

LÍVIA GOMES TORRES

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS ENDOGÂMICAS DE MILHO
TROPICAL PARA MORFOLOGIA DE RAIZ E EFICIÊNCIA
NUTRICIONAL EM CONDIÇÕES CONTRASTANTES DE NITROGÊNIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Torres, Lívia Gomes, 1990-

T693c
2017

Caracterização de linhagens endogâmicas de milho tropical para morfologia de raiz e eficiência nutricional em condições contrastantes de nitrogênio / Lívia Gomes Torres. – Viçosa, MG, 2017.

xi, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Rodrigo Oliveira de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Melhoramento genético. 2. *Zea mays* L..
3. Plantas - Efeito do nitrogênio. 4. Raízes (Botânica).
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia.
Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento.
II. Título.

CDD 22 ed. 633.152

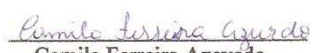
LÍVIA GOMES TORRES

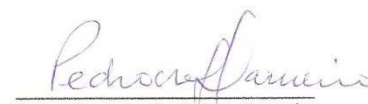
**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS ENDOGÂMICAS DE MILHO
TROPICAL PARA MORFOLOGIA DE RAIZ E EFICIÊNCIA
NUTRICIONAL EM CONDIÇÕES CONTRASTANTES DE NITROGÊNIO**

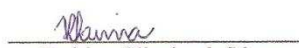
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2017.


Fabyano Fonseca e Silva
(Coorientador)


Camila Ferreira Azevedo


Pedro Crescêncio Souza Carneiro


Rodrigo Oliveira de Lima
(Orientador)

Aos meus pais, Robledo e Elmira,
e ao meu irmão Robledo Filho,
por preencherem minha vida com amor.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção, renovação da esperança e gratas surpresas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade da realização do curso e enorme contribuição em minha formação profissional e pessoal.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

Ao professor Rodrigo Oliveira de Lima, pela orientação, ensinamentos, oportunidades, conselhos, confiança, incentivo e amizade.

À professora Camila Ferreira Azevedo, pelos ensinamentos, incentivo, contribuição, amizade, atenção, paciência e apoio.

Ao professor Fabyano Fonseca e Silva, pelos ensinamentos, incentivo, contribuição, amizade e por ser um grande mentor.

Ao professor Pedro Crescêncio Souza Carneiro, pelos ensinamentos, especialmente pelo entusiasmo com o ensino de Genética e Melhoramento.

Aos membros da comissão avaliadora por terem aceitado participar da banca e pelas sugestões.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior, pelos ensinamentos, pensamento crítico (construtivo) e amizade.

Ao professor Antônio Alberto da Silva, por ter concedido meu primeiro estágio e oportunidade de trabalhar com pesquisa. Grata por ter convivido e aprendido com a equipe de Manejo Integrado de Plantas Daninhas.

Ao professor Cosme Damião Cruz, por ter concedido meu primeiro estágio na área de Genética e Melhoramento de Plantas. O Laboratório de Bioinformática foi um excelente ambiente de aprendizado e local onde fiz grandes amigos.

À professora Eveline Teixeira Caixeta, pelo curto período em que estive no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro.

À professora Elizabeth Lee e ao técnico de laboratório Byron Good, pela primeira oportunidade que eu tive de trabalhar com milho, pela motivação e entusiasmo em trabalhar com a cultura; tornando minha experiência na University of Guelph ainda melhor.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação até o presente momento.

Aos meus amados pais Robledo e Elmira, por serem meus maiores incentivadores e exemplos; por preencherem minha vida com amor e esse amor transformar o jeito que eu enxergo o mundo todos os dias.

Ao meu irmão Robledo Filho, pela amizade, companheirismo, conselhos, incentivo e exemplo.

À minha cunhada Vanelle, pela amizade e incentivo.

À minha avó Adalgisa, por tudo que representa para mim e pelo exemplo de vida e sabedoria.

Aos meus familiares que sempre me apoiam, pelo carinho e torcida.

Aos colegas e amigos do Programa Milho, pela imensa ajuda na condução do experimento, algumas vezes até nos finais de semana, pelo companheirismo e dedicação. Os conhecimentos compartilhados e momentos de descontração tornaram o trabalho mais leve e certamente geraram boas lembranças.

Aos funcionários do Vale da Agronomia e Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pela ajuda nos momentos em que eu precisei.

Ao Programa Milho Pipoca, em especial aos funcionários Leonardo e Márcio e ao estudante Vinícius, por terem emprestado o software WinRHIZO e o scanner, mas muito mais que isso, pelas conversas e auxílio.

Aos colegas e amigos do Programa Feijão, nossos vizinhos no Vale da Agronomia, pelas conversas, cafés e balança de precisão emprestada.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Marco Túlio e Odilon, por serem sempre atenciosos e prestativos ao auxiliarem os estudantes.

Aos meus amigos-irmãos, de infância, Coluni, Agronomia 2009, laboratórios, Guelph e pós-graduação, eu agradeço imensamente por tornar a vida mais divertida e leve, pela presença nos momentos bons e ruins.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

BIOGRAFIA

LÍVIA GOMES TORRES, filha de Robledo de Almeida Torres e Elmira Maria Gomes Torres, nasceu em 26 de junho de 1990, em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2006, iniciou os seus estudos na Universidade Federal de Viçosa cursando o ensino médio no Colégio de Aplicação – Coluni, formando-se em dezembro de 2008.

Em março de 2009, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, onde obteve o título de Engenheira Agrônoma em julho de 2015. Durante seu curso de graduação, participou do Programa Ciências Sem Fronteiras e estudou na University of Guelph, Canadá, no período de setembro de 2013 a dezembro de 2014.

Em agosto de 2015, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de dissertação para a obtenção do título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. Introdução Geral	1
2. Referencial Teórico	2
2.1. A Cultura do Milho.....	2
2.2. Eficiência no Uso de Nitrogênio e Morfologia de Raiz	3
2.3. Metodologia de Modelos Mistos	9
2.4. Inferência Bayesiana.....	11
2.5. Referências Bibliográficas.....	15
3. Capítulo 1: Variabilidade genética para morfologia de raiz em um painel de linhagens de milho tropical avaliadas em condições contrastantes de nitrogênio.....	22
3.1. Introdução.....	24
3.2. Material e Métodos	26
3.2.1. Material Genético	26
3.2.2. Caracterização e Avaliação das Linhagens	27
3.2.3. Análises Estatísticas.....	28
3.3. Resultados e Discussão	32
3.3.1. Amplitude e média de valores genotípicos	32
3.3.2. Estimativas de componentes de variância, herdabilidade e acurácia	35
3.3.3. Correlações entre caracteres.....	37
3.3.4. Correlações canônicas entre grupos de caracteres.....	40
3.3.5. Diversidade genética.....	41
3.3.6. Seleção de linhagens para caracteres de raiz.....	47
3.4. Conclusões.....	51
3.5. Referências Bibliográficas.....	51
4. Capítulo 2: Multi-trait multi-environment Bayesian model reveals G x E interaction for nitrogen-use efficiency components in tropical maize.....	57
4.1. Introduction	59
4.2. Material and Methods.....	61
4.2.1. Plant Material	61
4.2.2. Field Experiments.....	61
4.2.3. Statistical Analysis	62
4.3. Results and Discussion.....	64
4.4. Conclusions	71
4.5. References	72
5. Conclusões Gerais.....	77

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Variabilidade genética para morfologia de raiz em um painel de linhagens de milho tropical em condições contrastantes de nitrogênio

Tabela 1: Valores genotípicos mínimo, média e máximo, coeficiente de variação e porcentagem de redução da média dos caracteres altura de planta (ALT, cm), diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR mg mg^{-1}), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm^2), volume radicular (VOL, cm^3) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm^{-3}) avaliados em um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical nos ambientes de baixo e alto nitrogênio.....34

Tabela 2: Estimativas de parâmetros genéticos para os caracteres altura de planta (ALT, cm), diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR mg mg^{-1}), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm^2), volume radicular (VOL, cm^3) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm^{-3}) avaliados em um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical nos ambientes de baixo e alto nitrogênio.....36

Tabela 3: Estimativas de correlações entre vetores de valores genéticos dos caracteres altura de planta (ALT, cm), diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR mg mg^{-1}), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm^2), volume radicular (VOL, cm^3) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm^{-3}) avaliados em um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical nos ambientes de baixo e alto nitrogênio.....39

Tabela 4: Estimativas de correlações e coeficientes canônicos no ambiente de alto nitrogênio; Grupo I: diâmetro de colmo (DIAM, mm); massa de parte aérea seca

