da herdabilidade no sentido restrito tiveram um decréscimo (Tabela 7) quando comparadas com o modelo das análises individuais (Tabela 4). Já para as estimativas da herdabilidade no sentido amplo, foi observado um acréscimo na estimativa de Goiânia, a estimativa da área da fitopatologia em Sete Lagoas se manteve constante e houve um decréscimo na estimativa da área do Pivô em Sete Lagoas.

Tabela 7 Componentes de variância e coeficiente de acurácia seletiva obtidos a partir da análise dialélica implícita conjunta, com o ajuste de estruturas para as matrizes **G** e **R**, e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo entre linhagens do dialelo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho.

Componente de Variância	Goiânia	Fitopatologia(SL)	Pivô(SL)
CGC dentro de ambientes	0,1	0,27	0,07
CEC dentro de Ambientes	1,07	1,88	0,56
Erro	1,32	2,71	1,04
σ_a^2	0,41	1,07	0,29
σ_d^2	4,26	7,53	2,25
h_r^2	0,07	0,09	0,08
h_a^2	0,78	0,76	0,71
\hat{r}_{gg} (%)	84,7	82,8	76,8

σ_a^2 : variância aditiva; σ_d^2 = variância de dominância; h_r^2 = herdabilidade no sentido restrito; h_a^2 = herdabilidade no sentido amplo; \hat{r}_{gg} = acurácia seletiva.

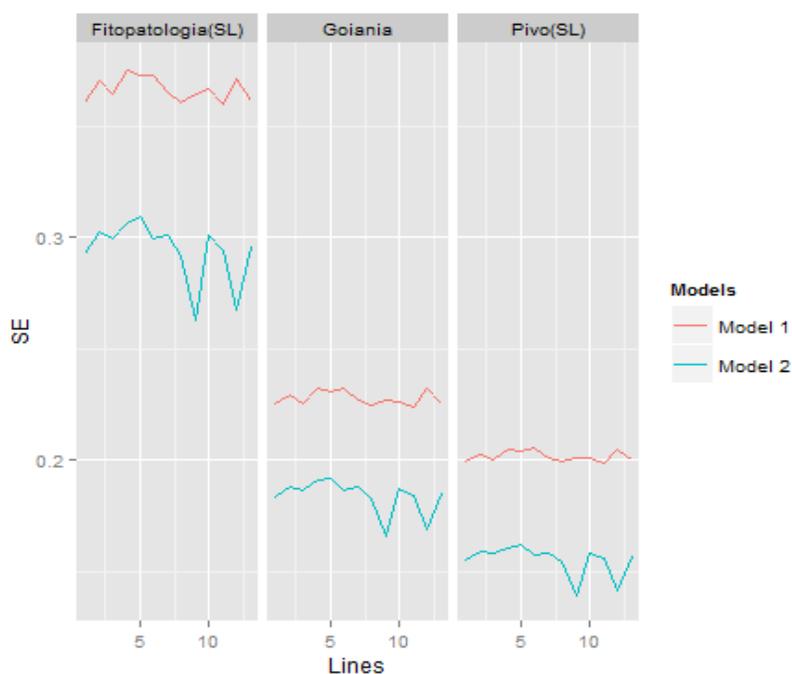


Figura 2 Erros de predição associados aos BLUP da capacidade geral de combinação obtidos para as análises dialélicas implícita conjunta, para os ambientes de Sete Lagoas, na área da fitopatologia e pivô, e para Goiânia, antes (modelo 1) e após (modelo 2) o ajuste das matrizes \mathbf{G} e \mathbf{R} , e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo entre linhagens do dialelo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho

O conhecimento sobre o controle genético de características de importância agrônômica e econômica tem a premissa de dar suporte para a escolha das melhores estratégias a serem utilizadas durante a condução de um programa de melhoramento. Com base na análise considerando a estrutura de VCOV para as matrizes \mathbf{G} e \mathbf{R} , e também, com a incorporação da informação de parentesco aditivo, pode-se observar uma predominância dos efeitos não aditivos para o controle da incidência de fumonisinas em grãos de milho tropical, pois considerando o grau médio de dominância (σ_d^2 / σ_a^2), o menor valor observado

foi de 7 (Tabela 7), que corresponde a uma predominância dos efeitos não aditivos no controle desta característica (RAMALHO et al., 2012). É válido ressaltar que, para dialelos analisados com modelos mistos, existem poucos resultados relatados, e que estes, na maioria das vezes, interpretam diretamente as estimativas dos componentes das variâncias aditiva e de dominância para inferir sobre os efeitos predominantes no controle da característica de interesse (GUEDES, 2012; MOHRING; MELCHINGER; PIEPHO, 2011).

