

LEONARDO FIORAVANTE GOTARDI

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERES RELACIONADOS À
QUALIDADE DO GRÃO DE MILHO-PIPOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Marcelo Soriano Viana

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G683a
2022
Gotardi, Leonardo Fioravante, 1996-
Associação genômica ampla para caracteres relacionados à
qualidade do grão de milho-pipoca / Leonardo Fioravante
Gotardi. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (37 f.): il.

Inclui anexos.

Orientador: José Marcelo Soriano Viana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f. 28-33.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.272>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Zea mays everta* - Genética. 2. *Zea mays everta* -
Qualidade. 3. Amido. 4. Amilose. 5. Estudo de associação
genômica ampla. I. Viana, José Marcelo Soriano, 1963-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.152

LEONARDO FIORAVANTE GOTARDI

**ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERES RELACIONADOS À
QUALIDADE DO GRÃO DE MILHO-PIPOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2022

Assentimento:


Leonardo Fioravante Gotardi
Autor


José Marcelo Soriano Viana
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e das virtudes de paciência e perseverança.

Agradeço aos meus pais por todos os ensinamentos, e cuidado com a minha formação pessoal e profissional, e por sempre se fazerem presentes no meu dia a dia mesmo com a distância. Agradeço aos demais familiares, irmão, sobrinhos e cunhada pelo apoio e suporte. Em especial, ao meu primo Ronaldo (*in memorial*) pelo incentivo e apoio.

Meus agradecimentos a Thaina Fernanda Fillietaz Saia não somente pelo companheirismo nestes anos, mas também pela ajuda na condução dos ensaios e todos os ensinamentos de “bancada”.

Aos amigos Lucas Leal e Angélica, muito obrigado! Por todas as orientações e pelas conversas que se fizeram tão importantes neste período de pandemia.

Gostaria de agradecer ao Pf^o José Marcelo Soriano Viana, pela oportunidade em fazer parte de sua equipe, pela confiança em meu trabalho, apoio nas minhas decisões, além dos ensinamentos e atenção. Ao Pf^o Humberto Josué de Oliveira Ramos e Pf^a Juliana Lopes Rangel Fietto, por toda orientação durante a condução deste projeto, receptibilidade e infraestrutura cedida. À Raissa Barbosa de Castro pelo suporte, disponibilidade e orientação nas determinações do conteúdo de zeínas e subunidades via eletroforese capilar.

Meus agradecimentos a Sâmera Breves, Rita Sant’ana e Paulo Lemos pelas ideias e auxílio na definição dos procedimentos. Aos colegas e técnicos do Programa Milho Pipoca, Leonardo, Marcio, Matheus, Jean, Igor, Vitor e Nathália.

Aos docentes Pf^o Reinaldo Francisco Teófilo e Pf^a Elizabeth Pacheco Batista Fontes pelo suporte na condução das atividades deste projeto. Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) pelas ideias e conversas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Por fim, gostaria de agradecer aos docentes que contribuíram à minha formação acadêmica Pf^o Dr. Fernando Angelo Piotto, Pf^o Dr. Ricardo Antunes Azevedo e Pf^o Dr. Roberto Fritsche Neto.

RESUMO

GOTARDI, Leonardo Fioravante, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Associação genômica ampla para caracteres relacionados à qualidade do grão de milho-pipoca.** Orientador: José Marcelo Soriano Viana.

Os caracteres relacionados a qualidade do grão são de herança poligênica e de estrutura gênica complexa. As alfa-zeínas possuem relação com a capacidade de expansão do grão, enquanto amido, amilose e amilopectina estão relacionados com a textura do grão, desempenhando papel chave na expansão do endosperma translúcido. Foram avaliados 286 genótipos pertencentes a duas populações UFV-MP5 e Beija-Flor. O estudo de associação genômica foi conduzido com 140.520 SNPs e 109.999 SNPs, envolvendo 10 e sete caracteres relacionados a qualidade do grão, respectivamente às populações UFV-MP5 e Beija-Flor. Os resultados demonstraram que existe divergência genética entre as populações para conteúdo de alfa-zeínas (19 e 22 kDa), mas também para concentração de zeínas totais e subunidades de 21 e 27 kDa. Os dados fenotípicos em conjunto com dados genotípicos foram analisados por associação genômica. Para a população UFV-MP5, foram identificadas 209 associações significativas, sendo 102 referentes a subunidade de 19 kDa, 80 referentes a subunidade de 22 kDa, 8 referentes ao conteúdo de amido e 19 referentes ao conteúdo de amilose. Os genes candidatos para esta população foram relacionados a quatro processos biológicos, um componente celular, quatro funções moleculares e cinco classes de proteínas. Na população Beija Flor foram identificadas seis associações referente a subunidade de 21 kDa. Ao teor de amido e amilose foram identificados quatro genes candidatos, distribuídos em quatro cromossomos (1, 2, 6 e 10). Além destes, foram identificados oito genes candidatos relacionadas as subunidades de zeínas, destes três genes relacionados a biossíntese de alfa-zeínas além de fatores de transcrição e chaperonas, demonstrando que o acúmulo e biossíntese de zeínas é regido por múltiplos elementos, envolvendo famílias gênicas e fatores transcricionais. Além disso, a utilização da eletroforese micro fluídica, demonstrou-se como ferramenta promissora na caracterização de genótipos em larga escala e na identificação de genótipos de alta CE.

Palavras-chave: Milho Pipoca. Alfa-Zeínas. Amido. Amilose. GWAs

ABSTRACT

GOTARDI, Leonardo Fioravante, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Genome-wide association study for popcorn quality related traits.** Adviser: José Marcelo Soriano Viana.

Many quality trait related to grain is a quantitative trait and has complex structure genetics. Alfa-zeins can be associated with a volume of expansion in popcorn, however, starch, amylose, and amylopectin are related to grain texture, play a role in translucent's endosperm. In this study, we evaluated 286 genotypes of two populations UFV-MP5 (bi-parental population) and Beija-Flor (tropical population). The genome-wide studies had performed with 140.530 SNPs and 109.999 SNPs, for ten and seven quality traits related to UFV-MP5 and Beija-Flor, respectively. The results suggested interpopulation genetic diversity for alfa-zeins content (19 e 22 kDa), but also for concentration of total zein and subunits of 21 and 27 kDa in popcorn. The Phenotypic data and genotypic data had analyzed together via GWAS. In UFV-MP5, we found 209 significant associations, of which 102 associated with 19 kDa zein subunits, 80 associated with 22 kDa zein subunits, eight associated with starch content, and 19 associated with amylose content. The candidate genes were related to four biological processes, one cellular component, four molecular functions, and five protein classes. In Beija-Flor, we found six significant associations for 21 kDa subunit zein. Four genes candidate had identified for starch and amylose contentes, distributed in four chromosomes (1, 2, 6 and 10). In addition, eight candidate genes for zeins subunits were identified, which three genes related to alfa-zeins biosynthesis in addition to transcription factors and chaperones. This evidence suggests that zeins accumulation and biosynthesis could be dependent on many elements such as families of gene and transcriptional factors. In this scenario, this work suggested genes involved direct in zein biosynthesis in popcorn, this information can be useful for breeding programs and biotechnology studies. Moreover, the lab-on-a-chip electrophoresis has shown to be promising for evaluation on a large scale of genotypes and in the identification of high capacity of expansion genotypes.

Keywords: Popcorn. Alfa-zeins. Starch. Amylose. GWAs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivos Gerais	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Material Vegetal	11
3.2. Fenotipagem.....	11
3.2.1. Extração e quantificação dos teores de amilose, amilopectina e amido total.....	11
3.2.2. Extração e quantificação de Zeínas totais e subunidades	11
3.3. Genotipagem	13
3.4. Mapeamento associativo.....	14
4. RESULTADOS	16
4.1. Caracterização fenotípica.....	16
4.2. Estudos de associação genômica	18
5. DISCUSSÃO.....	22
5.1. Caracterização Fenotípica.....	22
5.2. Estudo de Associação Genômica.....	23
6. CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO	34

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de expansão (CE) e aspectos relacionados a palatabilidade, como textura e sabor, representam os principais caracteres relacionados à qualidade do grão em milho-pipoca (SWELEY; ROSE; JACKSON, 2013). O grão é composto por amido (72%), proteínas (10%) e lipídios (4%), além de vitaminas e sais minerais (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010). O amido é considerado o principal polímero envolvido no processo de expansão do grão (SWELEY; ROSE; JACKSON, 2013), sendo composto pelos homopolissacarídeos amilose e amilopectina (NELSON; PAN, 1995). A amilose representa de 21 a 30% do teor de amido em sementes de milho, sendo caracterizada como uma cadeia linear de glicose com predominância de ligações do tipo α -1,4, com ramificações ocasionais devido ligações do tipo α -1,6. Já a amilopectina é considerada um polímero mais complexo de glicose, devido a predominância de ramificações na cadeia envolvendo ligações do tipo α -1,6 entre os resíduos de glicose e representa cerca de 70 a 79% do conteúdo de amido do grão (NELSON; PAN, 1995; WILSON et al., 2014). Estudos demonstraram que não existe correlação significativa entre capacidade de expansão e teores de amilose, amilopectina (BORRAS et al., 2006) e amido (SAITO et al., 2021); entretanto esses compostos estão relacionados com a textura do grão e desempenham importante função durante a expansão do endosperma translúcido.

As proteínas de reserva em milho são classificadas em famílias por similaridade de sequência primária em albuminas, globulinas, glutaminas e prolaminas. As prolaminas representam a maior fração de proteínas no endosperma (50 a 70%) (KRIZ, 2009; LARKINS; VASIL, 1997; LI; SONG, 2020) e são caracterizadas por apresentarem maior proporção dos aminoácidos prolina e glutamina (SHEWRY, P. R.; CASEY, R., 1999). As prolaminas de milho foram caracterizadas e nomeadas por John Gorham em 1821 como zeínas (SHUKLA; CHERYAN, 2001). As zeínas podem ser classificadas em quatro classes (α -, β -, γ - e δ - zeínas) em função da solubilidade, capacidade em formar pontes dissulfetos e massa molecular (HOLDING, 2014). As Alfa-Zeínas (22 e 19 kDa) são codificadas por quatro subfamília de genes Z1A, Z1B, Z1C e Z1D e representam cerca de 70% do total de zeínas do endosperma (SONG et al., 2001; SONG & MESSING, 2002). As β -zeínas (15 kDa), δ -zeínas (10 e 18 kDa) e γ -zeínas (16, 27 e 50 kDa) são usualmente codificadas por uma única cópia de gene (LI; SONG, 2020). As γ -zeínas representam a segunda maior fração de zeínas no endosperma e apresentam maior proporção do aminoácido cisteína (KRIZ, 2009). Em milho-pipoca, as alfa-

zeínas estão relacionadas com a dureza do endosperma e com CE, como demonstrado por BORRAS et al. (2006) ao observar correlação de 0.963 entre teor de alfa-zeínas e CE.

Em relação aos métodos de quantificação de amilose e amilopectina, tem-se que o método de determinação iodométrico representa a principal metodologia em uso (BATES; FRENCH; RUNDLE, 1943; MORRISON; LAIGNELET, 1983). Alterações desta metodologia vêm sendo implementadas, visando aumentar a precisão das estimativas. A exemplo, ZHU et al. (2008) propôs a utilização de dois comprimentos de onda – 620 e 510 *nm* para estimativa do teor de amilose, enquanto SENE ET AL. (1997) incorpora seis comprimentos de ondas distintos. O método enzimático (GIBSON; SOLAH; MCCLEARY, 1997), cromatografia líquida de alta performance por exclusão molecular (HPSEC) (KOBAYASHI; SCHWARTZ; LINEBACK, 1985; GRANT ET AL., 2002), calorimetria de varredura diferencial (DSC) (SIEVERT; HOLM, 1993) e espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) (SAMPAIO et al., 2018) representam outras metodologias utilizadas à quantificação de amilose, amilopectina e amido. Para quantificação de zeínas, tem-se a utilização de SDS-PAGE na caracterização do perfil de distribuição das subunidades de zeínas, (PARSONS et al., 2020; HAMAKER ET AL., 1995), uso de anticorpos (ELISA) (WALLACE et al., 1990), cromatografia líquida de fase reversa (RE-HPLC) (FLINT-GARCIA; BODNAR; SCOTT, 2009; SHAWA; BILJON; LABUSCHAGNE, 2021), eletroforese capilar (PARRIS; DICKEY; CRAIG, 1997) e espectrometria de massas (POSTU et al., 2019).