(MPAS, mg); crescimento diário (CD, cm); Grupo II: massa de raiz seca (MRS, mg); comprimento radicular total (CRT, cm); diâmetro radicular médio (DRM, mm).....40

Tabela 5: Estimativas de correlações e coeficientes canônicos no ambiente de baixo nitrogênio; Grupo I: diâmetro de colmo (DIAM, mm); massa de parte aérea seca (MPAS, mg); crescimento diário (CD, cm); Grupo II: massa de raiz seca (MRS, mg); comprimento radicular total (CRT, cm); diâmetro radicular médio (DRM, mm).....41

Tabela 6: Resumo do agrupamento baseado no método de Mojena, valores genotípicos médio, mínimo e máximo dos caracteres diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), crescimento diário (CD, cm), relação raiz: parte aérea (RSR, mg mg⁻¹), massa de raiz seca (MRS, mg), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm) nos diferentes grupos no ambiente de alto nitrogênio.....49

Tabela 7: Resumo do agrupamento baseado no método de Mojena, valores genotípicos médio, mínimo e máximo dos caracteres diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), crescimento diário (CD, cm), relação raiz: parte aérea (RSR, mg mg⁻¹), massa de raiz seca (MRS, mg), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm) nos diferentes grupos no ambiente de baixo nitrogênio.....50

Capítulo 2 - Multi-trait multi-environment Bayesian model revealed Gx E interaction for nitrogen use efficiency components in tropical maize inbred lines

Table 1: Deviance information criteria for the full (considering G x E interaction) and null (not considering the interaction) models.....65

Table 2: Posterior inferences for the mean and genetic variance; the mode, mean, median and higher posterior density (HPD) interval of the broad-sense heritability; and the mode, mean, median and higher posterior density (HPD) interval of the genetic correlation, considering the proposed multi-trait multi-environment model.....66

Table 3: Posterior inferences for the mean and genetic variance; the mode, mean, median and higher posterior density (HPD) interval of the broad-sense heritability, considering the single-trait multi-environment models.....67

Table 4: Coefficient of residual variation (CVe, %), coefficient of genotypic variation (CVg, %) and relative variation index (CVg/CVe) for the multi-trait multi-environment model and the single-trait multi-environment models.....70

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Variabilidade genética para morfologia de raiz em um painel de linhagens de milho tropical em condições contrastantes de nitrogênio

Figura 1: Dendograma de um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical avaliado em condição de alto nitrogênio, baseado no método UPGMA, obtido de médias BLUP de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea de plântulas no estágio V5..... 44

Figura 2: Dendograma de um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical avaliado em condição de baixo nitrogênio, baseado no método UPGMA, obtido de médias BLUP de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea de plântulas no estágio V5.....45

Figura 3: Dendograma de um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical considerando a análise conjunta dos ambientes, desprezando-se os efeitos da interação, baseado no método UPGMA, obtido de médias BLUP de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea de plântulas no estágio V5.....46

Capítulo 2 - Multi-trait multi-environment Bayesian model revealed GxEn interaction for nitrogen use efficiency components in tropical maize

Figure 1: Posterior density for the multi-trait multi-environment model above (left: NUpE and right: NUtE) and for each of the single-trait multi-environment models below (left: NUpE and right: NUtE). The solid line represents the posterior density for the HN level, while the dotted line represents the posterior density for the LN level.....68

Figure 2: Posterior density for the genotypic correlation between the traits nitrogen-uptake efficiency (NUpE) and nitrogen-utilization efficiency (NUtE) for the multi-trait multi-environment model. The solid line represents the posterior density for the HN level, while the dotted line represents the posterior density for the LN level.....69

RESUMO

TORRES, Livia Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017.
Caracterização de linhagens endogâmicas de milho tropical para morfologia de raiz e eficiência nutricional em condições contrastantes de nitrogênio.
Orientador: Rodrigo Oliveira de Lima. Coorientador: Fabyano Fonseca e Silva.

A adubação nitrogenada tem sido um fator impulsionador do aumento de produtividade das lavouras de milho, entretanto, esta prática cultural realizada de forma excessiva é apontada como causa de impactos ambientais e econômicos. Muitos programas de melhoramento genético de milho têm buscado identificar cultivares mais eficientes no uso de nitrogênio (N), que produzem mais com menos N. A eficiência no uso de N é obtida a partir de dois componentes, a eficiência na absorção e utilização de N. Na literatura, muitos trabalhos atribuem aos sistemas radiculares superiores maior eficiência na absorção de nutrientes. A presença de variabilidade genética para caracteres de morfologia de raiz e componentes da eficiência no uso de N em linhagens de milho pode ser explorada com a finalidade de selecionar materiais mais adaptados a solos tropicais, onde predominam a ocorrência de seca e de baixa fertilidade natural. No capítulo 1, um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical foi caracterizado para morfologia de raiz e caracteres de parte aérea em estádio de plântulas. No capítulo 2, um painel de 64 linhagens foi caracterizado para eficiência na absorção e utilização de N em condição de campo. Em ambos os experimentos, as linhagens foram avaliadas em condições contrastantes de N. Parâmetros genéticos foram estimados com o objetivo de se obter um maior conhecimento sobre o germoplasma em questão. Os painéis de linhagens endogâmicas de milho tropical apresentaram variabilidade genética para os caracteres avaliados, e, portanto, têm potencial para serem utilizados para fins de melhoramento genético. Linhagens promissoras foram identificadas para caracteres de raiz e para eficiência nutricional de N, nos capítulos 1 e 2, respectivamente. As informações obtidas no presente trabalho servirão como base para orientar o planejamento de cruzamentos entre as linhagens visando à obtenção de híbridos de milho mais eficientes no uso do N.

ABSTRACT

TORRES, Livia Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Characterization of tropical maize inbred lines for root morphology and nutritional efficiency in contrasting nitrogen conditions.** Advisor: Rodrigo Oliveira de Lima. Co-Advisor: Fabyano Fonseca e Silva.

Nitrogen fertilization has been a driving factor for increased productivity of maize crops. However, this cultural practice performed excessively is indicated as the cause of environmental and economic impacts. Many maize breeding programs have sought to identify more efficient cultivars in the use of nitrogen (N), which present high yields under low N conditions. The N use efficiency is obtained from two components, N uptake and N utilization efficiencies. In the literature, many studies attribute to superior root systems the higher efficiency of nutrient uptake. The presence of genetic variability for root morphology traits and N use efficiency components in maize inbred lines can be explored in order to select materials more adapted to tropical soils, where the occurrence of drought and low natural fertility predominate. In chapter 1, a panel of 150 inbred lines of tropical maize was characterized for root morphology and shoot traits in seedling stage. In chapter 2, a panel of 64 inbred lines was characterized for N uptake efficiency and N utilization efficiency under field conditions. In both experiments, the inbred lines were evaluated in contrasting conditions of N. Genetic parameters were estimated in order to obtain a better knowledge about the germplasm in question. The panels of tropical maize inbred lines presented genetic variability for the evaluated traits, thus they have potential to be used for breeding purposes. Promising inbred lines were identified for important root traits and for N uptake and utilization efficiencies in chapters 1 and 2, respectively. The information obtained in the present work will be used to guide the planning of crosses among the inbred lines aiming to obtain efficient maize hybrids in N use.

1. Introdução Geral

O nitrogênio (N) é o nutriente consumido em maior quantidade pela cultura do milho. Devido à grande exigência nutricional dessa cultura, todos os anos milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados são adicionados ao solo com intuito de obter alta produtividade de grãos. A adubação nitrogenada em excesso, além de ser uma prática cultural de custo elevado aos agricultores, também é apontada como causa de uma série de impactos ambientais como a contaminação do solo e eutrofização de rios e lagos. Cultivares de milho que apresentam altas produtividades em condições de baixo N no solo são importantes neste contexto, e têm sido alvo de vários programas de melhoramento, especialmente para condições de solos tropicais, nos quais predominam a ocorrência de seca e de baixa fertilidade natural.

Uma das estratégias para a manutenção e aumento da produtividade das culturas envolvendo menores impactos econômicos e ambientais é a utilização de materiais genéticos melhorados por meio de sistemas radiculares superiores e eficientes na absorção de nutrientes. Sistemas radiculares vigorosos, estendidos e bem distribuídos exploram um maior volume de solo e, conseqüentemente, podem vir a ser mais eficientes na absorção de nutrientes minerais. A variação genética de caracteres de raiz é essencial à adaptação de espécies vegetais às condições adversas do meio ambiente, como déficit hídrico e nutricional.