Em um programa de melhoramento de milho que visa à obtenção de híbridos, a natureza do controle genético da característica tem grande impacto em fomentar estratégias de seleção durante o processo. Como neste trabalho, os efeitos da CEC foram significativos e com predomínio do controle genético pelos efeitos não aditivos, deve-se considerar a realização de avaliações para a resistência à fumonisina em híbridos ao invés de linhagens. Em outro trabalho, com situação semelhante, os autores sugerem que para fases iniciais do melhoramento a escolha pode ser baseada num pequeno número de cruzamentos (HUNG; HOLLAND, 2012). Desta forma, pode-se avaliar poucos cruzamentos entre linhagens (de mesmo grupo heterótico) para formação de populações fontes com maior resistência à incidência de fumonisinas e, posteriormente, deve-se avaliar os híbridos experimentais (obtidos pelo cruzamento entre linhagens de grupos heteróticos complementares) em fases mais avançadas (selecionados para produtividade e outros caracteres de interesse agrônômico), em que o número já é menor.

Para se comparar os ambientes, foram estimadas as correlações entre as predições BLUP da capacidade específica de combinação (Tabela 8). Observa-se que as correlações foram de baixa magnitude, o que reforça a presença da interação entre ambientes e realça a utilidade da incorporação de estruturas de VCOV para as matrizes **G** e **R**.

Tabela 8 Correlações entre os ambientes para os valores BLUP da capacidade específica de combinação, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após ajustadas as matrizes **G** e **R**, e também, com a incorporação das matrizes de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho

Ambientes	Fitopatologia	Pivot
Goiânia	0,28	-0,32
Fitopatologia		0,06

A partir das predições da CGC, obtidas nos modelos com a incorporação do parentesco, observou-se que as melhores predições da CGC foram dos genitores L13, L1 e L4 respectivamente (Figura 3). Já as piores predições foram dos genitores L3, L7 e L8. É válido ressaltar a estabilidade da CGC entre os ambientes. Isso está de acordo com as médias obtidas nos diferentes ambientes, na qual a concordância entre os três melhores e os três piores, relatados acima, é de 100%, reforçando a ideia de estabilidade para a CGC entre os diferentes ambientes avaliados.

Para as predições da CEC, observa-se que as melhores combinações diferiram entre os ambientes (Tabela 5 e Figura 5), reflexo da interação complexa entre CEC e ambientes. De forma geral, os melhores genótipos, ou seja, com menores valores preditos para CEC, para concentração de fumonisinas nos grãos, foram os híbridos 33 (A x B), 13 (X x Y) e 71 (C x D). Já os piores foram os híbridos 25 (E x F) e 67 (G x H).