Os estudos de associação genômica ampla (GWAs) buscam estabelecer associações entre diferenças fenotípicas observadas e variações genotípicas, por meio de modelos estatísticos (XIAO et al., 2017). Trata-se de uma ferramenta importante na compreensão da arquitetura genética de caracteres quantitativos como os relacionados com a qualidade do grão. A exemplo, ZHENG et al., (2021) utilizou GWAs para identificação de genes relacionados com qualidade do grão em milho, considerando teores de umidade do grão, amido, óleo, proteína e lisina. Para teor de amilose no grão, LI et al. (2018) identificou 27 loci associados com 39 genes candidatos via GWAs, o que contribuiu para melhor compreensão da via de biossíntese de amilose. PANG et al. (2019) em estudo de eQTL (loci de expressão de traços quantitativos) para genes relacionados ao tamanho do grão, identificou 10 associações relacionadas ao conteúdo de zeínas.

Em relação a milho-pipoca pouco se conhece a respeito do conteúdo e distribuição das subunidades de zeínas bem como, sua relação com qualidade do grão seja em populações de origem temperada ou tropical. A inexistência de trabalhos envolvendo a caracterização de

zeínas e subunidades em escala compatível com os programas de melhoramento de milho-pipoca (dezenas a centenas de indivíduos) está associado em grande parte a dificuldade de desenvolver e incorporar metodologias de quantificação que sejam compatíveis com a avaliação em larga escala, mas que também sejam precisas e pouco laboriosas. Desta forma, nós avaliamos a viabilidade da incorporação da eletroforese microfluídica “lab-on-a-chip” como ferramenta para quantificação de zeínas e subunidades de zeínas. Esta técnica tem por vantagens maior acurácia na comparação com SDS-PAGE e alto rendimento nas avaliações, compatível com as exigências dos programas de melhoramento (GOETZ et al., 2004).

A identificação de genes relacionados a biossíntese e acúmulo de alfa-zeínas, amido, amilose e amilopectina permitem melhor compreensão das vias biossintéticas desses compostos e identificação de relações genômicas entre as vias, o que pode contribuir ao desenvolvimento de genótipos com maior CE por meio da incorporação de técnicas de biotecnologia e engenharia genética. Este trabalho teve por objetivos a caracterização de populações de milho-pipoca de origem tropical e temperada quanto ao conteúdo de zeínas totais e subunidades de Zeínas, e a caracterização de população tropical para conteúdo de amilose, amilopectina e amido total. Para tal propósito, fez-se necessário o desenvolvimento e ajustes de protocolos de extração e quantificação destes componentes. Por meio de estudos de associação genômica ampla, buscou-se validar e identificar genes relacionados a biossíntese de zeínas, amilose, amilopectina e amido.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Caracterizar populações de milho pipoca de origem tropical e temperada quanto caracteres relacionados a qualidade estrutural e nutricional de sementes. Identificar regiões do genoma de milho pipoca associadas ao conteúdo de prolaminas, amilose, amilopectina e amido total.

2.2. Objetivos específicos

Desenvolver e ajustar protocolo de extração de prolaminas para milho pipoca, e estabelecer procedimento para quantificação das subunidades de prolaminas.

Implementar e ajustar para milho pipoca procedimentos para determinação e quantificação dos teores de amilose, amilopectina e amido total.

Identificar marcadores SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) associados aos teores amilose, amilopectina, amido total, zeínas e subunidades.

Realizar a anotação funcional dos SNP's significativos e identificar fatores moleculares candidatos relacionados ao controle destas características.

Analisar a localização de marcadores significativos para estes caracteres, e estabelecer possíveis relações genômicas entre eles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Neste estudo foram fenotipadas e genotipadas 183 plantas pertencentes a população UFV-MP5 e 103 plantas provenientes da população Beija-Flor. As duas populações divergem quanto a origem. A população temperada, denominada UFV-MP5 foi gerada por meio de cruzamento bi parental (safra 2016/2016), envolvendo o híbrido Americano AP4502 (desenvolvido pela *Agricultural Alumni Seed Improvement Association*, Romney, EUA). A população tropical Beija Flor foi desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), após quatro ciclos de seleção para CE.

3.2. Fenotipagem

3.2.1. Extração e quantificação dos teores de amilose, amilopectina e amido total

As estimativas dos teores de amilose, amilopectina e amido total foram obtidas para a população de origem temperada. As determinações foram realizadas utilizando grãos inteiros armazenados previamente em câmara fria. Os grãos (2 g) foram moídos em moinho de bolas até obtenção de farinha homogênea. As determinações foram realizadas utilizando o kit comercial Amylose / Amylopectin da Megazyme (Megazyme Ireland International, Ltd, Bray, Ireland), conforme protocolo padrão (<https://www.megazyme.com/amylose-amylopectin-assay-kit>). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 510 nm. O teor de amido total foi estimado em percentual, de acordo com fórmula estabelecida por GIBSON; SOLAH; MCCLEARY (1997), que leva em consideração a absorvância do padrão de glicose. As estimativas foram obtidas com base em duas replicatas biológicas e cinco replicatas técnicas.

3.2.2. Extração e quantificação de Zeínas totais e subunidades

A maior concentração de zeínas é observada no endosperma, desta forma os protocolos de extração envolvem a remoção de pericarpo e embrião do grão. Os grãos foram pesados (aproximadamente 7 g) e submersos em água destilada durante 30 minutos, visando favorecer a remoção do pericarpo e embrião. Em seguida, foi realizado a remoção do pericarpo com auxílio de pinça e do embrião com auxílio de bisturi. Os endospermas foram secos em liofilizador por um período de 96 horas (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2004), seguido

de moagem em moinho de bolas . Em período prévio às extrações, foi realizada a remoção de lipídios do endosperma. Esta etapa consistiu na adição de éter de petróleo (1ml) nas amostras de endosperma (100 mg), seguido de agitação em *Shaker* (15 min; 25°C; 130 rpm), centrifugação (15 min, 25°C, 12000 x g) e remoção do sobrenadante, contendo a fração lipídica (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2000). Este procedimento foi realizado duas vezes, visando garantir a remoção da maior proporção de lipídios. Em seguida, a farinha desengordurada foi seca em liofilizador por cerca de 12 horas.

A extração de zeínas foi realizada a partir de duas extrações sucessivas, a primeira visando a extração de proteínas totais, e a segunda zeínas totais. A extração de proteínas totais foi realizada por meio da adição de 1 mL do tampão de extração (0.0125 mM de borato de sódio - pH10; 1% SDS (v/v); 2% 2-β-Mercaptoetanol) a farinha desengordurada. Após a adição do tampão de extração, os micros tubos permaneceram sob agitação em *Shaker* (25°C; 130 RPM) durante 3 h, seguido de centrifugação (15 min; 25°C; 13300 x g) e armazenamento do sobrenadante (PARSONS et al., 2020; WALLACE et al., 1990). O sobrenadante representa a porção proteica do extrato, portanto foi a fração utilizada para extração de zeínas totais. A extração de zeínas foi realizada com base no procedimento proposto por Wallace et al. (1990) com ajustes para milho pipoca. A metodologia se baseia na separação dos extratos de proteínas totais em porções zeínas e não zeínas (WALLACE et al., 1990; HAMAKER ET AL., 1995).

As zeínas também são caracterizadas por serem solúveis em solução alcoólica. Os extratores mais comuns são etanol e isopropanol. A extração de zeínas totais foi realizada a partir da adição de etanol absoluto ao sobrenadante proveniente da extração de proteínas totais obtendo um extrato com 70% de solução alcoólica (v/v) (WALLACE et al., 1990). Os micros tubos foram incubados *overnight* sob agitação em *Shaker* (16 h; 4°C; 30 RPM), seguido por centrifugação (15 min; 4°C; 13300 x g) e armazenamento do sobrenadante. Em função da solubilidade em solução alcóolica, o sobrenadante representa a porção de zeínas e o pellet compreende as proteínas do tipo não zeínas (PARSONS et al., 2020; WALLACE et al., 1990). Os extratos de zeínas foram caracterizados por meio de eletroforese microfluídica “lab-on-a-chip”. A quantificação de zeínas totais e subunidades foi realizada utilizando o sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* e o Kit *Agilent Protein 80* (recomendado para proteínas entre 5 a 80 kDa), conforme protocolo da *Agilent Technologies*. As estimativas em percentuais das subunidades de zeínas bem como, a concentração total de zeínas foi obtida utilizando o *Software Agilent 2100 expert*. As diferenças populacionais para os dados fenotípicos foram avaliadas segundo teste F a 5% de significância (FISHER, 1936).

Uma amostra dos acessos foi caracterizada via gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em conjunto com um padrão comercial de Zeínas (*Sigma-Aldrich*) e marcador de massa molecular, visando comprovar os perfis de distribuição das subunidades de zeínas (PARSONS et al., 2020). A eletroforese foi realizada conforme metodologia proposta por (LAEMMLI, 1970), com gel de empilhamento e separação, 4 e 12.5% de poliacrilamida, respectivamente. Após corrida eletroforética (2 h, 100 V), os géis foram fixados em solução fixadora (10% de metanol; 5% de ácido acético) sob agitação em *Shaker* (2 h; 25°C, 40 RPM). A coloração dos géis foi realizada utilizando solução *Cromassie G-250* por 48 horas, seguido de adição de solução descorante contendo 7.5% de ácido acético (v/v) e 25% de metanol (v/v). Os géis foram escaneados para efeito de checagem da qualidade das extrações (ANEXO E).

3.3. Genotipagem

A coleta do material genético foi realizada em estágio fenológico com três folhas completamente expandidas (V3). O DNA genômico foi extraído segundo protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) com modificações (JIAO et al., 2017; DOYLE, 1990). A determinação do grau de pureza foi realizada em espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Scientific, USA) e a quantificação do DNA foi realizada no Qubit® 2.0 Fluorometer (LifeTechnologies). A genotipagem por sequenciamento (GBS) da população tropical foi realizado pelo Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Montreal, utilizando o sequenciador *Nextseq500* (leituras de extremidade única de 85 bp). O GBS da população temperada foi realizado pelo Institute of Biotechnology at Cornell University, utilizando o sequenciador Hi-Seq (leituras em pares de 125 bp).

Foram realizadas duas chamadas de SNP pelo *Institute of Biotechnology* e *Omega Bioservices*, Norcross, GA, respectivamente para população temperada e tropical, utilizando o genoma referência B73 versão 4 (JIAO et al., 2017). Após a chamada de SNP, o conjunto de marcadores foi lido pelo pacote *vcfR* do *software R* (KNAUS; GRÜNWALD, 2017), seguido de filtragem por alelo perdido e cromossomo. Em seguida foram calculadas as taxas de *Call rate* (CR), *Genotype Call rate* e *Minor Allele Frequency* (MAF), empregando o pacote *HapEstXXR* do *software R* (BROWNING; BROWNING, 2009; KNUEPPEL; MAINTAINER, 2013). Os marcadores foram filtrados para $MAF > 0.01$, $CR > 0.90$ e $Genotype Call rate > 0.90$, seguido de imputação em *Beagle* (BROWNING; BROWNING, 2009) utilizando o pacote *Synbreed* do *Software R* (WIMMER et al., 2012). Após controle de qualidade e imputação, o número de SNP foi de 145,420 e 109,999 para população temperada e tropical, respectivamente.