A presença de variabilidade genética para caracteres de morfologia de raiz e componentes da eficiência no uso do N (eficiência na absorção e utilização de N) em milho pode ser explorada com a finalidade de selecionar materiais com maiores capacidades de absorção de N e mais adaptados a solos tropicais. A caracterização do sistema radicular geralmente tem sido feita em estágio de plântulas, devido à dificuldade de mensuração dos caracteres radiculares em estádios mais avançados de desenvolvimento da planta, bem como o aumento da complexidade do sistema radicular nestes estádios e da importância dos caracteres radiculares para absorção de nutrientes em fase de plântula. Enquanto as avaliações da eficiência do uso de N e seus componentes usualmente são feitas em condições de campo, por representar melhor a realidade, as interações com o ambiente e a variação destes caracteres.

O Programa Milho®, Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Federal de Viçosa, vislumbra potencial na identificação e seleção de linhagens superiores para caracteres de morfologia de raiz, absorção e utilização de N, e tem

concentrado seus esforços nesta linha de pesquisa. O presente trabalho envolve a discussão de dois experimentos, em ambos um painel de linhagens endogâmicas de milho tropical foi caracterizado em condições contrastantes de N. No Capítulo 1, um painel de 150 linhagens foi caracterizado para morfologia de raiz e caracteres de parte aérea em estágio de plântulas e também foi feito um estudo da diversidade genética. No Capítulo 2, um painel de 64 linhagens foi caracterizado para eficiência de absorção e utilização de N em condição de campo e um modelo bayesiano multi-característico multi-ambiente foi proposto para a análise dos dados. Das linhagens estudadas em ambos os capítulos, 42 linhagens em comum estiveram presentes nos dois experimentos. Os objetivos destes trabalhos foram caracterizar fenotipicamente e quantificar a variabilidade genética em painéis de linhagens para importantes caracteres para o uso eficiente de N na planta, seja eles radiculares bem como de parte aérea, e também avaliar a relação entre estes caracteres. Parâmetros genéticos foram estimados com a finalidade de se obter um maior conhecimento sobre o germoplasma em questão. Este conhecimento servirá como base para orientar o planejamento de cruzamentos entre as linhagens.

2. Referencial Teórico

2.1. A Cultura do Milho

A planta de milho é originária do continente Americano, existindo evidências que sua domesticação tenha se iniciado a mais de 10.000 anos atrás, por antigas civilizações que habitavam a região onde atualmente situa-se o México. Quando comparado com o teosinto, sua espécie ancestral, o milho que conhecemos atualmente apresenta grandes diferenças, como espigas maiores, maior quantidade de grãos, menor dispersão natural dos grãos uma vez que esses estão aderidos à espiga e protegidos pela palha, além de menor perfilhamento da planta. Existe grande variedade de cultivares de milho, com lavouras estabelecidas nas mais variadas condições de clima, manejo e nível tecnológico. Existem genótipos adaptados ao cultivo comercial desde a latitude 58° N até 40° S, do nível do mar até 3800 metros de altitude (PATERNIANI, 1995), nas mais variadas condições de clima e época de cultivo (MÔRO e FRITSCHÉ-NETO, 2015).

Juntamente com trigo e arroz, o milho é um dos cereais mais plantados e consumidos mundialmente. O principal componente do grão é o amido

(FORNASIERI FILHO, 2007), importante fonte energética. Devido as suas características nutricionais, ele é extensivamente utilizado na alimentação humana e animal, além disso, também é utilizado direta ou indiretamente como matéria-prima para diversos produtos em vários segmentos da indústria. Segundo estimativas do USDA (2016), a safra mundial de milho, 2015/2016, alcançará uma produção de 959,14 milhões de toneladas, com área total plantada de 177,41 milhões de hectares e produtividade média de 5,41 toneladas por hectare. O Brasil apresenta posição de destaque neste cenário, uma vez que é o terceiro maior produtor mundial e o segundo maior exportador. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), a produção de milho da safra brasileira, 2015/2016, alcançará 66,98 milhões de toneladas em uma área plantada de 15,92 milhões de hectares com produtividade média de 4,21 t ha⁻¹. No Brasil, foi observada uma redução na produção de milho na safra 2015/16 em relação à safra 2014/2015 devido às intempéries climáticas, especialmente na segunda safra, que foi marcada por uma forte seca em momentos críticos para a planta de milho. A produtividade média brasileira é considerada baixa em comparação a outros países. Por exemplo, nos Estados Unidos a produtividade média é de 10,57 t ha⁻¹. Algumas dentre as principais razões para essa baixa produtividade de grãos são a ocorrência de solos com baixa fertilidade natural associado ao baixo nível tecnológico adotado pelos agricultores, a ocorrência de intempéries climáticas e o baixo investimento em fertilizantes, principalmente nitrogenados.

2.2. Eficiência no Uso de Nitrogênio e Morfologia de Raiz

Extensivas áreas de plantio de milho no mundo são cultivadas em condições de solos tropicais, nos quais predominam a ocorrência de seca e de baixa fertilidade natural, principalmente de nitrogênio (N) e fósforo. O N é o nutriente absorvido em maior quantidade pela cultura do milho. Ele é constituinte de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucléicos e, além disso, está associado a processos fisiológicos de fotossíntese, respiração e absorção iônica (TAIZ e ZEIGER, 2010). Na cultura do milho, ele é necessário desde os estádios fenológicos iniciais de desenvolvimento da planta até a fase de enchimento de grãos (BASSO e CERETTA, 2000; ANDRADE et al., 2003). O sintoma de deficiência de N inicia nas folhas mais velhas de milho, devido à mobilidade do nutriente na planta, observado em forma de "V" invertido ao

longo da nervura principal e, usualmente, deformações na ponta das espigas (MALAVOLTA et al., 1997). Estima-se que para cada 60 kg ha⁻¹ de grãos de milho produzidos são necessários 1 kg ha⁻¹ de N no solo. A grande maioria dos cultivares comerciais atuais de milho foi desenvolvida com foco em produtividade de grãos em condições de alta fertilidade. Assim, todos os anos milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados são adicionados ao solo para garantir o crescimento e desenvolvimento da cultura do milho, com intuito de obter alta produtividade de grãos.

A produção industrial de adubos nitrogenados requer alta demanda energética com a utilização de grandes quantidades de combustíveis fósseis. O custo dos principais fertilizantes nitrogenados tem aumentado de forma expressiva nos últimos anos (USDA, 2016), o que tem tornado a adubação nitrogenada uma das práticas culturais mais onerosas, caracterizando-a como uma prática de alto investimento e arriscada, uma vez que o preço pago pela saca de milho apresenta oscilações de uma safra para outra, podendo ocorrer um desequilíbrio entre custos operacionais e receita bruta. Além disso, a aplicação de fertilizantes nitrogenados em excesso tem sido apontada como causa de impactos ambientais e desequilíbrios no ecossistema e é considerada potencialmente poluente ao meio ambiente (ERISMAN et al., 2013; BORDISKY et al., 2014). A qualidade da água de lençóis freáticos pode ser comprometida pela contaminação por N proveniente de fertilizantes e esse pode causar contaminação do solo e eutrofização de rios e lagos.

Dessa maneira, uma alternativa para a manutenção e aumento da produtividade das culturas com menor impacto sobre os custos de produção e o meio ambiente é a utilização de materiais genéticos melhorados por meio de sistemas radiculares superiores que tenham uma melhor eficiência na absorção de nutrientes minerais, especialmente em ambientes de baixa disponibilidade desses. Com o desenvolvimento de cultivares superiores em morfologia de raiz espera-se obter maiores produtividades com menores doses de adubação nitrogenada e, assim, reduzir os custos e tornar o processo produtivo mais sustentável.

Moll et al. (1982) definiram eficiência no uso do N (EUN) como produtividade de grãos por unidade de N disponível à planta no solo. A EUN é constituída por dois componentes: a eficiência na absorção de N (EAbN), que é a capacidade da planta em absorver N, e a eficiência na utilização (EUtN), que é a

eficiência com que o N absorvido é utilizado para produzir grãos. Esses autores avaliaram oito híbridos de milho em experimentos de campo em dois níveis de N e encontraram que, em baixa disponibilidade de N, a variação na EUn contribuiu mais para a EUN e em condição de alto N, a variação na EAbN contribuiu mais para diferenciação dos híbridos para EUN, apresentando correlações e efeitos diretos superiores.