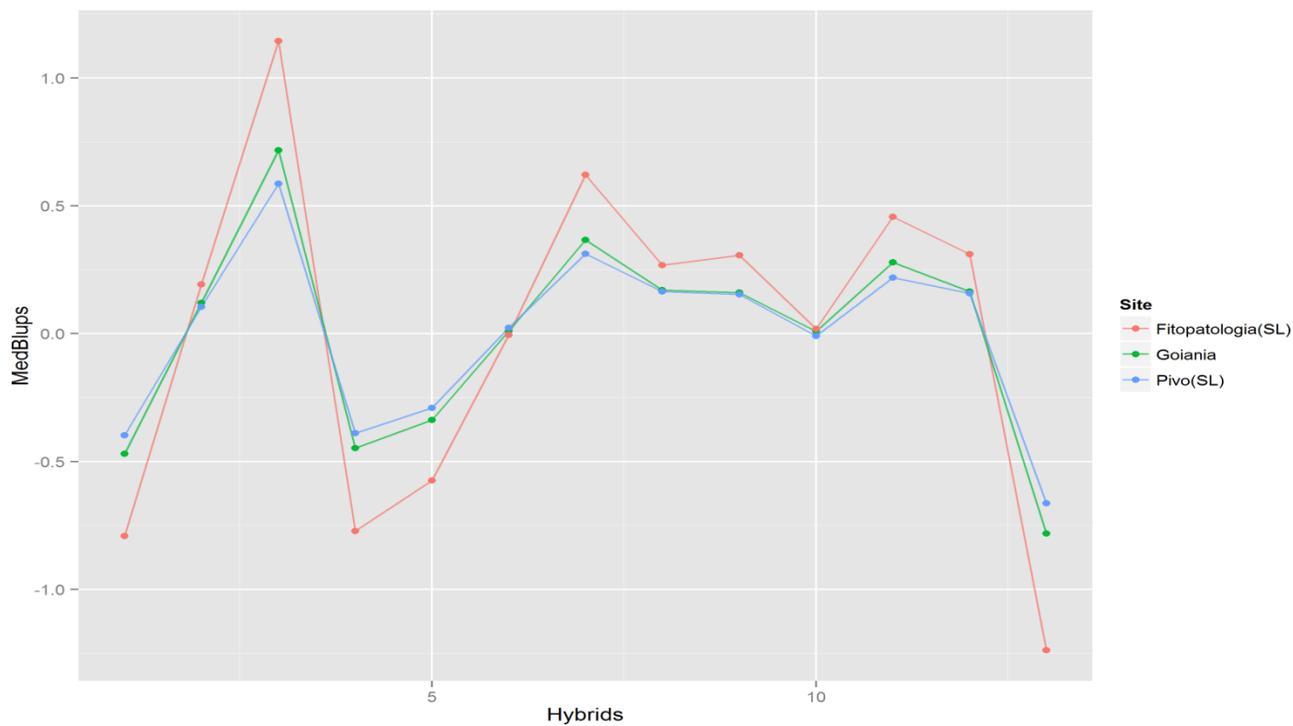


Figura 3 Valores BLUP da capacidade geral de combinação, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após o ajuste das matrizes G e R , e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho

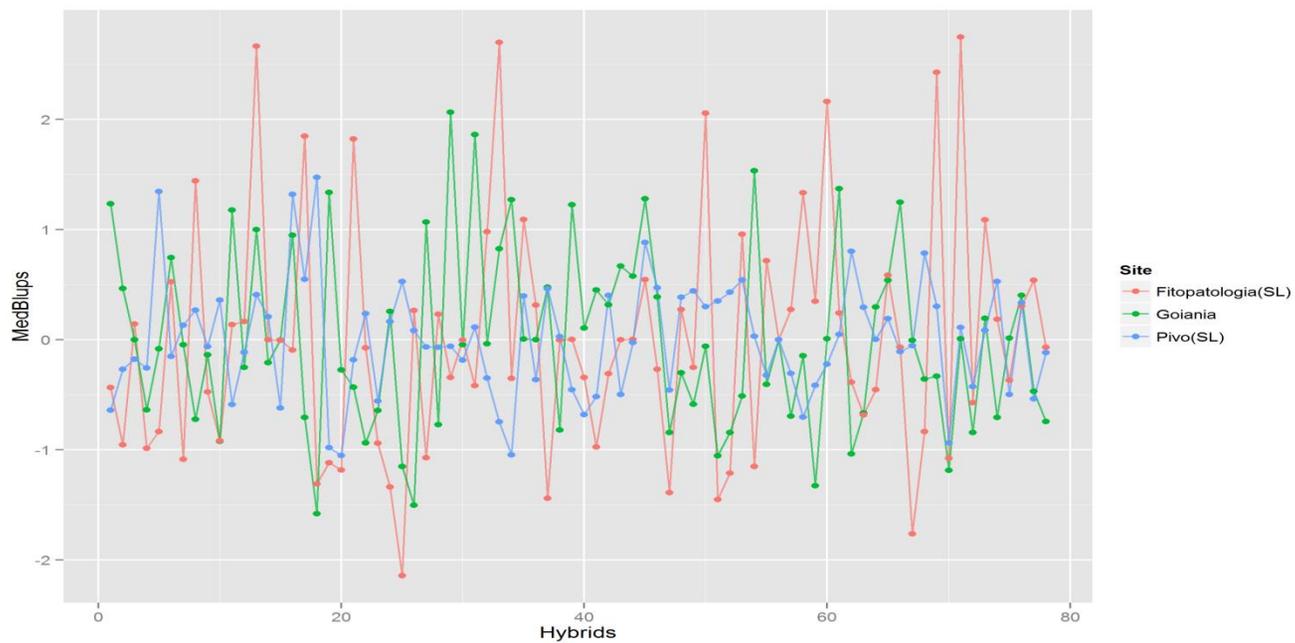


Figura 4 Valores BLUP da capacidade específica de combinação, obtidos da análise dialélica implícita conjunta após ajustadas as matrizes G e R , e também, com a incorporação da matriz de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho

Os efeitos preditos (BLUP) para CGC e CEC são desvios e proporcionam o melhor entendimento do tipo de herança, tanto pela magnitude dos efeitos, quanto pela relação entre os componentes de variância associados a estes efeitos. Entretanto, para a identificação dos híbridos superiores, é necessária a verificação dos efeitos genotípicos dos híbridos (BLUP), dados pela soma da média geral, com os efeitos CGC dos genitores e com o efeito da CEC da combinação entre os genitores. Quando consideramos as médias BLUP (efeitos genotípicos) dos híbridos para cada ambiente, é possível verificar que as melhores combinações híbridas diferiram entre os ambientes, de forma que, para o ambiente Goiânia, os híbridos com menores efeitos preditos para concentração de fumonisinas nos grãos foram 15, 57 e 72 (Figura 5). Já para a área da Fitopatologia em Sete Lagoas, os melhores foram os híbridos 4, 42 e 25 e para a área do Pivot em Sete Lagoas os melhores foram 34, 75 e 20. Sendo assim, para a seleção das melhores combinações híbridas, deve-se preconizar a indicação por ambiente ao invés de se utilizar a média geral obtida em uma análise conjunta. É oportuno salientar que a doença é função da presença do patógeno, do hospedeiro suscetível e das condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença. Neste trabalho, a incidência de fumonisinas foi dependente da presença natural do patógeno, aliada às condições ambientais, e estes fatores exerceram grande impacto na interação genótipos por ambientes, pois não houve a inoculação do patógeno.

Quando se trabalham com vários ambientes, o melhorista busca entender o comportamento de cada genótipo para que, em seguida, possa ser feita a recomendação. Essa indicação pode ser vista de duas formas, a primeira delas é por cultivares estáveis, ou seja, que mantêm o seu comportamento de forma consistente nos diferentes ambientes avaliados. Ou então, utilizar cultivares adaptadas a ambientes específicos. Considerando os resultados da análise dialélica conjunta explícita e nas análises implícitas, dando enfoque na

estabilidade das predições de CGC e como um reflexo da não significância da interação CGC por ambientes, pode-se ter uma boa ideia para selecionar os melhores genitores, de maneira a considerar todos os ambientes avaliados, visando uma menor concentração de fumonisina nos grãos de milho. Dentre os genitores que proporcionam diminuição da incidência de fumonisinas nos grãos, com base na CGC, dois são do grupo heterótico Dent (D) e o terceiro do grupo heterótico C (C). Já quando observamos a parte da capacidade específica de combinação, a interação CEC x Ambientes Foi significativa, por isso a recomendação de híbridos deve-se ser feita priorizando aquelas combinações que se mostraram com menores concentrações de fumonisinas em cada ambiente. Esse fato, mais uma vez, reforça que em fases iniciais de um programa de melhoramento para a concentração de fumonisinas em grãos de milho, a seleção pode ser realizada focando na escolha de testadores apropriados, ou seja, utilizando-se linhagens que proporcionem menores concentrações de fumonisinas nos grãos devido à sua contribuição genética-aditiva (CGC) e posteriormente deve-se preconizar a avaliação de híbridos.