3.4. Mapeamento associativo

As análises de associação genômica (GWAs) foram realizadas segundo modelo Q+K proposto por YU et al. (2006), considerando a relação de parentesco genômico entre os genótipos (Matriz de Parentesco Genômico, K) e estrutura populacional (Matriz Q), visando reduzir associações espúrias. Genericamente, o modelo é dado por:

$$y = X\beta + S\alpha + Qv + Zu + \varepsilon$$

Sendo:

y : Vetor das observações fenotípicas;

β : Vetor de efeitos fixos que não sejam SNP ou efeitos de grupo populacional;

α : Vetor de efeito fixo de SNPs;

v : Vetor de efeito fixo associado a estrutura populacional;

u : Vetor aleatório dos efeitos genéticos aditivos com matriz de covariância $K\sigma_g^2$, sendo K a matriz de parentesco aditivo genômica, e σ_g^2 o componente de variância genético aditivo.

ε : Vetor de resíduos aleatórios com matriz de covariância $I\sigma_e^2$, sendo I uma matriz identidade e σ_e^2 o componente de variância residual.

Q : Matriz de estrutura populacional obtida pelo *software* STRUCTURE que relaciona os vetores y e v

X, S e Z : Matrizes de incidência contendo 1 e 0 dos vetores β, α e u , respectivamente

Em razão da população UFV-MP5 ser geração F2 proveniente de híbrido simples, com frequência predominante de MAF de 0.5 (ANDRADE et al., 2019) foi implementado para esta população além da matriz K a estrutura populacional (Matriz Q) no modelo. A matriz Q foi obtida utilizando o *software Structure* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), com base em 1000 SNPs tomados ao acaso (100 SNPs por cromossomo). Os parâmetros adotados foram os seguintes: número de repetições de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) após *burn-in* = 9000, modelo de ancestralidade = modelo de não mistura, modelo de frequência alélica = frequência alélica não correlacionada, número de populações (K) = 1-4, e número de interações consecutivas e independentes = 5. A definição do K subgrupos foi realizada com base na metodologia proposta por EVANNO et al. (2005), que leva em consideração o valor de delta K (ΔK).

As análises de GWAs foram realizadas utilizando os pacotes *GWASpoly* (ROSYARA, 2016) e *rrBlup* do *software R* (ENDELMAN, 2011). Ao controle do erro tipo I entre as associações marcador-característica usamos a taxa de falsa descoberta de Benjamini & Hochberg (FDR), considerando 5% de nível de significância (BENJAMINI; HOCHBERG,

1995). Para definição do q-valor de cada SNP e de sua significância, foi considerado como *threshold* $FDR \leq 0.05$. As estimativas de q-valor foram obtidas utilizando o pacote *q-value* do software R (DABNEY; STOREY, 2011).

Na população UFV-MP5 conforme foi observado por Andrade (2019) em estudo de desequilíbrio de ligação (LD) e blocos de haplótipos, no intervalo de 80 a 120 kb espera-se ter maior número de SNPs com LD com valores de r^2 acima de 0.75, o que levou adoção no nosso estudo do intervalo de 120 kb à direita e a esquerda para prospecção de genes candidatos. A anotação funcional dos genes candidatos foi realizada utilizando os bancos de dados MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>), tomando o genoma B73 versão 4 como referência. A análise GO dos genes candidatos foi realizada por meio de ferramentas do site Gene Ontology (<http://geneontology.org/>).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A utilização da eletroforese micro fluídica como metodologia para avaliação do conteúdo de zeínas, permitiu a identificação de cinco subunidades de zeínas com base em massa molecular (10, 19, 21, 22 e 27 kDa) (FIGURA 1). O conjunto destas subunidades corresponderam na média a 98.31% (População UFV-MP5) e 97.64% (População Beija-Flor) das bandas mapeadas nos extratos. A partir de teste F a 5% de significância, foi possível observar que as populações são divergentes em relação aos percentuais das subunidades de 19, 21, 22 e 27 kDa de zeínas, sendo observado maiores percentuais das subunidades 22 e 27 kDa na população Beija-Flor e maior percentual da subunidade 19 kDa na população UFV-MP5. Enquanto que, para a subunidade de 10 kDa não foi observado divergência entre as populações.

Em função da massa molecular, a subunidade de 19 kDa foi classificada como alfa-zeínas (SHEWRY, P. R.; CASEY, R., 1999), esta subunidade apresentou os maiores percentuais em relação as demais subunidades nas populações. Os percentuais médios foram de 67.63% e 46.12% para população UFV-MP5 e Beija-Flor, respectivamente (TABELA 1), com variação de 50.80 a 85.50% ($\Delta = 34.7\%$) na população UFV-MP5 e 32.10 a 64.50% ($\Delta = 32.4\%$) para população Beija-Flor (TABELA 1). Além disso, foi observado que 5.82% dos acessos da população Beija-Flor apresentaram percentuais acima de 60%, enquanto que na população UFV-MP5 este percentual foi de 89.25%, demonstrando o maior percentual da subunidade de 19 kDa na população de origem temperada.

A subunidade de 22 kDa foi a segunda classe com maior percentual nas populações e corresponde a alfa-zeína de 22 kDa, conforme descrito em literatura (SHEWRY, P. R.; CASEY, R., 1999). As estimativas para a subunidade de 22 kDa variaram de 12.05% a 34.0% ($\Delta = 21.95\%$), com percentual médio de 23.54% para população UFV-MP5. Enquanto que para a população Beija-flor, foi observado variação de 17.20 a 43.60% ($\Delta = 26.40\%$) com percentual médio de 32.90% (TABELA 1). A subunidade de 21 kDa foi observada em maior frequência nos acessos da população Beija-Flor, com variação nos percentuais de 0 a 13.90%. Somente 11 acessos apresentaram estimativas para esta subunidade na população temperada, sendo o maior percentual 10.90%. Os menores percentuais foram associados as subunidades de 27 e 10 kDa, que correspondem a γ - e δ -zeínas, respectivamente (SHEWRY, P. R.; CASEY, R., 1999). A população Beija-Flor apresentou maior percentual de γ -zeínas em relação a população UFV-MP5.

As populações também divergiram em relação a concentração de zeínas totais no endosperma e capacidade de expansão do grão, com base em teste F, a 5% de significância. A população UFV-MP5 apresentou maior estimativa média para CE em relação a população Beija-Flor. A concentração média de zeínas totais foi de 79.91 e 46.80 ng/mg, respectivamente para população UFV-MP5 e Beija-Flor (TABELA 1). A amplitude das estimativas de zeínas totais foi de 19.09 a 374.10 ng/mg ($\Delta = 355.01$ ng/mg) para população UFV-MP5, e de 12.48 a 130.61 ng/mg de endosperma ($\Delta = 118.13$ ng/mg) à população Beija-Flor. Sete acessos na população Beija-Flor (6.80% dos acessos) apresentaram concentrações acima de 100 ng/mg, com destaque ao acesso 5 com concentração de 130.61 ng/mg.

O percentual médio de amilose estimado na população UFV-MP5 foi de 28.48%, com amplitude de 20.33 a 43.71% ($\Delta = 23.38\%$). Por consequência, as estimativas dos teores de amilopectina variaram de 56.29 a 79.67%, com teor médio de 71,52% (TABELA 1). Os acessos 173, 13, 170, 180, 18, 177, 176 apresentaram maiores percentuais de amilose com 43.72%, 40.04%, 38.75%, 38.52%, 38.22%, 36.81% e 36.68%, respectivamente. O percentual de amido para os acessos avaliados variou de 17.08 a 83.73% ($\Delta = 66.65\%$), com teor médio de 43.73% (TABELA 1). Os acessos 6, 8 e 151 foram os que apresentaram maiores percentuais 83.74, 80.22 e 74.22%, respectivamente. Percentuais abaixo de 20% foram observados somente nos acessos 183 e 177 com 17.08 e 18.08%, respectivamente.

Tabela 1. Medidas de dispersão estimadas nas populações UFV-MP5 e Beija-Flor para conteúdo de Amilose (%), Amilopectina (%), Amido Total (%), Zeínas Totais (ng/mg de endosperma), Subunidades de Zeínas e CE (cm³/g).

Característica	População			
	UFV-MP5		Beija-Flor	
	Média	Variância	Média	Variância
Amilose	28.48	13.86	-	-
Amilopectina	71.52	13.86	-	-
Amido	43.73	106.89	-	-
Zeína 10 kDa	0.75 ^{ns}	0.36	0.90	0.54
Zeína 19 kDa	67.63*	32.34	46.12	39.08
Zeína 21 kDa	0.56*	5.04	9.17	10.22
Zeína 22 kDa	23.54*	17.32	32.90	19.26
Zeína 27 kDa	5.82*	4.84	8.53	6.32
Zeínas Totais	79.91*	2.64 x 10 ⁵	46.80	6.52 x 10 ⁴
CE	42.43 ^{1*}	52.05	31.49 ²	57.71

ns – não significativo a 5% pelo teste F; * - significativo a 5% pelo teste F em comparação com a população Beija-Flor; ¹ – Média com base em 716 indivíduos (dados não publicados); ² – Média com base em 100 indivíduos (dados não publicados).

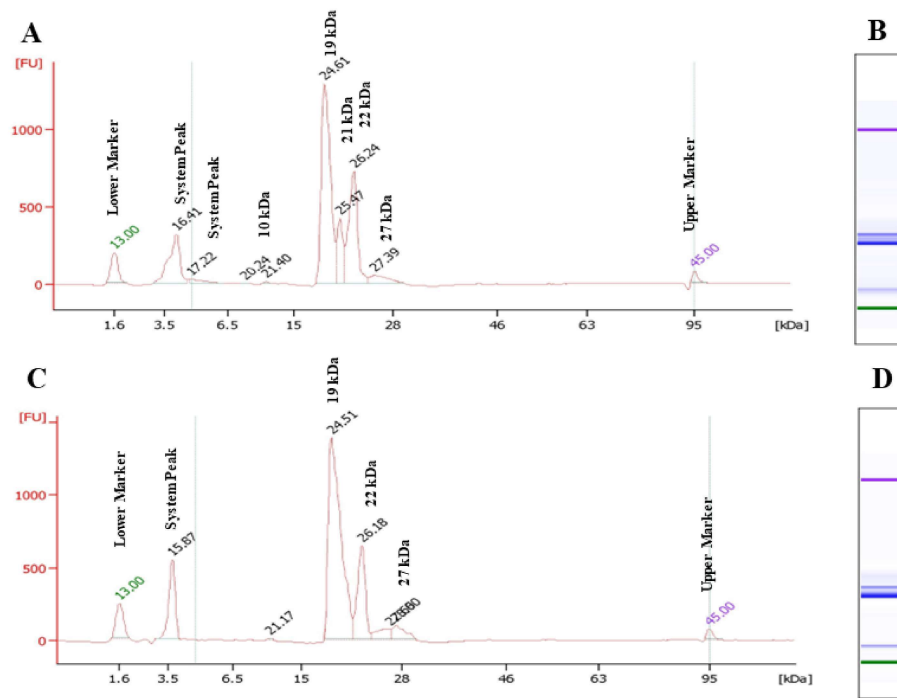


Figura 1. Análise comparativa das subunidades de zeínas em populações divergentes quanto a origem (tropical e temperada) via eletroforese capilar. A. Eletroferograma frequentemente observado nos extratos de zeínas na população tropical – Beija-Flor, com as subunidades de zeínas identificadas via sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*. B. Gel-imagem derivado do sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* do extrato de zeínas de acesso da população Beija-Flor. C. Eletroferograma frequentemente observado nos extratos de zeínas na população temperada – UFV-MP5, com as subunidades de zeínas identificadas via sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer*. D. Gel-imagem derivado do sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* do extrato de zeínas de acesso da população UFV-MP5.