Fernandes et al. (2005) avaliaram seis híbridos de milho para eficiência no uso de N em várias doses de N. Segundo os autores, a eficiência no uso de N diminuiu quando se aumentou a dose de N. Coque e Gallais (2007) avaliaram uma população de linhagens recombinantes avaliadas em testcross, cruzadas com uma linhagem testadora, e estudaram a variação genética para a remobilização de N e a absorção de N pós-florescimento. Eles concluíram que houve maior variação para a absorção de N pós-florescimento do que para a remobilização de N, apesar da grande contribuição para os grãos de N pela remobilização.

Worku et al. (2007) avaliaram em seu experimento a absorção e utilização de N e a interação genótipos x ambientes (GxE) de 16 híbridos de milho tropicais na África. Os híbridos foram avaliados sob condição de baixo, médio e alto N. Seus resultados apresentaram a relevância das interações GxE para a produtividade de grãos no milho tropical à medida que a intensidade do estresse por N aumenta. Os autores também identificaram alguns híbridos que apresentaram altas produtividades sob alto e baixo N. Na conclusão do trabalho, obtiveram que a absorção pós-florescimento de N e a utilização de N apresentaram coeficientes de correlação linear elevados e positivos com a produtividade de grãos sob condição de baixo N, enquanto que a absorção de N antes da antese foi de pouca relevância. Segundo Gallais e Hirel (2004), genes responsáveis pelo controle da eficiência no uso de N são expressos de acordo com a disponibilidade do nutriente à planta. Consequentemente, a magnitude da variabilidade genética é manifestada diferentemente nos ambientes contrastantes.

Raun et al. (1999) relataram que a eficiência no uso de N no milho não ultrapassa os 50%, pois é prejudicada por vários processos de perda de N como a lixiviação de nitrato, volatilização da amônia, denitrificação e competição com a microbiota do solo. Dessa forma, umas das estratégias para aumentar a eficiência no uso de N em milho é melhorar a eficiência na absorção de N do solo com um sistema

radicular mais eficiente, o que envolve o aumento da superfície radicular e maiores emissões de raízes laterais (HODGE, 2004). As raízes desempenham funções essenciais, como absorção de nutrientes e água, além de darem sustentação às plantas. O hábito de crescimento do sistema radicular do milho é superficial, entretanto, o comprimento do sistema radicular pode atingir até três metros; fatores como pH, umidade do solo e compactação influenciam a profundidade de raízes (MAGALHÃES et al., 1995).

A variação genética para caracteres de raiz é essencial à adaptação de espécies vegetais às condições ambientais adversas como, por exemplo, déficit hídrico e nutricional (MANAVALAN et al., 2011). Diversos estudos relatam que a extensão e a natureza da variação da arquitetura radicular têm substancial implicação na melhoria da eficiência do uso de nutrientes e água nas culturas, e está relacionada ao aumento da produtividade em condições de estresse abiótico (CHUN et al., 2005; TIAN et al., 2006; DORLODOT et al., 2007; GARNETT et al., 2009). Há autores que apontam que o melhoramento de raízes tem sido proposto como um fator chave em uma “segunda revolução verde” para aumentar o rendimento das culturas e eficiência no uso de recursos como água e nutrientes (MU et al., 2015).

O conhecimento da diversidade genética do germoplasma disponível é de fundamental importância para orientar cruzamentos e planejamento de programas de melhoramento genético (LI et al., 2004). A diversidade em morfologia de raiz pode ser explorada no sentido de melhorar a eficiência de uso de nutrientes em situações de estresses abióticos (BARBER, 1994; GREGORY, 1994). A plasticidade da morfologia radicular pode desempenhar um importante papel na aquisição de nutrientes (LIU et al., 2009). Segundo esses autores, em milho, as plantas respondem à deficiência de N com aumento da razão raiz: parte aérea, comprimento total de raízes, alongamento de raízes axiais individuais e do crescimento de raízes laterais, mas com redução no número de raízes axiais.

Quanto à densidade do tecido radicular, alguns estudos demonstraram que tecidos menos densos permitem uma taxa de crescimento relativa rápida e uma aquisição de recursos rápida enquanto a planta se desenvolve com um baixo investimento em matéria seca (RYSER, 1996; RYSER e LAMBERS, 1995; WAHL e RYSER, 2000; BIROUSTE et al., 2014). Entretanto, esses tecidos tendem a ter um curto prazo de vida e são usualmente mais vulneráveis à herbivoria e patógenos

comparados com tecidos mais densos (TJOELKER et al., 2005; BIROUSTE et al., 2014). Tjoelker et al. (2005) avaliaram variações em caracteres de raiz e parte aérea entre espécies e grupos de espécies. Eles encontraram que, apesar de diferentes vias fotossintéticas e habilidades de fixar nitrogênio entre as espécies, foi observada concordância em análises comparativas de longevidade de folha e raiz, o que pode representar uma relação entre caracteres, efeitos em plantas e processos do ecossistema. Em alguns estudos, a longevidade das raízes está negativamente correlacionada com a concentração de N, taxas de respiração específicas e comprimento específico da raiz (EISSENSTAT et al., 2000).

Liu et al. (2009) avaliaram duas linhagens de milho contrastantes para eficiência no uso de N, em condições de campo, em níveis alto e baixo de N. Segundos esses autores, plântulas com maior comprimento total de raiz, massa de raiz seca e alta razão massa raiz: parte aérea são mais responsivas à deficiência de N. Em outro trabalho, Chun et al. (2005) avaliaram 21 híbridos de milho e os 7 parentais em condições de alto e baixo N e encontraram que a massa de raiz seca é maior em baixos níveis de N, enquanto a massa de parte aérea é menor. Segundo esses autores, isso pode acontecer devido ao fato de que a massa de raiz seca depende da translocação de assimilados da parte aérea para raiz, e que, em estresse nutricional causado pelo N a planta tende a apresentar uma típica resposta de aumento do sistema radicular por meio da superfície de absorção do nutriente.

Kumar et al. (2012) avaliaram um painel de 74 linhagens de milho em estádios de 6, 10 e 14 dias para vários caracteres de raiz. Eles verificaram que massa de raiz seca é significativamente correlacionada com vários outros caracteres de raiz, o que indica que esse caractere pode ser utilizado na seleção indireta para melhoramento de outros caracteres de raiz. Esses autores também concluíram que selecionar linhagens de milho em estágio de plântulas com base em comprimento total de raiz e massa de raiz seca pode ser um bom preditor da eficiência nutricional e de uso da água com condições de campo.

Mundim et al. (2013) avaliaram 25 linhagens de milho pipoca em condições contrastantes de N e identificaram linhagens de milho pipoca divergentes para condições de alto e baixo N. Eles também propuseram um índice de seleção para a identificação de linhagens eficientes no uso de N, o qual levou em consideração os caracteres comprimento total de raiz, crescimento diário e eficiência na absorção de

N. Abdel-Ghani et al (2013) avaliaram um painel de 74 linhagens de milho em condições contrastantes de N, em campo e casa de vegetação. Os autores verificaram que produtividade de grãos foi positiva e significativamente correlacionada com massa de raiz seca em condição de alto N.

York et al (2015) investigaram a hipótese de que, nos últimos 100 anos, por meio da seleção indireta, o sistema radicular do milho evoluiu para fenótipos mais adequados à competição intensa por N. Os autores avaliaram 16 cultivares de milho que representam variedades de sucesso comercial no último século em dois níveis de N e em três densidades de plantio. Com o intuito de simplificar a interpretação dos dados, as dezesseis variedades foram divididas em quatro grupos (denominados “eras”) com quatro variedades cada. Os sistemas radiculares de materiais mais recentes comparados com os mais antigos foram 7° (em relação ao plano horizontal) mais superficiais, com o dobro da distância entre a emergência da raiz nodal e a ramificação lateral, 14% mais de vasos de meta xilema, porém a área total de vasos de meta xilema permaneceu inalterada, o que pode ser devido ao fato da área média individual dos vasos de meta xilema ser reduzida em 12%. A plasticidade também foi observada em regiões corticais, como o aerênquima, que apresentou aumento em densidades populacionais maiores.

Mu et al. (2015) avaliaram a contribuição da melhoria em crescimento radicular para a eficiência na aquisição de N e produção de grãos sob dois níveis de N em um experimento de campo de três anos. Os autores usaram dois testcrosses quase isogênicos de milho, T-213 (raiz grande) e T-Wu312 (raiz pequena), derivado de um retrocruzamento de uma população BC_4F_3 de dois pais (Ye478 e Wu312) com tamanhos de raiz contrastantes. Constatou-se que a densidade de comprimento da raiz, a área superficial das raízes e o peso seco na fase de florescimento foram, em geral, mais elevados em T-213 comparado com o T-Wu312, e que o aumento global do crescimento radicular no T-213 aumentou a absorção de N pós-florescimento, que aumentou a produção de grãos.