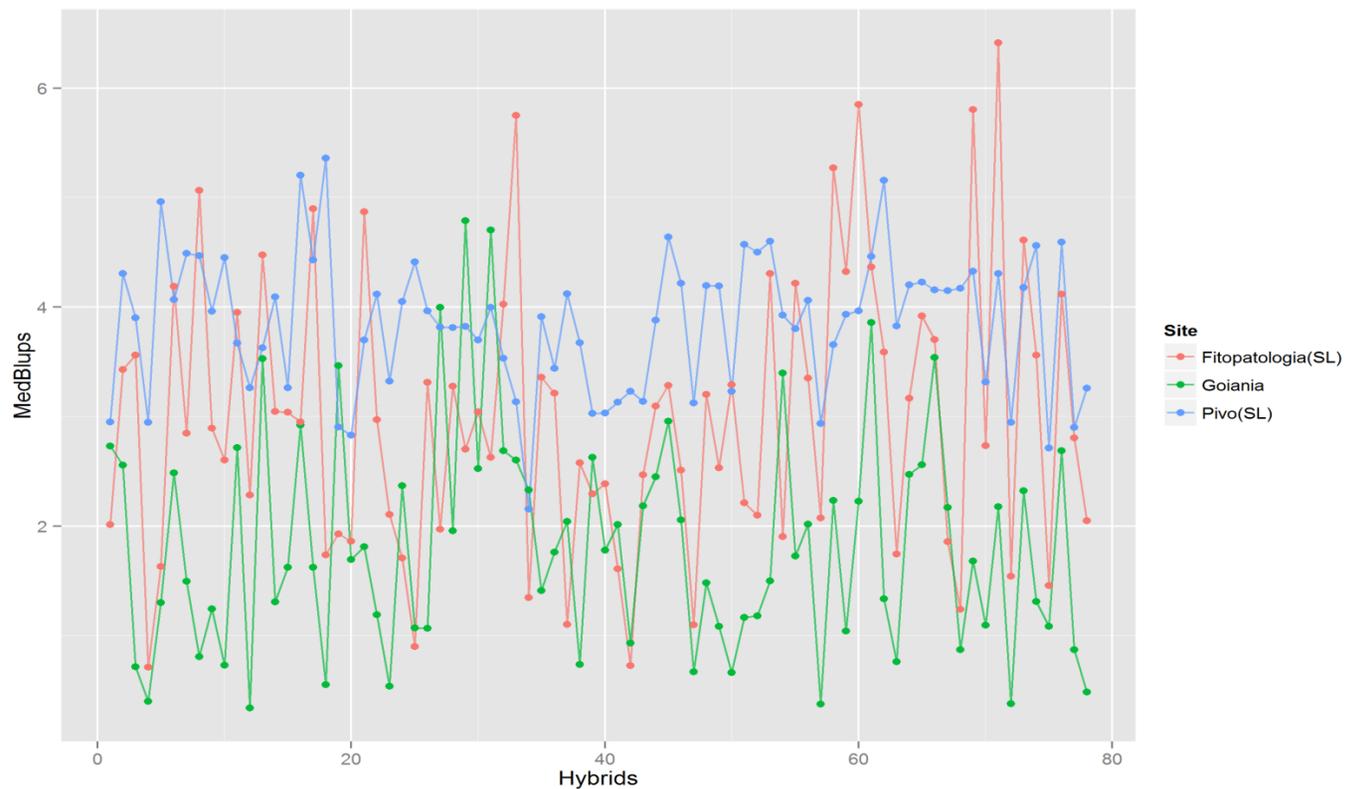


Figura 5 Médias BLUP dos híbridos, obtidos da análise dialéctica implícita conjunta após ajustadas as matrizes G e R , e também, com a incorporação das matrizes de parentesco aditivo, para a incidência de fumonisinas em grãos de milho

5 CONCLUSÕES

A resistência à incidência de fumonisinas em milho tropical é dependente de efeitos genéticos aditivos e não aditivos, entretanto, essa característica apresenta controle genético com predominância de efeitos não aditivos.

O ajuste de uma matriz VCOV Não estruturada para os efeitos genéticos e de uma matriz Diagonal para os efeitos residuais (não genéticos) e a incorporação da informação de parentesco genômico aditivo entre as linhagens do dialelo proporcionou a redução de erros associados aos efeitos de CGC para as análises dialélicas em cada ambiente estudado.

REFERÊNCIAS

AIDOO, K. E. Post-harvest stored and preservation of tropical crops. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 161-173, Oct. 1993.

AKAIKE, H. New look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, New York, v. 19, n. 6, p. 716-723, Dec. 1974.

ALBERTS, J. F. et al. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, Sept. 1990.

ANDRADE, V. T. **Implicações da modelagem estatística na seleção de progênies de cafeeiro**. 2013. 94 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Coluna do Saber, 2004. 219 p.

BEARZOTI, E. Emprego de marcadores em modelos mistos. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: Editora da UFLA, 2002. p. 21-43.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-515, July 2003.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Hardbound: Stemma, 2010. 369 p.