4.2. ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA

A análise de estrutura populacional para a população UFV-MP5, indicou a presença de duas subestruturas ($K\text{-shold} = 2$), adotando como critério as estimativas de ΔK ($\Delta K = 465.3592$). 138 dos acessos avaliados foram agrupados em uma subpopulação (75.41% dos acessos) e o restante dos acessos em outra subpopulação (24.59%) (FIGURA 2). Para a população Beija-Flor, não foi possível identificar subestruturas. Neste sentido, não há evidências da população Beija-Flor ser composta por mistura de populações.



Figura 2. Gráfico representativo da estrutura populacional observada na UFV-MP5, obtido pelo software STRUCTURE. O gráfico evidencia a existência de duas subestruturas nesta população representada pela porção vermelha e verde. O eixo X representa os acessos pertencentes a essa população e o eixo Y expressa em decimal a probabilidade de o acesso pertencer a subestrutura em questão, sendo que quanto mais próximo de 1 maior é a chance de o acesso pertencer a subestrutura em questão. O acesso que contém as duas cores, tem maior percentual da coloração verde, pertencendo a subestrutura verde.

Aos caracteres avaliados na população UFV-MP5, foram identificadas associações significativas às subunidades de alfa-zeínas de 19 kDa e 22 kDa, conteúdo de amido e amilopectina. Em relação as subunidades de zeínas, foram identificadas 102 associações significativas para subunidade de 19 kDa ($q\text{-valor} \leq 0.05$) e 80 associações para 22 kDa ($q\text{-valor} \leq 0.05$). Para a subunidade 19 kDa, duas marcas foram detectadas no cromossomo 1 e as demais marcas no cromossomo 4 (FIGURA 4.A). Para a subunidade de 22 kDa, uma marca foi detectada no cromossomo 1 e as demais no cromossomo 4 (FIGURA 4.B). 68 dos SNPs identificados como significativos para a subunidade de 19 kDa foram também identificados para a subunidade de 22 kDa. Com base nas associações significativas, foram identificados sete genes candidatos relacionados a estas duas subunidades. Genes candidatos relacionados especificamente com as subunidades de 19 kDa ou 22 kDa não foram identificados (TABELA 2).

Em relação ao teor de amido, foram identificadas oito associações significativas ($q\text{-valor} \leq 0.05$). Os cromossomos 1 e 3 apresentaram duas marcas, enquanto que os cromossomos 2, 6, 8 e 9 uma marca (FIGURA 3.A). Para percentual de amilose, foram identificadas 19 associações significativas ($q\text{-valor} \leq 0.05$) distribuídas nos 10 cromossomos, sendo que os cromossomos 2 e 4 apresentaram três associações; os cromossomos 5,6,8,9 e 10 duas associações; e os cromossomos 1,3 e 7 uma associação (FIGURA 3.B). Destas associações, foram identificados dois genes como potenciais candidatos para teor amido, e dois genes para teor de amilose/amilopectina (TABELA 2). Os genes candidatos identificados na população UFV-MP5 foram associados a quatro processos biológicos, quatro funções moleculares e um componente celular. Além disso, as proteínas associadas a estes genes foram agrupadas em 5 categorias, com maior proporção de chaperonas e enzimas modificadoras de proteínas (ANEXO F).

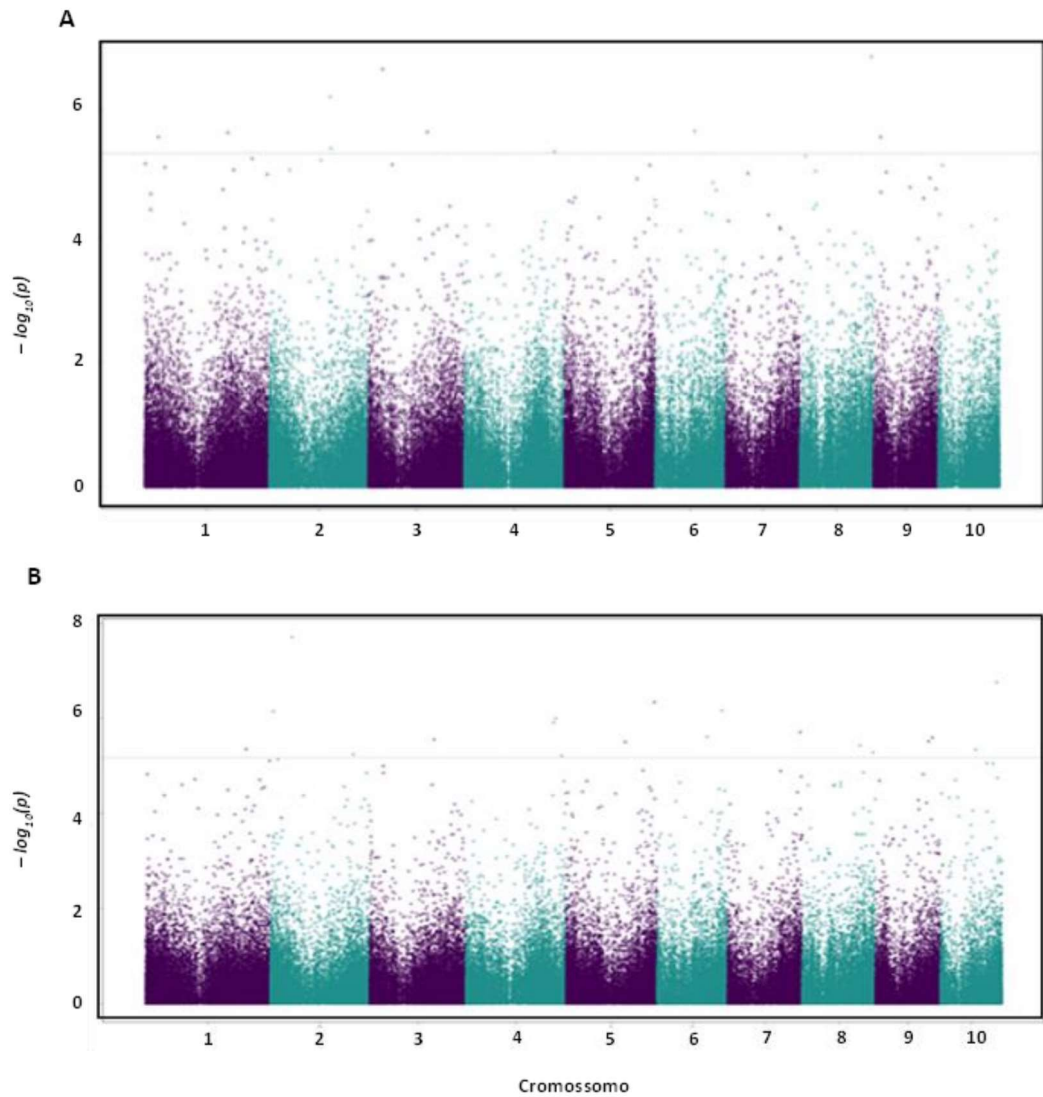


Figura 3. *Manhattan Plots* resultantes das análises de GWAS para percentual de amido e amilose obtidos por meio do pacote *GWASpoly*, Software *RStudio* para população UFV-MP5. A. *Manhattan Plot* para percentual de amido total. B. *Manhattan Plot* para percentual de Amilose. O eixo X representa os cromossomos e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$.

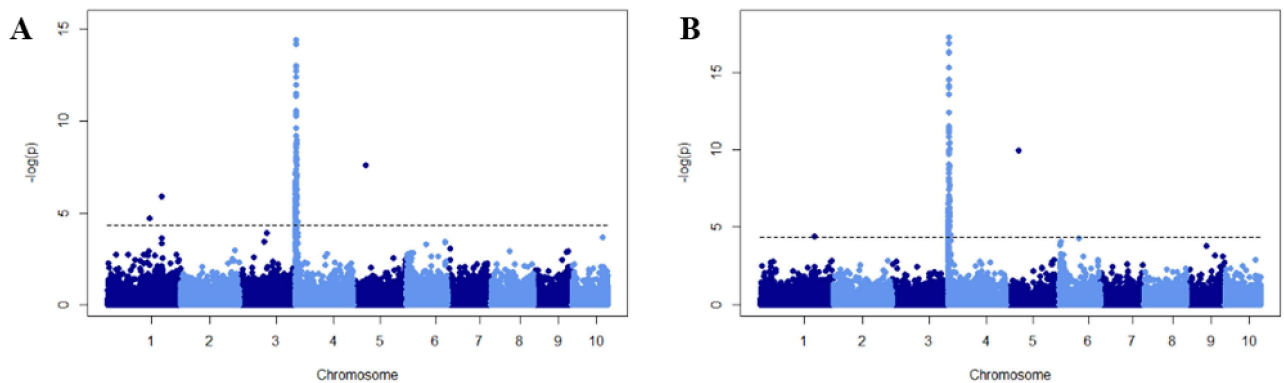


Figura 4. *Manhattan Plots* das análises de GWAS para percentuais das subunidades de zeínas - População UFV-MP5. A. *Manhattan Plot* para percentual da subunidade de 19 kDa de Zeínas. B. *Manhattan Plot* para percentual da subunidade de 22 kDa de Zeínas. O eixo X representa os cromossomos e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$.

Os estudos de GWAs para população Beija Flor, permitiram a identificação de seis associações significativas ($q\text{-valor} \leq 0.05$) correspondente a subunidade de 21 kDa. Cinco marcas foram localizadas no cromossomo 5 e uma marca localizada no cromossomo 7. (FIGURA 5). A partir da posição física dos SNPs significativos, foi possível identificar um gene candidato associado a biossíntese de zeínas entre os *loci* identificados como significativos. (TABELA 2).

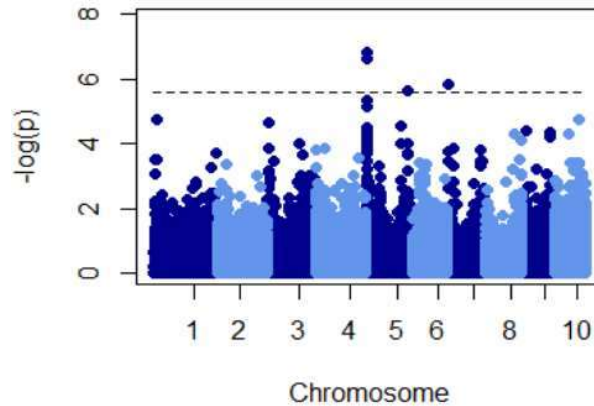


Figura 5. *Manhattan Plot* da análise de GWAs para percentual da subunidade de 21 kDa de Zeínas para População -Beija-Flor.

Tabela 2. Genes candidatos associados ao percentual de amido, amilose e subunidades de zeínas para as populações UFV-MP5 e Beija-Flor. Tabela contendo genes candidatos agrupados por característica, cromossomo, posição do SNP, identificação do gene e anotação funcional/gênica.