Zhan e Lynch (2015) testaram a hipótese de que, em condições de baixo N, cultivares de milho com poucas e longas (PL) raízes laterais teriam maior alongamento axial radicular, enraizamento mais profundo e maior aquisição de N do que as cultivares com muitas e curtas (MC) raízes laterais. Os autores avaliaram linhagens recombinantes de milho contrastantes para número de raízes laterais e

comprimento, em casa de vegetação e no campo, em condições de N adequadas e sub-ótimas. Em baixo N, o fenótipo PL apresentou respiração radicular substancialmente reduzida e maior profundidade de enraizamento do que o fenótipo MC. Em experimentos de campo, em baixo N, o fenótipo PL apresentou maior profundidade de enraizamento, conteúdo de N na parte aérea, fotossíntese foliar e biomassa de parte aérea do que o fenótipo MC. Os resultados deste trabalho sugerem que o fenótipo de poucas e longas raízes laterais pode ser um alvo de seleção para a eficiência da N da cultura.

Esses e diversos outros trabalhos na literatura apontam que existe potencial para o desenvolvimento de linhagens e híbridos superiores em morfologia de raiz e eficiência no uso de N. Sendo assim, esses estudos são importantes para uma agricultura mais sustentável, autônoma e segura economicamente.

2.3. Metodologia de Modelos Mistos

Alguns métodos têm sido utilizados com a finalidade de prever o valor genotípico em plantas, estes diferem principalmente pelas pressuposições assumidas e pelas considerações realizadas sobre a natureza dos efeitos dos valores genotípicos (WHITE e HODGE, 1989). Os procedimentos mais usuais têm sido o BLUE – Best Linear Unbiased Estimator (melhor estimador linear não tendencioso), o BLP – Best Linear Predictor (melhor preditor linear) e, mais recentemente, o BLUP – Best Linear Unbiased Predictor (melhor preditor linear não tendencioso).

O procedimento BLUP foi desenvolvido por Henderson, em 1949, no contexto de modelos mistos, com a finalidade de prever valores genéticos de animais para a produção de leite em condições de desbalanceamento nos dados (MRODE, 1996; WHITE e HODGE, 1989). Porém, somente foi apresentado formalmente por Henderson, em 1973 (RESENDE, 2002). Uma síntese histórica da evolução do procedimento BLUP é apresentada por Resende (2002). Duarte e Vencovsky (2001) propuseram uma reflexão teórica sobre o processo de estimação e predição de médias de tratamentos no melhoramento vegetal. Neste sentido, compararam as análises baseadas no modelo linear fixo e no modelo linear misto com genótipos aleatórios, buscando identificar os fatores que podem determinar diferentes classificações genotípicas. A análise teórica permitiu constatar que a abordagem de modelo misto (com tratamentos aleatórios), comparativamente às

análises tradicionais (médias marginais e análise intrablocos), em geral, leva a maior homogeneidade das médias de tratamentos e seleção de diferentes tratamentos genéticos, quando a variância genotípica for baixa em relação à variância do erro e os ensaios forem não ortogonais e desbalanceados. Além disso, se os tratamentos forem oriundos de várias populações, a predição BLUP pode determinar diferente classificação das médias de tratamentos, em relação à análise intrablocos, mesmo perante ortogonalidade e balanceamento.

A metodologia de modelos mistos é uma ferramenta flexível para estimativa de parâmetros genéticos e predição de variáveis aleatórias (RESENDE, 2002). A metodologia apresenta diversas vantagens em relação à análise de variância (ANOVA), dentre elas: pode ser aplicada a dados desbalanceados; permite utilizar simultaneamente um grande número de informações, provenientes de diferentes gerações, locais e idades, o que geram estimativas e predições mais precisas; não exige dados provenientes de estruturas rígidas de experimentação e, assim, pode ser aplicada a dados que não estão associados a delineamentos, contanto que se tenha informação sobre a genealogia dos indivíduos; permite a estimação de efeitos de dominância e epistáticos, além dos aditivos, pois utiliza maior número de relações de parentesco; e permite comparar indivíduos analisados ao longo do tempo e espaço. Além disso, permite prever o desempenho de híbridos não realizados, desde que informações de relacionamento genético entre as linhagens estejam disponíveis (BERNARDO, 1995; 1996).

A metodologia de modelos mistos via REML/BLUP combina o procedimento de predição de valores genéticos de médias BLUP (melhor predição linear não viciada) com o procedimento de estimação de componentes de variância REML (máxima verossimilhança residual ou restrita), associados a um modelo linear misto, que é um modelo que contém efeitos fixos além da média geral e efeitos aleatórios além do erro. Esta metodologia tem se mostrado adequada quando se dispõe de experimentos não balanceados e se impõe restrições para que não haja componentes de variância negativos. O uso da metodologia REML/BLUP apresenta diversas vantagens, como: a não necessidade de suposição básica de independência dos erros; com o uso do procedimento REML não há limitações na análise conjunta em caso de heterogeneidade de variâncias residuais entre os ambientes; os efeitos de tratamento podem ser considerados aleatórios; a maximização da acurácia seletiva; a

minimização do erro de predição; a predição não viciada de valores genéticos e a maximização da probabilidade de selecionar o melhor entre vários genótipos (RESENDE, 2002).

Piepho et al. (2008) revisaram o uso de BLUP em melhoramento de plantas e testes de variedades, como o emprego de informações de pedigree para modelar e explorar a correlação genética entre parentes e o uso de estruturas flexíveis de variância-covariância para interação genótipos x ambientes. Os autores demonstraram que o BLUP é eficiente em relação à precisão preditiva em comparação com outros procedimentos. O método, que foi originalmente desenvolvido em melhoramento animal, atualmente vem sendo utilizado em várias áreas da pesquisa. Viana et al. (2010) compararam a acurácia e eficiência de seleção entre e dentro de famílias de meio-irmãos de milho pipoca por meio de métodos BLUP uni e multi-característico e também BLUE/ANOVA. Estes autores obtiveram como resultado que o método BLUP multi-característico apresentou maior acurácia e eficiência na seleção de famílias; no caso da seleção dentro de família, tanto a acurácia quanto a eficiência dos métodos BLUP uni e multi-característico foram equivalentes. Mendes et al. (2012) avaliaram a performance, adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho em experimentos não balanceados. A produtividade de grãos de 45 cultivares, incluindo híbridos e variedades, foram avaliadas em 49 ambientes em duas safras. Na safra de 2007/2008, 36 cultivares foram avaliados enquanto que na safra de 2008/2009 apenas 25 cultivares, destes apenas 16 foram avaliados em ambas as safras. As análises estatísticas foram feitas baseadas em modelos mistos, considerando o efeito de genótipo como aleatório e o efeito de repetição dentro de ambiente como fixo.

2.4. Inferência Bayesiana

A inferência estatística trabalha na presença de observações (y) cujos valores inicialmente incertos são descritos por meio da função de verossimilhança $p(y|\theta)$, que é uma distribuição de probabilidade. A teoria bayesiana foi atribuída postumamente ao reverendo inglês Thomas Bayes (1702-1761) e se fundamenta no Teorema de Bayes (1761).

O Teorema de Bayes propõe que a incerteza de um parâmetro deve ser quantificada em termos de probabilidade, além disso, ele é uma regra para a

atualização de probabilidades, ou seja, em estudos prospectivos o conhecimento *a priori* pode ser considerado como um mecanismo de atualização da informação. A proporcionalidade que representa o Teorema de Bayes é dada por:

$$p(\theta|y) \propto p(y|\theta) p(\theta)$$

em que:

θ é o vetor de parâmetros;

y é o vetor de dados ou de informações obtidas por amostragem;

$p(\theta)$ é a distribuição do parâmetro (θ) independente dos dados (y). É a distribuição *a priori* de θ , que reflete o grau de conhecimento acumulado sobre o θ , antes da observação de y ;

$p(y|\theta)$ corresponde à função de verossimilhança de y que representa a distribuição dos dados (y) dado o parâmetro (θ);

$p(\theta|y)$ é a distribuição *a posteriori*, que representa a distribuição do parâmetro (θ) dado os dados (y); sobre a qual são realizadas as inferências sobre determinado parâmetro de interesse.