BERNARDO, R. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 1, p. 20-25, Jan./Feb. 1994.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, n. 11, p. 743-745, 1988.

BRADBURY, P. J. et al. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. **Bioinformatics**, London, v. 23, p. 2633–2635, June 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites aceitáveis de micotoxinas em grãos. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, 18 fev. 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep>. Acesso em: 11 jun. 2015.

BRASIL. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, 12 abr. 1996.

BURGUEÑO, J. et al. Genomic prediction of breeding values when modeling genotype × environment interaction using pedigree and dense molecular markers. **Crop Science**, Madison, v. 52, p. 707–719, Mar. 2012.

CAMARGOS, S. M. et al. Fumonisin in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 225-229, Feb. 2000.

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

CASELLA, G.; BERGER, R. L. **Statistical inference**. New York: Duxbury Press, 2002. 660 p.

CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. **Council for Agricultural Science and Technology**, Ames, p. 1–191, 2003. (Task Force Report, n. 139).

CASTELO, M. M.; SUMNER, S. S.; BULLERMAN, L. B. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 8, p. 1030-1033, Aug. 1998.

COCKERHAM, C. C. An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. **Genetics**, Bethesda, v. 39, n. 6, p. 859, Nov. 1954.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 15 dez. 2014.

COMSTOCK, R. E.; ROBINSON, H. F. Estimation of average dominance of genes. In: GOWEN, J. W. **Heterosis**. Ames: Iowa State College Press, 1952. p. 491-516.

COULOMBE, J. Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 3, p. 880–891, Apr. 1993.

CROSSA, J.; TABA, S.; WELLHAUSEN, E. J. Heterotic patterns among Mexican races of maize. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 1182-1190, July 1990.

CRUZ, C. D. et al. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora da UFV, 2004. 480 p.

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

CRUZ, J. V. da S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga**. 2010. 88 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

EISENHART, C. The assumptions underlying analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 3, n. 1, p. 1-42, Mar. 1955.

EL-KASSABY, Y. A.; KLAPSTE, J.; GUY, R. D. Breeding without breeding: selection using the genomic best linear unbiased predictor method (GBLUP). **New Forests**, Dordrecht, v. 43, n. 1, p. 631–637, Feb. 2012.

ELSHIRE, R. J. et al. A robust simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PlosOne**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. 1-10, Mar. 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.

FERREIRA, P. et al. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 1, p. 54-60, maio 2013.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 85-102, Nov. 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/570/default.aspx>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

FRITSCHÉ-NETO, R. **Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho**. 2011. 38 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

GAO, H. et al. Comparison on genomic predictions using three GBLUP methods and two single-step blending methods in the Nordic Holstein population. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 44, n. 8, p. 1-9, July 2012.

GARDNER, C. O.; EBERHART, S. A. Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, Washington, v. 22, n. 1, p. 439-452, Jan. 1966.

GELDERBLOM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July 1988.

GILMOUR, A. R. et al. **ASReml user guide**. Hemel Hempstead: VSN International, 2006. 398 p.

GLAUBITZ, J. C. et al. TASSEL-GBS: A High Capacity Genotyping by Sequencing Analysis Pipeline. **PlosOne**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 903-916, Feb. 2014.

GOMPERTZ, O. F. et al. Características gerais dos fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 451-506.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Boletim Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1-2, p. 15-19, jan./fev. 2001.

GRATTAPAGLIA, D. et al. High-throughput SNP genotyping in the highly heterozygous genome of eucalyptus: assay success, polymorphism and transferability across species. **BMC Plant Biology**, Oxford, v. 11, n. 65, p. 1-18, Apr. 2011.

GRIFFING, B. A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. **Heredity**, London, v. 10, n. 1, p. 31-50, 1956.

GUEDES, F. L. **Desempenho de híbridos de milho a partir de progênies contrastantes em relação ao uso de nitrogênio**. 2012. 84 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

HALLAUER, A. R.; CARENA, M. J.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 3. ed. New York: Springer, 2010. 663 p.

HANSEY, C. N. et al. Maize (*Zea mays* L.) genome diversity as revealed by RNA-sequencing. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p 1-12, Mar. 2012.

HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Technical note: prediction of breeding values using marker-derived relationship. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 9, p. 2089-2092, Sept. 2008.

HAYMAN, B. I. The theory and analysis of diallel crosses. **Genetics**, Bethesda, v. 39, n. 1, p. 789-809, 1954.