População	Característica	Cr*	Posição SNP (bp)	Gene Candidato	Anotação Gênica
UFV - MP5	Amido Total	1	33454328	Zm00001d028397	ACY-CoA-3 (ACBD3) / ZmACBP5
		2	204459673	Zm00001d004962	Malato Desidrogenase
	Amilose	6	158964536	Zm00001d038512	Glicosiltransferase-o-citocina
		10	138643984	Zm00001d026113	NKD2 (EndospermaNu2)
	Zeínas 19 e 22 kDa	4	828609	Zm00001d048591	Proteína Chaperona DNAJ 6
		4	1457058	Zm00001d048617	Ubiquitina Transferase E3 do tipo RING
		4	3199492	Zm00001d048687	Heat Shock 70 kDa (HSP70)
		4	6012358	Zm00001d048812	Alfa-Zeína Z1_C1_7
		4	6012386	Zm00001d048813	Alfa-Zeína Z1_C1_8
		4	6012386	Zm00001d048817	Alfa-Zeína Z1_C1_19
4	7231847	Zm00001d048894	Fator de Transcrição MAD-BOX (MADS25)		
Beija-Flor	Zeína 21 kDa	7	4201475	Zm00001d018751	Permeasse de aminoácido 6 (Aap6)

Cr* = Cromossomo

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização Fenotípica

A produção comercial de milho pipoca teve início em 1880 nos Estados Unidos, com o primeiro híbrido comercial lançado em 1934 pela *Minnesota Agricultural Experiment Station*, o Minhybrid. Desde então, os programas de melhoramento de milho pipoca vêm buscando o desenvolvimento de híbridos produtivos e com alta capacidade de expansão ($CE \geq 40 \text{ cm}^3/\text{g}$) (ZIEGLER; ASHMAN, 1994). No Brasil, a principal metodologia adotada pelos programas de melhoramento foi a introdução e adaptação de cultivares de origem temperada, com enfoque na seleção para alta CE. Além disso, sabe-se que populações temperadas tendem a apresentar maior CE na comparação com populações tropicais, todavia pouco se conhece a respeito do efeito dos programas de melhoramento em termos do conteúdo de zeínas e subunidades em populações de diferentes origens. Em relação a caracterização fenotípica, foi possível notar que as populações são divergentes com relação a CE, conforme era de se esperar, mas também em relação a concentração de zeínas totais e as subunidades de 19, 21, 22 e 27 kDa. A população UFV-MP5, apresentou maior percentual médio de alfa-zeínas de 19 kDa, de CE e concentração de zeínas totais, enquanto que a população Beija-Flor, maior percentual médio de alfa-zeínas de 22 kDa e γ -zeína de 27 kDa. Essa divergência entre as populações demonstra que mesmo os programas de melhoramento tendo selecionado para CE, selecionou de forma inconsciente para alfa-zeínas.

A capacidade de expansão do endosperma está relacionada com a textura do endosperma, que está associada a proteínas como, glutelinas e tipos de zeínas. Dentre as subunidades de zeínas, as alfa-zeínas estão associadas a dureza do endosperma e possui alta correlação com capacidade de expansão do grão ($R^2 = 0.963$) (BORRAS et al., 2006). Neste sentido, a caracterização para alfa-zeínas pode ser útil aos programas de melhoramento, visando auxiliar na identificação e seleção de genótipos superiores para CE. A subunidade de 21 kDa foi observada em maior frequência na população tropical. Na população Beija-Flor, apenas nove acessos não apresentaram a subunidade de 21 kDa, seis destes apresentaram os maiores percentuais para subunidade de 19 kDa, o mesmo foi observado na população UFV-MP5. Este comportamento sugere que a subunidade de 21 kDa seja uma isoforma de alfa-zeínas em milho pipoca, que foi selecionada de forma indireta durante a introdução de novos cultivares.

Pensando na avaliação de caracteres relacionados a qualidade do grão, adicionalmente a avaliação de CE, o melhorista poderia realizar a seleção com base no conteúdo de alfa-zeínas

(19 e 22 kDa). Visto que, a utilização da eletroforese micro fluidica demonstrou-se como ferramenta promissora na avaliação em larga escala (centenas de indivíduos) para conteúdo de zeínas totais e subunidades, principalmente na caracterização de alfa-zeínas. Além disso, observamos que o tempo médio gasto na caracterização de 10 acessos via eletroforese micro fluidica foi de quatro horas, enquanto que a mesma caracterização realizada via SDS-PAGE levou cerca de 72 horas, ou seja, trata-se de um ganho de 18 vezes na capacidade de avaliação.

A proporção amilose/amilopectina afeta a qualidade e a produção do endosperma (LI et al., 2018a), além de propriedades úteis a indústria alimentícia como, gelatinização e solubilização, aspectos importantes ao desenvolvimento de produtos à base de amido (LEMONS et al., 2019), portanto a caracterização para estes compostos poderão ser úteis aos programas de melhoramento associados à indústria alimentícia. Além disso, a caracterização em larga escala para conteúdo de amilose e amilopectina é inexistente em milho pipoca, sendo essenciais estudos como esse para caracterização da diversidade genética. Em relação ao perfil de distribuição de amilose e amilopectina, na população UFV-MP5 foi possível observar variação de 20.33 a 43.71% no conteúdo de amilose. Em milho pipoca, a variação observada para conteúdo de amilose varia de 27 a 44.9% (PARK et al., 2000; BORRAS et al., 2006) portanto, a variação observada em nosso estudo está de acordo com o que vêm sendo observado em literatura. O amido é o principal polímero associado a expansão do grão (SWELEY; ROSE; JACKSON, 2013). Alterações no formato da pipoca podem estar associadas a capacidade de expansão dos grânulos de amido do endosperma vítreo (WU; SCHWARTZBERG, 1992). O percentual médio de amido observado na população UFV-MP5 foi de 43.73%, com variação de 17.08% a 83.73%. O percentual observado foi inferior ao observado em outros estudos (COOK et al., 2012; SAITO et al., 2021).

5.2. Estudo de Associação Genômica

As alfa-zeínas (19 e 22 kDa) são codificadas por quatro subfamílias de genes (Z1A, Z1B, Z1C e Z1D) (HOLDING, 2014) distribuídos em sete cromossomos (LI ET AL., 2020). As subfamílias Z1A, Z1B e Z1D estão relacionadas a síntese de alfa-zeína 19 kDa, enquanto que Z1C codifica à zeína de 22 kDa (HOLDING, 2014). A alfa-zeína de 19 kDa possui relação com 25 genes distribuídos em 5 regiões genômicas, alocados nos cromossomos 1,4 e 7, com cobertura genômica aproximada de 1 MB (SONG; MESSING, 2002). Cópias de genes das subfamílias Z1A e Z1C estão presentes em duas localizações no cromossomo 4 (MICLAUS; XU; MESSING, 2011). Os genes candidatos Zm00001d048812 (Z1_C1_7), Zm00001d048813

(Z1_C1_8) e Zm00001d048817 (Z1_C1_19) são descritos em literatura como pertencentes a subfamília Z1C, estando relacionados diretamente com a síntese de alfa-zeínas. O gene Z1_C1_8 também está envolvido na biossíntese de alfa-zeína de 22 kDa (SONG et al., 2001). Esses genes candidatos foram associados as duas subunidades de alfa-zeínas (19 e 22 kDa).

A sub família Z1C é constituída por 16 genes, destes seis genes são expressos durante o desenvolvimento do endosperma (azs22.4, azs22.7, azs22.8, azs22.9, azs22.19 e fl2-azs22.16) (FENG et al., 2009; SONG; MESSING, 2003). A partir de análise de expressão gênica em embrião imaturo para o *loci* Z1C1, foi demonstrado que os genes AZS22.4 e AZS22.19 (Z1_C1_19) apresentaram os maiores níveis de transcrição, considerando a linhagem B73 (MICLAUS; XU; MESSING, 2011). Mesmo sendo demonstrado que o *loci* Z1A apresenta maior nível de transcrição entre os *loci*, e desempenha papel principal na síntese de alfa-zeínas, a síntese destas é dependente da atuação conjunta de outros *loci*, tornando o candidato Z1_C1_19 um gene chave no processo de síntese de alfa-zeínas.

O gene azs22.8 representa cerca de 13.07% dos genes pertencentes a subfamília Z1C (FENG et al., 2009). Este gene apresenta maior nível de expressão aos 18 dias após a polinização, concomitante com o pico de expressão do gene fl2 (FENG et al., 2009) sugerindo a atuação conjunta destes genes na síntese de alfa-zeína. Além disso, SEGAL; SONG; MESSING (2003) demonstraram que o silenciamento deste gene via RNA de interferência levou a redução na expressão de alfa-zeína de 22 kDa, portanto pode-se inferir que este gene tem relação direta com a síntese de alfa-zeínas. O gene azs22.7 corresponde a 12.56% dos genes pertencentes a subfamília Z1C e possui maior nível de expressão aos 22 dias após polinização. Além disso parece atuar em conjunto com o gene azs22.19 durante a biossíntese de alfa-zeína (FENG et al., 2009).

Para as subunidades 19 e 22 kDa, o gene candidato Zm00001d048687 codifica a proteína *Heat Shock* 70 kDa (HSP70). Dois transcritos são descritos na literatura, contendo 515 e 483 aminoácidos. A proteína HSP70 pertence à família de proteínas HSP70, descritas como chaperonas (BOSTON et al., [s.d.]) e atua no processamento de proteínas no retículo endoplasmático. A superexpressão de HSP70 foi observada em mutantes com baixo teor de zeínas (mutantes *fl2*, *De-B30* e *Mc*), sugerindo a atuação desta proteína no transporte e/ou acúmulo de zeínas nos corpos proteicos. O comportamento envolvendo elevação da síntese de chaperonas e redução da biossíntese de zeínas vêm sendo observado em outros mutantes, como *opaque1* e *opaque10* (SHEWRY; CASEY, 1999), o que demonstra relação desta família de proteínas com a regulação da Biossíntese de zeínas. Neste sentido, a proteína chaperona DNAJ6

codificada pelo gene candidato Zm00001d048591 pode estar também relacionada com a biossíntese de Zeínas, visto que vêm sendo demonstrado que as chaperonas contribuem no dobramento e deposição de zeínas nos corpos proteicos (MÜNTZ, 1998)

Além dos genes envolvidos na síntese de zeínas, quatro tipos de fatores de transcrição são conhecidos por atuarem diretamente na regulação da transcrição de genes de Zeínas, como fatores de transcrição (O2, PBF1, OHP1/2 e MADS-box) (LI et al., 2018b). O fator de transcrição zmMADS47, pertence à família MADS, controla a ativação de genes que codificam a síntese de alfa-zeínas e 50 kDa, e interagem com *O2* (VICENTE-CARBAJOSA et al., 1997; LI ET AL., 2020). O gene candidato MADS25 codifica fator de transcrição da família MAD-BOX localizado no endosperma, possui atividade de dimerização de proteínas, atuando no desenvolvimento do endosperma.

O gene candidato Zm00001d048617 codifica gene putativo da superfamília *RING zinc finger domain*. Essas proteínas desempenham papéis cruciais nas respostas de planta frente a estresses de seca (KONG ET AL., 2013). VICENTE-CARBAJOSA et al. (1997) demonstrou que uma proteína pertencente a esta superfamília se liga a Prolamina-BOX, região rica em promotores de genes relacionados a proteínas de reserva de sementes em milho, e interage com ativadores transcricionais de *Opaque2*, sugerindo que outros fatores transcricionais em adição ao *Opaque2* podem regular coordenadamente a expressão de genes de zeínas como estes identificados.

Em relação ao conteúdo de amido, foram identificados dois genes candidato gene *ZmACBP5* e Zm00001d004962. O gene candidato *ZmACBP5* codifica a proteína ACY-CoA-3 (ACBD3). Em milho, as proteínas de ligação de Acil-CoA são codificadas por nove genes distribuídos em cinco cromossomos, com três genes localizados no cromossomo 1, incluindo ACBD3 (OKITA, 1992; SUNG et al., 1988; ZHU ET AL., 2021). Apesar de não existirem trabalhos envolvendo associação desta proteína com conteúdo de amido em milho, ZHU ET AL (2021) observaram alta expressão desta proteína durante o desenvolvimento do endosperma (18 a 22 dias após polinização) e associação com caracteres relacionados ao grão como peso do grão, comprimento e largura do grão, número de sementes por fileira e teor de óleo, sugerindo atuação desta proteína em múltiplas funções durante o desenvolvimento da semente.

O gene candidato Zm00001d004962 codifica a enzima Malato Desidrogenase, esta enzima desempenha papel na via de gliconeogênese. A via de gliconeogênese é responsável pela geração de glicose a partir de substratos de carbono não-açúcares como, piruvato, (s)-lactato e glicerol. Por sua vez a glicose atua na síntese de sacarose, que desempenha papel de

substrato para glicosídeos de armazenamento como amido e frutanos (OKITA, 1992; SUNG et al., 1988). Desta forma, esta enzima está relacionada de forma indireta com a biossíntese de amido.