Se existe informação *a priori*, a inferência bayesiana pode determinar intervalos de credibilidade mais estreitos que os intervalos de confiança. No entanto, é possível trabalhar com as chamadas distribuições *a priori* não informativas, quando for o caso (NOGUEIRA et al., 2003). A grande vantagem da inferência bayesiana, no contexto dos modelos mistos, é a relativa facilidade de obtenção de desvios-padrão para os elementos de vetores aleatórios a serem preditos (GIANOLA e FOULLEY, 1990). É importante mencionar que as técnicas bayesianas foram abandonadas por muito tempo, por requererem resolução de integrais múltiplas complexas. Contudo, o desenvolvimento do método de integração de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) possibilitou com que as técnicas bayesianas pudessem ser utilizadas. A técnica de gerar valores de uma distribuição de probabilidade é chamada de simulação Monte Carlo, e quando tais valores são gerados sob um processo de cadeias de Markov, tem-se o MCMC.

Os métodos MCMC constituem uma família de processos iterativos para aproximar a geração de amostras de distribuições multivariadas. Estes métodos se tornaram importante ferramenta computacional na estatística bayesiana, uma vez que geram cadeias de Markov, ou seja, cadeias cujos parâmetros estimados na iteração n dependem apenas do parâmetro $n-1$, por meio de simulação Monte Carlo, que gera

valores aleatórios, cuja distribuição estacionária é a própria densidade *a posteriori* de interesse (SORENSEN e GIANOLA, 2002). Desta forma, o método MCMC evita a resolução das integrais complicadas que impediam a utilização da bayesiana.

Os métodos MCMC visam gerar valores das distribuições marginais *a posteriori*, de forma que após a geração de uma grande quantidade desses valores, pode-se assumir que tais distribuições são conhecidas. Os valores das distribuições marginais *a posteriori* são gerados indiretamente por meio de uma nova classe de distribuições, as distribuições condicionais completas *a posteriori* (DCCP).

O amostrador de Gibbs, algoritmo MCMC utilizado quando as DCCPs são conhecidas, se apresenta como uma técnica para a obtenção indireta de variáveis aleatórias de uma distribuição marginal sem, no entanto, necessitar calcular a sua função densidade de probabilidade marginal (CASELA e GEORGE, 1992).

Geman e Geman (1984) definem a amostragem de Gibbs como um método de amostragem condicional alternado definido em termos de subvetores de θ . Cada iteração do amostrador de Gibbs consiste em simular valores de cada subvetor de θ , condicionalmente aos valores de todos os outros subvetores, totalizando k simulações para cada iteração completa do ciclo. Esse tipo de aproximação será tanto melhor quanto maior for o número de amostras utilizadas nos cálculos. Entretanto, as amostras sucessivas são dependentes entre si, o que é indesejável, e por essa razão há um descarte de amostras intermediárias, conhecido por *thin*. Além disso, na etapa de aquecimento da cadeia (*burn-in*), os valores das N primeiras iterações também devem ser descartados. O tamanho da cadeia a ser gerada está relacionado com a convergência das distribuições *a posteriori* dos parâmetros, devendo variar de acordo com os dados e funções utilizadas nas análises.

A inferência bayesiana apresenta diversas vantagens, como por exemplo: propicia soluções precisas para o problema de amostras de tamanho finito, pois para cada conjunto de dados existe uma distribuição *a posteriori* exata para realização de inferências; possibilita a construção de intervalos de credibilidade exatos para as estimativas dos parâmetros genéticos; em geral, apresenta estimativas com menores desvios padrão que o método da Máxima Verossimilhança Restrita (REML); e permite a utilização de informações *a priori*.

Na comparação de modelos em inferência bayesiana, utiliza-se o Critério de Informação dos Desvios (DIC), proposto por Spiegelhalter et al. (2002). O DIC é

baseado na função de distribuição *a posteriori* da estatística dos desvios e pode ser apresentado como segue:

$$DIC = \bar{D} + pV$$

em que: $\bar{D}$ é a média dos desvios do nível do modelo; pV refere-se ao número efetivo de parâmetros do modelo. É dado pela metade da variância *a posteriori* do desvio do nível do modelo, ou seja:

$$pV = var(D)/2.$$

A inferência bayesiana já é bastante utilizada em diversas áreas da ciência, entretanto, em melhoramento de plantas ainda são poucos trabalhos utilizando esta ferramenta, quando comparados com a quantidade de trabalhos em melhoramento animal, por exemplo. No trabalho de Silva et al. (2013), há uma ilustração da utilização da inferência bayesiana no melhoramento de culturas anuais. Foi feita a avaliação genética de dois primeiros ciclos de seleção recorrente em uma população de milho pipoca para produtividade de grãos e capacidade de expansão. Para o primeiro ciclo, uma *priori* não informativa e uma *priori* informativa, baseada em meta-análise, foram utilizadas. Para o segundo ciclo, uma *priori* não informativa e *prioris* informativas definidas como a distribuição *a posteriori* provenientes das análises informativas e não informativas do primeiro ciclo, foram utilizadas. Em relação ao primeiro ciclo, para produtividade de grãos, a utilização da *priori* informativa forneceu resultados claramente distintos dos resultados provenientes da análise com *priori* não informativa. Em relação ao segundo ciclo, os resultados para capacidade de expansão e produtividade de grãos mostraram diferenças entre as três análises. Em milho, Balestre et al. (2012) procuraram obter uma melhor compreensão da herança, extensão e distribuição dos efeitos pleiotrópicos de vários componentes da produção, com o objetivo de identificar *quantitative trait loci* (QTLs) pleiotrópicos utilizando o mapeamento bayesiano de múltiplos intervalos.

Mora e Arnhold (2006) examinaram os valores genéticos e componentes de variância da capacidade de expansão e da produção de grãos por meio de inferência bayesiana e uma abordagem de modelo linear misto em 96 famílias S3 de milho. Os melhores preditores lineares não viciados (BLUP) de efeito de família foram obtidos considerando-se o método de estimação de componentes de variância da máxima verossimilhança residual ou restrita (REML). Um algoritmo de Cadeias de Independência (IC) foi utilizado como um método de inferência bayesiana. Ao

comparar a utilização do algoritmo IC e a abordagem BLUP para os valores genéticos, não foram observadas alterações significativas no ranking de famílias, o que foi confirmado com valores de correlação de Spearman elevados. Os autores concluíram que a inferência bayesiana através de um algoritmo de IC pode ser uma ferramenta importante para uso em melhoramento de milho, como a análise clássica utilizando procedimento de modelo linear misto.

2.5. Referências Bibliográficas

ABDEL-GHANI, A. H.; KUMAR, B.; REYES-MATAMOROS, J.; GONZALEZ-PORTILHA, P. J.; JANSEN, C.; MARTIN, J. P. S.; LEE, M.; LUBBERSTEDT, T. Genotypic variation and relationships between seedlings and adult plant traits in maize (*Zea mays* L.) inbred lines grown under contrasting nitrogen levels. *Euphytica*, v. 189, n.1, p.123-133, 2013.

ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. napier). *Ciência e Agrotecnologia*, v. Edição Especial, p.1643-1651, 2003.

BALESTRE, M.; VON PINHO, R.G.; de SOUZA JUNIOR, C.L.; BUENO FILHO, J.S.S.. *Theoretical and Applied Genetics*, v.125, n.3, p. 479–493, 2012.

BARBER, S.A. Root growth and nutrient uptake. In BOOTE, K.J.; BENNET, J. M.; SINCLAIR, T. R.; PAULSEN, G. M. (Eds.). *Physiology and Determination of Crop Yield*. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1994. p.95-99.

BASSO, C. J.; CERETTA, C. A. Manejo do nitrogênio no milho em sucessão a plantas de cobertura de solo, sob plantio direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 905-915, 2000.

BERNARDO, R. Genetic models for predicting maize performance in unbalanced yield trial data. *Crop Science*, v.35, n.1, p.141-147, 1995.

BERNARDO, R. Best linear unbiased prediction maize single-cross performance. *Crop Science*, v.36, n.4, p.872-874, 1996.

BIROUSTE, M.; ZAMORA-LEDEZMA, E.; BOSSARD, C.; PÉREZ-RAMOS, I. M.; ROUMET, C. Measurement of fine root tissue density: a comparison of three methods reveals the potential of root dry matter content. *Plant Soil*, v. 374, p. 299-313, 2014.

BORDISKY, B.L.; POPP, A.; LOTZE-CAMPEN, H.; DIETRICH, J.P.; ROLINSKI, S.; WEINDL, I.; SCHMITZ, C.; MULLER, C.; BONDSCH, M.; HUMPHENODER, F.; BIEWALD, A.; STEVANOVIC, M. Reactive nitrogen requirements to feed the world in 2050 and potential to mitigate nitrogen pollution. *Nature Communications*, v.5, 2014. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4858>. Acesso em: 04 de nov. de 2016.