HAYMAN, B. I. The theory and analysis of diallel crosses. **Genetics**, Bethesda, v. 39, n. 6, p. 789-809, 1954.

HENDERSON, C. R. **Applications of linear models in animal breeding**. Guelph: University of Guelph, 1984. 462 p.

HENDERSON, C. R. Estimates of changes in herd environment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 32, n. 1, p. 706, 1949.

HERMANN, G.; PINTO, F. T.; KITAZAWA, S. E. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 7-10, abr. 2006.

HUNG, H. Y.; HOLLAND, J. B. Diallel analysis of resistance to fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. **Crop Science**, Madison, v. 52, n. 5, p. 2173-2181, Sep./Oct. 2012.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 2, p. 101-134, Oct. 2001.

INSTITUTE FOR GENOMIC DIVERSITY. Cornell University Institute of Biotechnology. Disponível em: <<http://www.biotech.cornell.edu/brc/genomic-diversity-facility/gbs-sample-submission>>. Acesso em: 07 ago. 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1993. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf>>. Acesso em: 26 jane. 2014.

JINKS, J. L.; HAYMAN, B. I. Analysis of diallel crosses. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 44-48, 1953.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE-SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, jul./set. 2006.

KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1980. 587 p.

LANZA, F. E. et al. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, Guildford, v. 65, n. 1, p. 232-237, Aug. 2014.

LOGRIECO, A. et al. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 597-609, 2002.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits: volume 1**. Sunderland: Sinauer, 1998. 980 p.

MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; WENTZ, I. Aflatoxinas: aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 635-643, 1994.

MALLOZZI, A. B.; CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 5-26, jul. 1998.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium ssp* e estudo da interação com a planta hospedeira.** 2005. 124 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MATHER, K. **Biometrical genetics.** New York: Dover, 1949. 158 p.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, jun. 2010.

MENDES, M. C. **Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho.** 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MENDES, M. P.; ABREU, A. F. B.; RAMALHO, M. A. P. Strategies in identifying individuals in a segregant population of common bean and implications of genotype x environment interaction in the success of selection. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p. 872-880, abr. 2012.

MIEDANER, T. et al. Genetic variation for resistance and mycotoxin content of European maize inoculated with *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 36, supl. B7, p. 45-48, Sept. 2008.

MIRANDA FILHO, J. B.; GORGULHO, E. P. Cruzamentos com testadores e dialelos. In: NASS, L. L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 649-671.

MOHRING, J.; MELCHINGER, A. E.; PIEPHO, H. P. REML-based diallel analysis. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 2, p. 470-478, Mar./Apr. 2011.

MRODE, R. A. **Linear models for the prediction of animal breeding values.** Guildford: Biddles, 1996. 184 p.

MRODE, R. et al. Random regression model for the genetic evaluation of production traits of dairy cattle in the UK. **Interbull Bulletin**, London, v. 33, n. 1, p. 1-4, June, 2005.

MUNHOZ, P. R. et al. Genomic relationship matrix for correcting pedigree errors in breeding populations: impact on genetic parameters and genomic selection accuracy. **Crop Science**, Madison, v. 54, n. 7, p. 1115-1123, May/June 2014.

MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 1, p. 1169–1173, 1997.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 6, p. 459-462, Nov. 2000.

ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 75-87, 2000.

OTUBO, S. T. **Controle genético da tolerância do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a baixas temperaturas na fase de germinação**. 1994. 50 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

PAYNE, R. W. et al. **GenStat for windows**. 11. ed. Hemel Hempstead: VSN International, 2009.

PERAICA, M. et al. The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 105-112, July 1999.

PIEPHO, H. P.; MOHRING, J.; MELCHINGER, A. E. BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. **Euphytica**, Wageningen, v. 161, n. 1, p. 209-228, Apr. 2008.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos**. Piracicaba: Editora FEALQ, 2002. 309 p.

PINTO, N. F. J. A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 6 p. (Circular Técnica).

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, supl. 1, p. 41-46, 2000. Disponível em: <http://pdfserve.informaworld.com/630710_731298257_744118730.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2014.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2009. 519 p.

POZZI, C. R. et al. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, set./out. 2002.