Os genes candidatos Zm00001d038512 e Zm00001d026113 estão relacionados com o conteúdo de amilose. O gene candidato Zm00001d038512 codifica a proteína glicosiltransferase-*o*-citocina, representada por uma sequência de 491 aminoácidos e pertencente à família UDP-Glicosiltransferase. As glicosiltransferase são responsáveis por catalisar a formação de ligações glicosídicas, gerando dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (LAIRSON et al., 2008). LI et al. (2018a) por meio de estudo de associação genômica para teor de amilose em milho, identificou 39 genes candidatos relacionados ao conteúdo de amilose, destes quatro codificam glicosiltransferase. Esta classe de proteína desempenha papel importante no metabolismo de amilose, ao passo que atuam em conjunto com a amido sintase ligada à grânulos (GBSS), principal enzima responsável pela síntese de amilose (LI et al., 2018a).

O fator de transcrição NKD2 (EndospermaNu2) codificado pelo gene candidato Zm00001d026113 desempenha papel chave no desenvolvimento do endosperma, incluindo deposição de nutrientes de reserva (GONTAREK et al., 2016). Análise de expressão diferencial de genes envolvendo mutante de *NKD1/NKD2*, evidenciou que genes relacionados a nutrientes de reserva como, GBSS e fator de transcrição de ligação a prolaminas-box tiveram redução da expressão nos mutantes de *NKD1/NKD2*, levando a alterações na composição do endosperma com redução de 32.5% no teor de amido (GONTAREK et al., 2016). Além disso, NKD2 parece atuar em conjunto com uma série de outros fatores de transcrição no controle da biossíntese de zeínas (ORTIZ-LOPEZ, [s.d.]; LI ET AL., 2020).

Para a subunidade de 21 kDa foi identificado um gene candidato. O gene candidato Zm00001d018751 codifica para a proteína permeasse de aminoácido 6 (Aap6), que pertence à família de transportadores de aminoácidos (ATF) (ORTIZ-LOPEZ, [s.d.]). PENG et al., (2014) demonstraram que Aap6 atua como importante regulador na síntese e acúmulo de proteínas de reserva em grãos de arroz bem como, na biossíntese de amido. De acordo com YAO et al. (2020), ATF's apresentam similaridades bioquímicas em diferentes espécies (ex. arroz, arábida, soja) sugerindo que a função destas proteínas é conservada entre as plantas vasculares. Desta forma, por homologia, supõe-se que Aap6 esteja relacionada com a biossíntese e acúmulo de zeínas.

6. CONCLUSÕES

As populações avaliadas divergiram em relação a capacidade de expansão, concentração de zeínas totais e subunidades de zeínas, com exceção da subunidade de 10 kDa. Na população de origem temperada, foi observado a predominância da alfa-zeína de 19 kDa, em contrapartida, na população tropical foi observado predomínio de alfa-zeína de 22 kDa. Este evento demonstra que a seleção para CE pelos programas de melhoramento, resultou de forma inconsciente na seleção diferencial para alfa-zeínas em função da origem (temperada e tropical).

A incorporação da eletroforese micro fluídica demonstrou-se ser promissora na caracterização de acessos para conteúdo de zeínas e subunidades. A partir das análises de GWAs para conteúdo de prolaminas, foi possível identificar sete genes candidatos relacionados com a biossíntese/acúmulo de alfa-zeínas (19 e 22 kDa), e um gene relacionado com a subunidade de 21 kDa. Para as subunidades de 10 e 27 kDa não foram encontradas associações significativas, o que demonstra que estas populações não apresentaram divergências nos teores significativas ao ponto de detectar associações. A subunidade de 21 kDa foi observada majoritariamente na população Beija-Flor, o que parece ser uma isoforma de alfa-zeína associada a origem da população.

A caracterização em larga escala para conteúdo de amilose e amilopectina ainda não é uma realidade nos programas de melhoramento. Acredita-se que a diversidade para amilose e amilopectina em milho pipoca, seja superior ao relatado em literatura, sendo necessário mais estudos nessa área. Os genes identificados para conteúdo de amilose e amido localizam-se em regiões genômicas relacionadas com a biossíntese de amido e amilose, demonstrando a acurácia desta ferramenta na identificação de genes candidatos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. C. B. et al. Linkage disequilibrium and haplotype block patterns in popcorn populations. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0219417, 25 set. 2019.
- BATES, F. L.; FRENCH, D.; RUNDLE, R. E. Amylose and Amylopectin Content of Starches Determined by their Iodine Complex Formation ¹. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, n. 2, p. 142–148, fev. 1943.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, jan. 1995.
- BORRAS, F. et al. Relationship Between Popcorn Composition and Expansion Volume and Discrimination of Corn Types by Using Zein Properties. **Cereal Chemistry Journal**, v. 83, n. 1, p. 86–92, jan. 2006.
- BOSTON, R. S. et al. Increased Expression of the Maize Immunoglobulin Binding Protein Homolog b-70 in Three Zein Regulatory Mutants. p. 9, [s.d.].
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. p. 7, [s.d.].
- BROWNING, B. L.; BROWNING, S. R. A Unified Approach to Genotype Imputation and Haplotype-Phase Inference for Large Data Sets of Trios and Unrelated Individuals. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 2, p. 210–223, fev. 2009.
- COOK, J. P. et al. Genetic architecture of maize kernel composition in the nested association mapping and inbred association panels. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 824–834, 2012.
- DABNEY, A.; STOREY, J.D. Package ‘qvalue’. **Medicine**, v. 344, p. 539-548, 2011.
- DOYLE; J., J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.**, v. 12, p. 13–15, 1990.
- ENDELMAN, J. B. Ridge Regression and Other Kernels for Genomic Selection with R Package rrBLUP. **The Plant Genome**, v. 4, n. 3, p. 250–255, nov. 2011.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, jul. 2005.
- FENG, L. et al. Expressional profiling study revealed unique expressional patterns and dramatic expressional divergence of maize α -zein super gene family. **Plant Molecular Biology**, v. 69, n. 6, p. 649–659, abr. 2009.
- FISHER, R. A. Design of Experiments. **British Medical Journal**, v. 1, n. 3923, p. 554–554, 14 mar. 1936.

FLINT-GARCIA, S. A.; BODNAR, A. L.; SCOTT, M. P. Wide variability in kernel composition, seed characteristics, and zein profiles among diverse maize inbreds, landraces, and teosinte. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 6, p. 1129–1142, out. 2009.

GIBSON, T. S.; SOLAH, V. A.; MCCLEARY, B. V. A Procedure to Measure Amylose in Cereal Starches and Flours with Concanavalin A. **Journal of Cereal Science**, v. 25, n. 2, p. 111–119, mar. 1997.

GOETZ, H. et al. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, n. 3, p. 281–293, set. 2004.

GONTAREK, B. C. et al. NKD Transcription Factors Are Central Regulators of Maize Endosperm Development. **The Plant Cell**, v. 28, n. 12, p. 2916–2936, dez. 2016.

GRANT, L. A.; OSTENSON, A. M.; RAYAS-DUARTE, P. Determination of amylose and amylopectin of wheat starch using high performance size-exclusion chromatography (HPSEC). **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 6, p. 771–773, 2002.

HAMAKER, B. R. et al. **Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamins contents than the conventional method.** **Cereal chemistry**, v.72, 1995

HOLDING, D. R. Recent advances in the study of prolamins storage protein organization and function. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 20 jun. 2014.

JIAO, Y. et al. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. **Nature**, v. 546, n. 7659, p. 524–527, jun. 2017.

KNAUS, B. J.; GRÜNWARD, N. J. vCFR : a package to manipulate and visualize variant call format data in R. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 1, p. 44–53, jan. 2017.

KNUEPPEL, S., & MAINTAINER, K. R. (2013). *Package “HapEstXXR” Title Multi-locus stepwise regression (MSR)*.

KOBAYASHI, S.; SCHWARTZ, S. J.; LINEBACK, D. R. Rapid analysis of starch, amylose and amylopectin by high-performance size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 319, p. 205–214, jan. 1985.

KRIZ, A. L. (ED.). **Molecular genetic approaches to maize improvement**. Berlin Heidelberg: Springer, 2009.

KONG, X., LV, W., JIANG, S., ZHANG, D., CAI, G., PAN, J., & LI, D. (2013). *Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/433>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LAIRSON, L. L. et al. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, n. 1, p. 521–555, 1 jun. 2008.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved Method for Isolating and Quantitating α -Amino Nitrogen as Nonprotein, True Protein, Salt-Soluble Proteins, Zeins, and True Glutelins in Maize Endosperm. **Cereal Chemistry Journal**, v. 77, n. 5, p. 620–626, set. 2000.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Protein Distribution Pattern in Flourey and Vitreous Endosperm of Maize Grain. **Cereal Chemistry Journal**, v. 81, n. 2, p. 153–158, mar. 2004.

LARKINS, B. A.; VASIL, I. K. (EDS.). **Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. v. 4

LEMOS, P. V. F. et al. Characterization of amylose and amylopectin fractions separated from potato, banana, corn, and cassava starches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 32–42, jul. 2019.

LI, C. et al. The genetic architecture of amylose biosynthesis in maize kernel. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 2, p. 688–695, fev. 2018a.

LI, C. et al. The ZmbZIP22 Transcription Factor Regulates 27-kD γ -Zein Gene Transcription during Maize Endosperm Development. **The Plant Cell**, v. 30, n. 10, p. 2402–2424, out. 2018b.

LI, C.; SONG, R. The regulation of zein biosynthesis in maize endosperm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, n. 5, p. 1443–1453, maio 2020.

MAROCCO, A.; SANTUCCI, A.; THOMPSON, R. Three High-Lysine Mutations Control the Level of ATP-Binding HSP70-like Proteins in the Maize Endosperm. p. 9, [s.d.].

MICLAUS, M.; XU, J.-H.; MESSING, J. Differential Gene Expression and Epiregulation of Alpha Zein Gene Copies in Maize Haplotypes. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002131, 23 jun. 2011.

MORRISON, W. R.; LAIGNELET, B. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. **Journal of Cereal Science**, v. 1, n. 1, p. 9–20, jan. 1983.

MÜNTZ, K. (1998). Deposition of storage proteins. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 38).

NELSON, O., & PAN, D. (1995). Starch synthesis in maize endosperms. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (Vol. 46). www.annualreviews.org

NUSS, E. T., & TANUMIHARDJO, S. A. (2010). Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 9, Issue 4, pp. 417–436). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x>

OKITA, T. W. Is There an Alternative Pathway for Starch Synthesis? **Plant Physiology**, v. 100, n. 2, p. 560–564, 1 out. 1992.

ORTIZ-LOPEZ, A. Amino acid transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 6, [s.d.].

PANG, J. et al. Kernel size-related genes revealed by an integrated eQTL analysis during early maize kernel development. **The Plant Journal**, v. 98, n. 1, p. 19–32, abr. 2019.

PARK, D. et al. Chemical Composition and Physical Characteristics of Unpopped Popcorn Hybrids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 6, p. 921–934, dez. 2000.

PARRIS, N.; DICKEY, L.; CRAIG, J. Quantitative Analysis of Corn Zeins by Capillary Electrophoresis. **Cereal Chemistry Journal**, v. 74, n. 6, p. 766–770, nov. 1997.

PARSONS, L. et al. Production and Selection of Quality Protein Popcorn Hybrids Using a Novel Ranking System and Combining Ability Estimates. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 698, 23 jun. 2020.

PENG, B. et al. OsAAP6 functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4847, dez. 2014.

POSTU, P. A. et al. Mass spectrometric characterization of the zein protein composition in maize flour extracts upon protein separation by SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 40, n. 20, p. 2747–2758, out. 2019.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 1 jun. 2000.

ROSYARA, U. R. et al. Software for Genome-Wide Association Studies in Autopolyploids and Its Application to Potato. **The Plant Genome**, v. 9, n. 2, p. plantgenome2015.08.0073, 2016.

SAITO, M. A. et al. Influence of agronomic and kernel-related properties on popping expansion in popcorn. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 3, p. 2260–2272, maio 2021.