CASELA, G.; GEORGE, E. I. Explaining the Gibbs Sampler. *The American Statistician*, v.46, n.3, p.167-174, 1992.

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

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, safra 2015/16, décimo segundo levantamento. Disponível: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf. Acesso em: 05 de nov. de 2016.

COQUE, M.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen remobilization and postsilking nitrogen uptake in maize recombinant inbred lines: heritabilities and correlations among traits. *Crop Science*, v.47, p.1787-1796, 2007.

DORLODOT, S.; FORSTER, B.; PAGÈS, L.; PRICE, A.; TUBEROSA, R. DRAYE, X. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Plant Science*, v.12, p. 1360-1385, 2007.

DUARTE, J.B.; VENCOSKY, R. Estimacão e predicão por modelo linear misto com ênfase na ordenacão de médias de tratamentos genéticos. *Scientia Agrícola*, v.58, n.1, p.109-117, 2001.

EISSENSTAT, D.M.; WELLS, C.E.; YANAI, R.D.; WHITBECK, J.L. Building roots in a changing environment: implications for root longevity. *New Phytologist*, v.147, p.33-42, 2000.

ERISMAN, J. W.; GALLOWAY, J.N.; SEITZINGER, S.; BLEEKER, A.; DISE, N.B.; PETRESCU, A.M.R.; LEACH, A.M.; DE VRIES, W. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, v.368, n.1621, 2013.

FERNANDES, F. C. S.; BUZETTI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 4, n. 2, p. 195-204, 2005.

FORNASIERI FILHO, D. Manual da cultura do milho. Jaboticabal: Funep, 2007. 576p.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 396, p. 295-306, 2004.

GARNETT, T.; CONN, V.; KAISER, B.N. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant, Cell and Environment*, v.32, p.1272-83, 2009.

GEMAN, S.; GEMAN, D. Stochastic relaxation, Gibbs distribution and the Bayesian restoration of images. *Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, v.6, n.6, p.721-741, 1984.

GIANOLA, D.; FOULLEY, J. L. Variance estimation from integrated likelihood (VEIL). *Genetics Selection Evolution*, v. 22, p. 403-417, 1990.

GREGORY, P. J. Root growth and activity. In PETERSON, G. A. (Ed.). *Physiology and Determination of Crop Yield*. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1994. p.65-93.

HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, v. 162, p. 9-24, 2004.

KUMAR, B.; ABDEL-GHANI, A.H.; REYES-MATAMOROS, J.; HOCHHOLDINGER, F.; LUBBERSTEDT, T. Genotypic variation for root architecture traits in seedlings of maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Plant Breeding*, v.131, p.465-478, 2012.

LI, Y. L.; LV, D. B.; WANG, Y. Z.; CHEN, S. J.; TANG, J. H. Study on the genetic diversity of popcorn inbreds and their germplasm relationship with normal corn inbreds using SSR markers. *Maydica*, v.49, p.327-333, 2004.

LIU, J.; CHEN, F.; OLOKHNUUD, C.; GLASS, A.D.M.; TONG, Y.; ZHANG, F.; MI, G. Root size and nitrogen-uptake in two maize (*Zea mays*) inbred lines differing in nitrogen-use efficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v.172, p.230-236, 2009.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F.O.M.; PAIVA, E. Fisiologia da planta de milho. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 27p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 20).

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 390p.

MANAVALAN, L. P.; MUSKET, T.; NGUYEN, H.T. Natural genetic variation for root traits among diversity lines of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, v.56, n.1, p.1707-1717, 2011.

MENDES, F.F.; GUIMARÃES, L.J.M.; SOUZA, J.C.; GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; MACHADO, J.R.A.; MEIRELLES, W.F.; SILVA, A.R.; PARENTONI, S.N. Adaptability and estability of maize varieties using mixed model methodology. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.12, p.111-117, 2012.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, v.74, n.3, p.562-564, 1982.

MORA, F.; ARNHOLD, E. Application of the Bayesian inference and mixed linear model method to maize breeding. *Ciencia e Investigación AGRARIA*, v.33, n.3, p.217-223, 2006.

MÔRO, G.V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J.C.C.; PIMENTEL, M.A. (Ed.). *Milho do plantio a colheita*. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 9-25.

MRODE, R.A. Linear models for the prediction of animal breeding values. Guildford: CAB International, 1996. 187p.

MU, X.; CHEN, F.; WU, Q.; CHEN, Q.; WANG, J.; YUAN, L.; MI, G. Genetic improvement of root growth increases maize yield via enhanced post-silking nitrogen uptake. *European Journal of Agronomy*, v.63, p.55-61, 2015.

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

NOGUEIRA, D.A.; SÁFADI, T.; BEARZOTI, E.; BUENO FILHO, J.S.S. Análise clássica e bayesiana de um modelo misto aplicado ao melhoramento animal: uma ilustração. *Ciência e Agrotecnologia*, v. Edição Especial, p.1614-1624, 2003.

PATERNIANI, E. Importância do milho na agroindústria. In: OSUNA, J.A.; MORO, J.R. (Ed.). *Produção e melhoramento do milho*. Jaboticabal: Funep, 1995. p.1-11.

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

RAUN, W.R.; JOHNSON, G.V.; PHILLIPS, S.B.; WESTERMAN, R.L. Effect of long-term N fertilization on soil organic C and total N in continuous wheat under conventional tillage in Oklahoma. *Soil Tillage*, v. 47, p. 323-330, 1999.

RESENDE, M.D.V.; DUDA, L.L.; GUIMARÃES, P.R.B.; FERNANDES, J.S.C. Mixed linear models analysis using Bayesian inference. *Revista de Matemática e Estatística*, v.19, p.41-70, 2001.

RESENDE, M.D.V. Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 975p.

RYSER, P. The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. *Functional Ecology*, v. 10, p. 717-723, 1996.

RYSER, P.; LAMBERS, H. Root and leaf attributes accounting for the performance of fast and slow-growing grasses at different nutrient supply. *Plant Soil*, v. 170, p.251-265, 1995.

SILVA, F.F.; VIANA, J.M.S.; FARIA, V.R.; RESENDE, M.D.V. Bayesian inference of mixed models in quantitative genetics of crop species. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 126, p.1749-1761, 2013.

SORENSEN, D. A.; GIANOLA, D. Likelihood, Bayesian and MCMC methods in quantitative genetics: statistics for biology and health. New York: Springer-Verlag, 2002. 740p.

SPIEGELHALTER, D. J.; BEST, N.G.; CARLIN B.P.; VAN DER LINDE, A. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society*, v.64, p.583–640, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2010. 842 p.

TIAN, Q.Y.; CHEN, F.J.; ZHANG, F.S.; MI, G.H. Genotypic difference in nitrogen acquisition ability in maize plants is related to the coordination of leaf and root growth. *Journal Plant Nutrition*, v.29, p.317-330, 2006.

TJOELKER, M.G.; CRAINE, J.M.; WEDIN, D.; REICH, P.B.; TILMAN, D. Linking leaf and root trait syndromes among 39 grasslands and savannah species. *New Phytologist*, v.167, p. 493-508, 2005.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). Fertilizer Use and Price. Dezembro de 2013, última atualização Outubro de 2016. Disponível: <http://www.ers.usda.gov/data-products/fertilizer-use-and-price/fertilizer-use-and-price/#>A single Excel workbook with all tables in multiple worksheets Acesso em: 05 de novembro de 2016

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). World Agriculture Production. Office of Global Analysis, FAS, USDA, Outubro de 2016. Disponível: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>> Acesso em: 05 de novembro de 2016.

VIANA, J.M.S.; SOBREIRA, F.M.; RESENDE, M.D.V.; FARIA, V.R. Multi-trait BLUP in half-sib selection of annual crops. *Plant Breeding*, v.129, p.599-604, 2010.

WAHL, S.; RYSER, P. Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist*, v.148, p. 459-471, 2000.

WHITE, T.L.; HODGE, G.R. Predicting breeding values with applications in forest tree improvement. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. 363 p.

WORKU, M.; BAZINGER, M.; SCHULTE, G.; FRIESEN, D.; DIALLO, A.O.; HORST, W.J. Nitrogen uptake and utilization in contrasting nitrogen efficient tropical maize hybrids. *Crop Science*, v.47, p. 519-528, 2007.

YORK, L.M.; GALINDO-CASTAÑEDA, T.; SCHUSSLER, J.R.; LYNCH, J.P. Evolution of US maize (*Zea mays* L.) root architectural and anatomical phenes over the past 100 years corresponds to increased tolerance of nitrogen stress. *Journal of Experimental Botany*, v.66, n.8, p.2347-2358, 2015.