QUEIROZ, V. A. V. et al. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 28, n. 1, p. 83-86, May 2012.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R foundation for statistical computing. [S.l:s.n.], 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: Editora da UFLA, 2012. 522 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; ZIMMERMANN, M. J. O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicação ao melhoramento de feijoeiro**. Goiânia: Editora da UFG, 1993. 271 p.

RAMOS, C. R. B. A.; BRASIL, E. M.; GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 95-102, jun. 2008.

REID, L. M. et al. **Screening maize for resistance to gibberella ear rot agriculture and agri-food Canada**. Otawwa: Research Branch Agriculture and Agri-Food Canada, 1996. 40 p.

RESENDE, M. D. V. **Selegen-Reml/Blup: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 361 p.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182-194, set. 2007.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, May 2002.

ROBERTSON, L. A. et al. Heritabilities and correlations of *Fusarium* ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 1, p. 353-361, Feb. 2006.

SAGHAI-MAROOF, M. A. et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, Dec. 1984.

SANCHEZ-RANGEL, D. A.; SANHUAN-BADILLO, A.; PLASENCIA, J. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 22, p. 8565-8571, Nov. 2005.

SANTOS, J. B. dos. **Controle genético de caracteres agronômicos e potencialidades de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para o melhoramento genético**. 1984. 223 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

SANTOS, J. P. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. In: CRUZ, J. C. et al. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 257-302.

SCHAEFFER, L. R. C. R. Henderson: contributions to predicting genetic merit. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 11, p. 4052-4066, Nov. 1991.

SHURTLEFF, M. C. **A compendium of corn disease**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1992. 245 p.

SOUZA JÚNIOR, C. L. **Componentes da variância genética e suas implicações no melhoramento vegetal**. 1989. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

SPRAGUE, G. F.; TATUM, L. A. General vs, specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, Madison, v. 34, n. 10, p. 923-932, 1942.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT 9.0: user's** guide. Cary: SAS Institute, 2009.

STEFANELLO, J. et al. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 476-481, out./dez. 2012.

TAMAMES, F. Micotoxinas, micotoxicosis e inmunosupresión. In: SCUSSEL, V. M.; ROCHA, M. **Atualidades em micotoxinas e armazenamento de grãos II**. Florianópolis: ABMAG, 2008. p. 557-561.

TANAKA, M. A. S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 60-64, mar. 2001.

TECHNOW, F. et al. Genome properties and prospects of genomic prediction of hybrid performance in a breeding program of maize. **Genetics**, Bethesda, v. 197, n. 4, p. 1343-1355, Aug. 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2014. Disponível em: <<http://www.usda.gov/>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

VANRADEN, P. M. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 11, p. 4414-4423, Nov. 2008.

VARGAS, E. A. et al. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 981-986, Nov. 2001.

VASAL, S. K. et al. Heterosis and combining ability of CIMMYT's tropical late white maize germplasm. **Maydica**, Bergamo, v. 37, n. 2, p. 217-223, 1992.

- VENCOVSKY, R. **Alguns aspectos teóricos e aplicados relativos a cruzamento dialélicos de variedades**. 1970. 59 p. Tese (Livre-Docente) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.
- VICAM SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Fumoni test and aflatoxin test instructions manual VICAM**. Watertown: Waters Corporation, 1998. 39 p.
- VOSS, K. A.; SMITH, G. W.; HASCHEK, W. M. Fumonins: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, n. 3-4, p. 299-325, Oct. 2007.
- WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 22, p. 486-490, Aug. 1991.
- WILLIAMS, W. P.; WINDHAM, G. L. Diallel analysis of fumonin accumulation in maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 324-326, Aug. 2009.
- WIMMER, V. et al. **Framework for the analysis of genomic prediction data using R**. [S.l.: s.n.], 2015. Disponível em: <<http://cran.rproject.org/web/packages/synbreed/synbreed.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International programme on chemical safety**. [S.l.]:WHO, 2000. (Environmental Health Criteria Monographs, 219). Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_219_rev_1.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2014.
- WRICKE, G.; WEBER, W.E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. New York: Walter de Gruyter, 1986. 406 p.
- ZENG, J. et al. Genomic breeding value prediction and QTL mapping of QTL MAS 2011 data using Bayesian and GBLUP methods. **BMC Proceedings**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 1-5, May 2012.
- ZLOTOWSKI, P. et al. Surto de aflatoxicose em suínos no estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 207-210, out./dez. 2004.