SAMPAIO, P. S. et al. Optimization of rice amylose determination by NIR-spectroscopy using PLS chemometrics algorithms. **Food Chemistry**, v. 242, p. 196–204, mar. 2018.

SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J. A New Opaque Variant of Maize by a Single Dominant RNA-Interference-Inducing Transgene. **Genetics**, v. 165, n. 1, p. 387–397, 1 set. 2003.

SÉNE, M., THÉVENOT, C., & PRIOUL, J. L. (1997). Simultaneous Spectrophotometric Determination of Amylose and Amylopectin in Starch from Maize Kernel by Multi-wavelength Analysis. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 26).

SENHORINHO, H. J. C. et al. Genomic-Wide Association Study of Popping Expansion in Tropical Popcorn and Field Corn Germplasm. **Crop Science**, v. 59, n. 5, p. 2007–2019, set. 2019.

SHAWA, H.; BILJON, A.; LABUSCHAGNE, M. T. Protein quality and quantity of quality protein maize (QPM) and non-QPM hybrids under optimal and low nitrogen conditions. **Cereal Chemistry**, v. 98, n. 3, p. 507–516, maio 2021.

SHEWRY, P. R.; CASEY, R. (EDS.). **Seed Proteins**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171–192, maio 2001.

SIEVERT, D.; HOLM, J. Determination of Amylose by Differential Scanning Calorimetry. **Starch - Stärke**, v. 45, n. 4, p. 136–139, 1993.

SONG, R. et al. Sequence, Regulation, and Evolution of the Maize 22-kD α Zein Gene Family. **Genome Research**, v. 11, n. 11, p. 1817–1825, 1 nov. 2001.

SONG, R.; MESSING, J. Contiguous Genomic DNA Sequence Comprising the 19-kD Zein Gene Family from Maize. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 1626–1635, 1 dez. 2002.

SONG, R.; MESSING, J. Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 9055–9060, 22 jul. 2003.

SUNG, S.-J. S. et al. A reassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 72, n. 3, p. 650–654, mar. 1988.

SWELEY, J. C.; ROSE, D. J.; JACKSON, D. S. Quality Traits and Popping Performance Considerations for Popcorn (*Zea mays* Everta). **Food Reviews International**, v. 29, n. 2, p. 157–177, 13 mar. 2013.

VICENTE-CARBAJOSA, J. et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 14, p. 7685–7690, 8 jul. 1997.

WALLACE, J. C. et al. New Methods for Extraction and Quantitation of Zeins Reveal a High Content of γ -Zein in Modified opaque-2 Maize. p. 6, 1990.

WILSON, L. M. et al. Dissection of Maize Kernel Composition and Starch Production by Candidate Gene Association. **The Plant Cell**, v. 16, n. 10, p. 2719–2733, out. 2004.

WIMMER, V. et al. synbreed: a framework for the analysis of genomic prediction data using R. **Bioinformatics**, v. 28, n. 15, p. 2086–2087, 1 ago. 2012.

WU, P. J.; SCHWARTZBERG, H. G. Popping behavior and zein coating of popcorn. **Cereal chemistry**, v. 69, n. 5, p. 567-573, 1992.

XIAO, Y. et al. Genome-wide Association Studies in Maize: Praise and Stargaze. **Molecular Plant**, v. 10, n. 3, p. 359–374, mar. 2017.

YAO, X. et al. Amino Acid Transporters in Plants: Identification and Function. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 972, 31 jul. 2020.

YU, J. et al. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 203–208, fev. 2006.

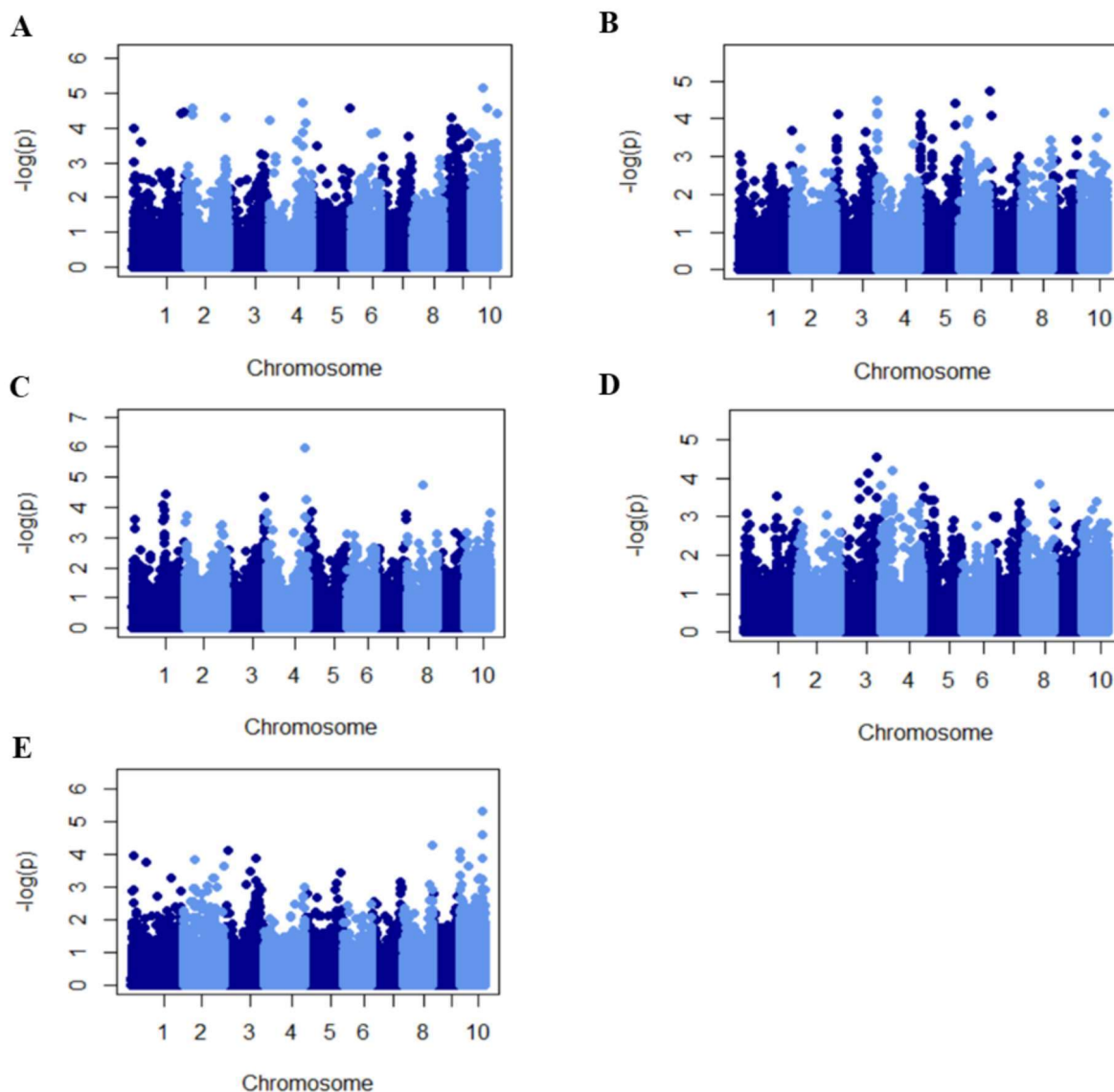
ZIEGLER, K.E., ASHMAN, B. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. (Ed.). Specialty Corns. Iowa: CRC Press, 1994. cap.7, p.189-223

ZHENG, Y. et al. Genome-wide association studies of grain quality traits in maize. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9797, dez. 2021.

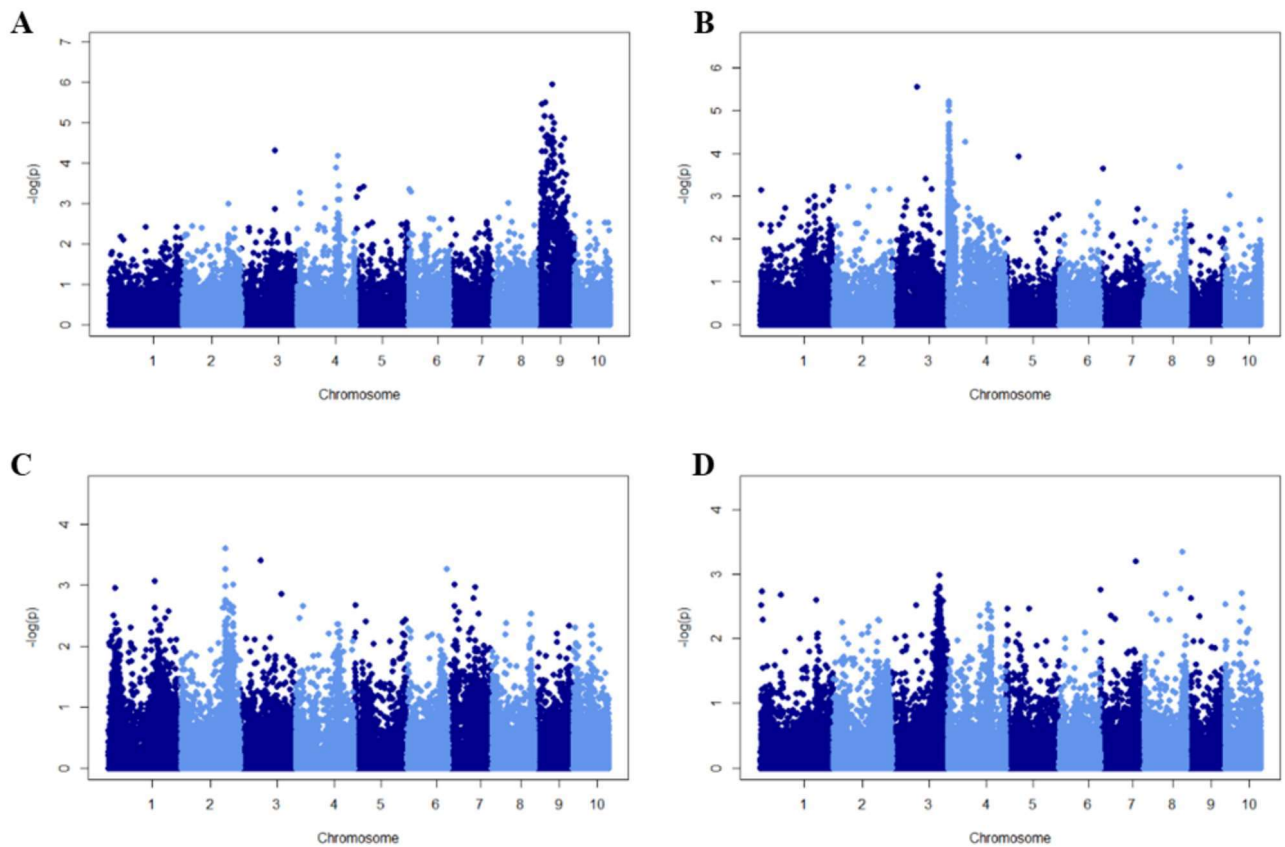
ZHU, T. et al. Comparison of Amylose Determination Methods and the Development of a Dual Wavelength Iodine Binding Technique. **Cereal Chemistry Journal**, v. 85, n. 1, p. 51–58, jan. 2008.

ZHU, J. et al. Molecular characterization, expression and functional analysis of acyl-CoA-binding protein gene family in maize (*Zea mays*). **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 94, dez. 2021.

ANEXOS

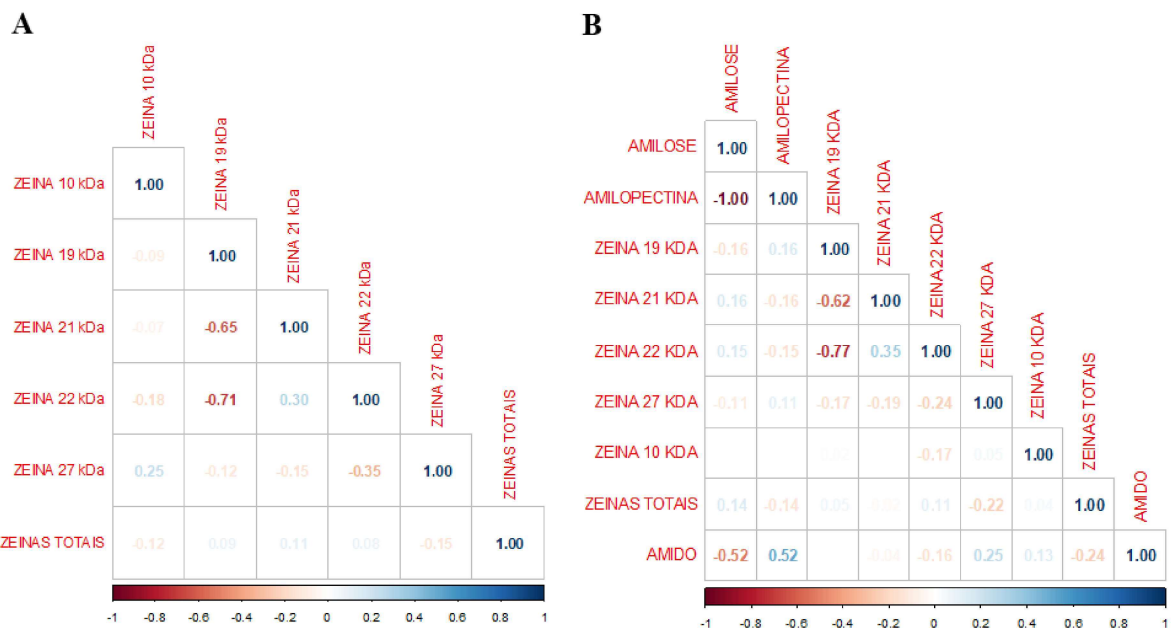


ANEXO A. Manhattan Plots resultantes das análises de GWAs para concentração de zeínas e percentuais das subunidades de zeínas para População Beija-Flor, obtidos por meio do pacote *rrBlup*, Software *RStudio*. A. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 10 kDa. B. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 19 kDa. C. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 22 kDa. D. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 27 kDa. E. Manhattan Plot para concentração de Zeínas totais (ng/mg). O eixo X representa os cromossomos e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$.

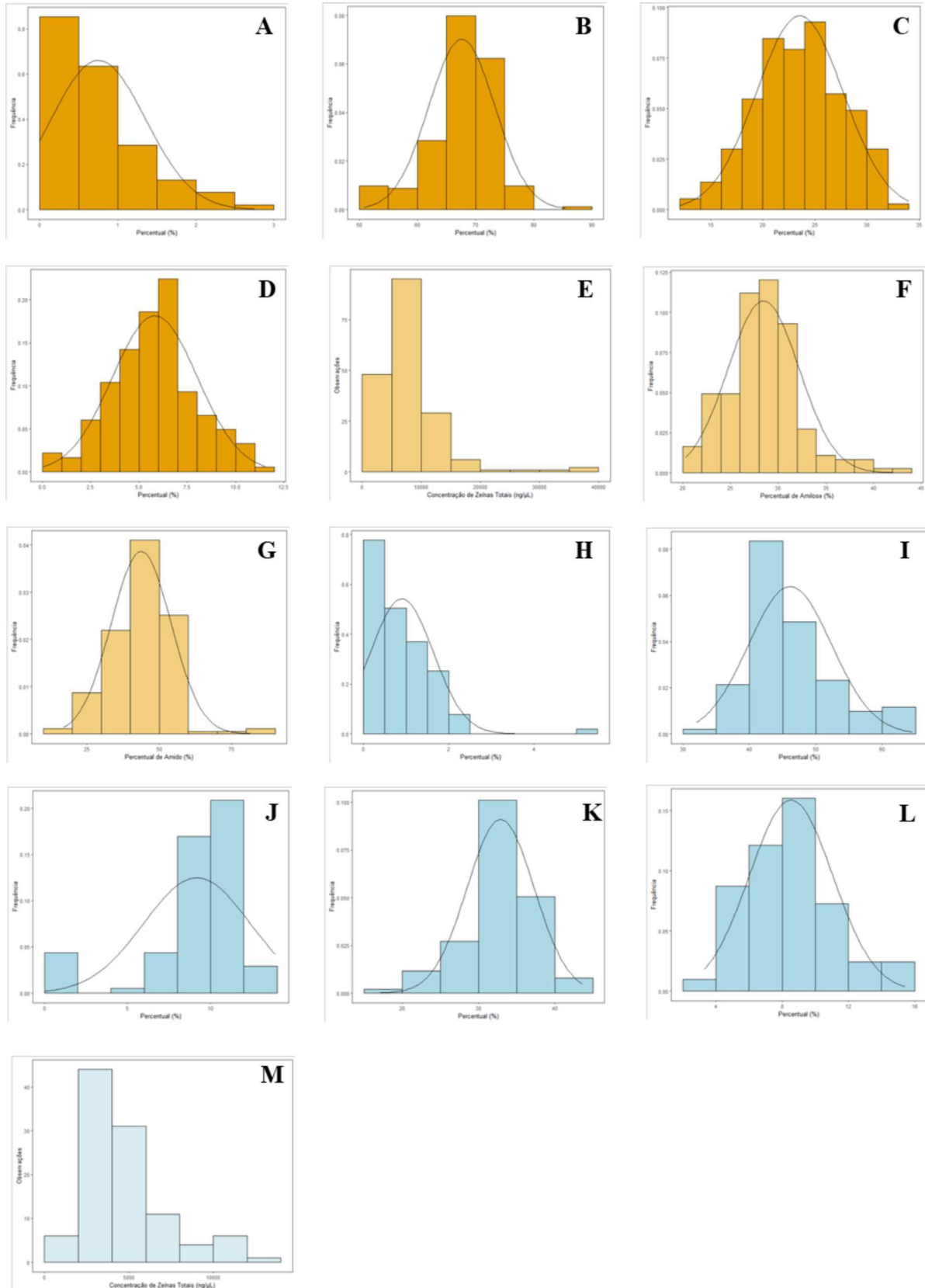


ANEXO B. Manhattan Plots resultantes das análises de GWAs para concentração de zeínas e percentuais das subunidades de zeínas para População UFV-MP5, obtidos por meio do pacote *rrBlup*, Software *RStudio*.

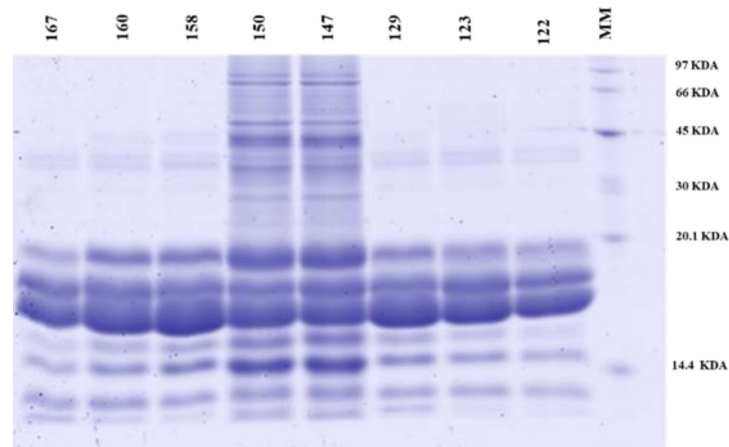
A. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 10 kDa. B. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 21 kDa C. Manhattan Plot para percentual da subunidade de 27 kDa. D. Manhattan Plot para concentração de Zeínas totais (ng/mg). O eixo X representa os cromossomos e o eixo y representa $-\log_{10}(p)$.



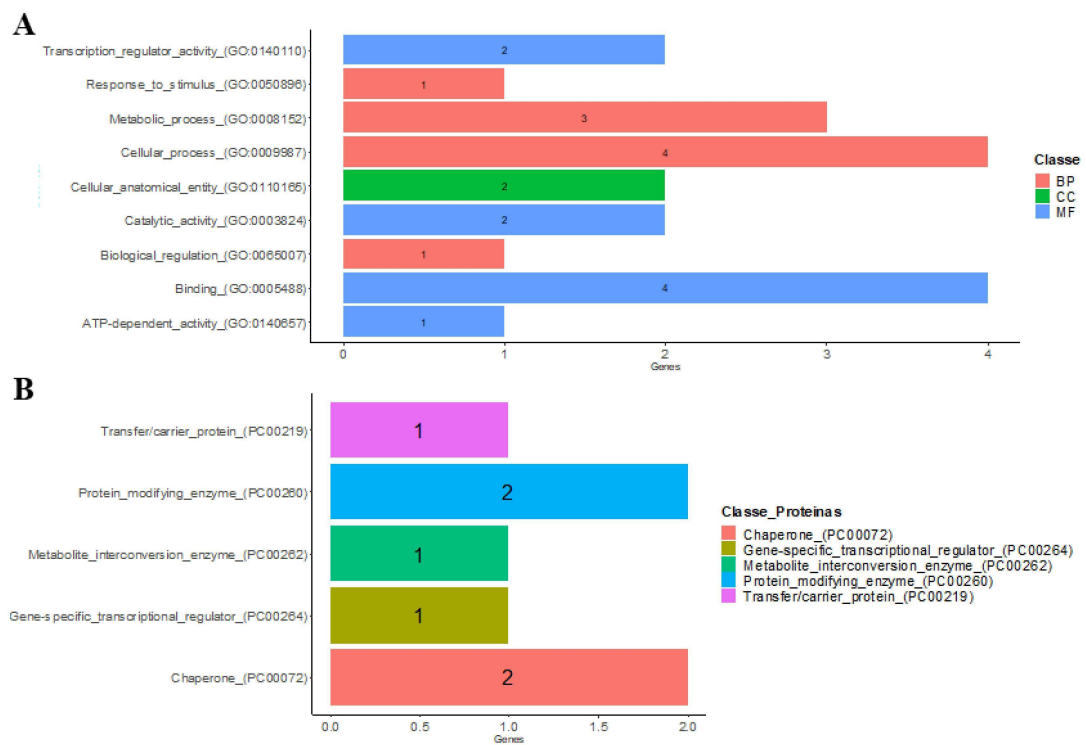
ANEXO C. Matriz de correlação entre os caracteres para as populações UFV-MP5 e Beija-Flor. A. Correlação entre os caracteres avaliados na população Beija-Flor. B. Correlação entre os caracteres avaliados na população UFV-MP5.



ANEXO D Histogramas para os caracteres avaliados na população UFV-MP5 (Histogramas de A a G) e caracteres avaliados na população Beija-Flor (Histogramas de H a M). A. Subunidade de 10 kDa. B. Subunidade de 19 kDa. C. Subunidade de 22 kDa. D. Subunidade de 27 kDa. E. Concentração de zeínas totais. F. Percentual de amilose (%). G. Percentual de amido (%). H. Subunidade de 10 kDa. I. Subunidade de 19 kDa. J. Subunidade de 21 kDa. K. Subunidade de 22 kDa. L. Subunidade de 27 kDa. M. Concentração de zeínas totais.



ANEXO E. Perfil de Zeínas em gel de SDS-PAGE. Marcador Molecular (MM) GE Healthcare. As numerações correspondem a identificação dos acessos avaliados na população UFV-MP5.



ANEXO F. Gráficos de Barras representando a distribuição dos genes candidatos da população UFV-MP5 em função dos processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e classes de proteínas de acordo com GO ONTHOLOGY. A. Gráfico de barras contendo no eixo X o número de genes identificados e no eixo y a descrição da função molecular, processo biológico ou componente celular envolvido, sendo: BP = processo biológico, CC = componente celular e MF = função molecular. B. Gráfico de barras contendo no eixo X o número de genes identificados e no eixo y a descrição da classe de proteína em questão.