ZHAN, A.; LYNCH, J.P. Reduced frequency of lateral root branching improves N capture from low-N soils in maize. *Journal of Experimental Botany*, v.66, n.7, p.2055-2065, 2015.

3. Capítulo 1:

Variabilidade genética para morfologia de raiz em um painel de linhagens de milho tropical avaliadas em condições contrastantes de nitrogênio

Resumo - Uma das estratégias para aumentar a eficiência no uso de nitrogênio (N) é por meio do melhoramento genético para caracteres de morfologia de raiz. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um painel de 150 linhagens de milho tropical para morfologia radicular e parte aérea em condições contrastantes de N. Para isso, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, um em alto e outro em baixo N. No estágio de cinco folhas completamente desenvolvidas, os seguintes caracteres foram avaliados: altura de planta, diâmetro do colmo, massa de raiz, parte aérea e total secas, relação raiz:parte aérea, crescimento diário, comprimento radicular axial, lateral e total, diâmetro radicular médio, área superficial radicular, volume radicular e densidade do tecido radicular. Utilizou-se a metodologia de modelos mistos para prever os valores genéticos das linhagens. Nas análises de diversidade genética, empregou-se a distância euclidiana média padronizada e o método de agrupamento de ligação média entre grupos (UPGMA). O efeito de linhagem foi significativo ($P < 0,01$) para todos os caracteres pelas análises conjunta e individuais. Quanto à interação linhagens x ambientes, observou-se efeito significativo ($P < 0,05$) para massa de parte aérea seca e massa total seca. Foram estimadas correlações simples e canônicas, indicando que caracteres de raiz estão associados aos de parte aérea. A partir das análises de diversidade genética, as linhagens foram divididas em 12 e 15 grupos nos ambientes de alto e baixo N, respectivamente. Linhagens superiores foram identificadas e as informações sobre a diversidade genética do painel de linhagens contribuirá para a orientação e planejamento de cruzamentos.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; sistema radicular; modelos mistos; diversidade genética.

Genetic variability for root morphology in a panel of tropical maize inbred lines evaluated in contrasting nitrogen conditions

Abstract - One of the strategies to increase the nitrogen (N) use efficiency in maize is through the genetic improvement for root morphology traits. The objective of this study was to characterize a panel of 150 tropical maize inbred lines for root morphology and shoot traits in contrasting N conditions. Two experiments were conducted in a greenhouse, one at high and the other at low N. At the stage of five fully developed leaves, the following traits were evaluated: plant height, shoot diameter, root, shoot and total dry weight, root:shoot ratio, daily growth, axial, lateral and total root length, root average diameter, root surface area, root volume and root tissue density. Mixed models methodology was used to predict the genetic values of the inbred lines. In the genetic diversity analyzes, the mean standardized Euclidean distance and the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) was used. The inbred line effect was significant ($P<0.01$) for all traits by the joint and individual analyzes. Regarding the genotypes x environments interaction, a significant effect ($P<0.05$) was observed to the shoot dry weight and the total dry weight. Simple and canonical correlations were estimated, indicating that root traits are associated with aboveground traits. From the genetic diversity analyzes, the inbred lines were divided into 12 and 15 groups at high and low N condition, respectively. Superior inbred lines have been identified and the information about the genetic diversity of the maize inbred line panel will contribute to the orientation and planning of crosses.

Keywords: *Zea mays* L.; root system; mixed models; genetic diversity.

3.1. Introdução

Extensivas áreas de plantio de milho no mundo são cultivadas em condições de solos tropicais, nos quais predominam a ocorrência de seca e de baixa fertilidade natural, principalmente de nitrogênio (N). O N é o nutriente extraído em maior quantidade pela cultura do milho (COELHO e FRANÇA, 1995). Assim, para atender demanda nutricional da planta de milho, estima-se que 90 milhões de toneladas de N são adicionados ao solo anualmente (GOOD et al., 2004). Entretanto, a eficiência no uso de N no milho não ultrapassa os 50% (RAUN et al., 1999). Segundo esses autores, a lixiviação de nitrato, a volatilização da amônia, a denitrificação e a competição com a microbiota do solo são fatores que fazem com que a eficiência de uso de N seja baixa. Além disso, a aplicação de fertilizantes nitrogenados em excesso tem sido apontada como causa de impactos ambientais (ERISMAN et al., 2013; BODIRSKY et al., 2014).

A eficiência no uso de N, definida como produtividade de grãos por unidade de N disponível à planta no solo, é composta pelas eficiências na absorção e utilização de N (MOLL et al., 1982). Segundo Gallais e Hirel (2004), os genes responsáveis pelo controle da eficiência no uso de N são expressos de acordo com a disponibilidade de N à planta e, conseqüentemente, a magnitude da variabilidade genética é manifestada diferentemente nos ambientes contrastantes. Cultivares de milho mais eficientes no uso de N podem ser obtidos por meio do melhoramento genético para eficiência na absorção e ou utilização de N (HIREL et al., 2001; GALLAIS e HIREL, 2004). Dentre as estratégias para melhorar a eficiência no uso de N em milho e a produtividade de grãos, destaca-se a utilização de genótipos com sistemas radiculares superiores que proporcionem uma maior eficiência na absorção de N do solo (HODGE, 2004). Diversos estudos relatam que a extensão e a natureza da variação da arquitetura radicular têm substancial implicação na melhoria da eficiência do uso de nutrientes e água nas culturas, e está relacionada ao aumento da produtividade em condições de estresse abiótico (CHUN et al., 2005; TIAN et al., 2006; DORLODOT et al., 2007; GARNETT et al., 2009). Liu et al. (2009) avaliaram duas linhagens de milho contrastantes para eficiência no uso de N, em condições de campo, em níveis de alto e baixo N. Segundos esses autores, linhagens com maior comprimento total de raiz, massa de raiz seca e alta razão massa raiz: parte aérea são

mais responsivas (produzem mais em condições limitantes do nutriente) à deficiência de N.

Mu et al. (2015) avaliaram a contribuição da melhoria em crescimento radicular para a eficiência na aquisição de N e produção de grãos sob dois níveis de N em um experimento de campo de três anos. Os autores usaram dois testcrosses quase isogênicos de milho, T-213 (raiz grande) e T-Wu312 (raiz pequena), derivado de um retrocruzamento de uma população BC₄F₃ de dois pais com tamanhos de raiz contrastantes. Constatou-se que o aumento global do crescimento radicular em T-213 está relacionado ao aumento da absorção de N pós-florescimento; o qual foi associado com aumento de produtividade de grãos em condições de estresse e normal de N.

York et al. (2015) investigaram a hipótese de que, nos últimos 100 anos, por meio da seleção indireta, o sistema radicular do milho evoluiu para fenótipos mais adequados à competição intensa por N. Os autores avaliaram dezesseis cultivares de milho que representam variedades de sucesso comercial no último século em dois níveis de N e em três densidades de plantio. Com o intuito de simplificar a interpretação dos dados, as dezesseis variedades foram divididas em quatro grupos (denominados “eras”) com quatro variedades cada. Os sistemas radiculares de materiais mais recentes comparados com os mais antigos apresentaram-se mais superficiais, além de outras mudanças em arquitetura e anatomia de raiz.

Em um programa de melhoramento, a caracterização fenotípica e o estudo da diversidade genética do germoplasma é o primeiro passo para o conhecimento da magnitude dos parâmetros genéticos, essenciais ao trabalho do melhorista de plantas. Além disso, o conhecimento da diversidade genética entre as linhagens pode ser útil para a orientação de cruzamentos visando a obtenção de híbridos superiores. A heterose é dada pelo quadrado da diferença entre as frequências alélicas nas linhagens envolvidas no cruzamento multiplicado pelo valor genotípico do heterozigoto, associado ao efeito de dominância (FALCONER e MACKAY, 1996).

Manavalan et al. (2011) caracterizaram 26 linhagens de milho em casa de vegetação, em condições não estressantes, para caracteres de arquitetura de raiz e parte aérea. Os caracteres foram mensurados no 30º dia após a semeadura. Análises de agrupamento foram conduzidas para identificar grupos de genótipos para comprimento de raiz e de parte aérea, em ambas as análises foram formados três

grupos. Kumar et al. (2012) avaliaram a magnitude da variabilidade genética para caracteres de raiz de um painel de 74 linhagens de milho nos estádios de 6, 10 e 14 dias. A análise de agrupamento alocou as linhagens em dois grupos, o primeiro grupo composto por duas linhagens apenas, enquanto o segundo grupo incluiu todas as demais. O segundo grupo foi dividido em dois subgrupos. Em seu trabalho, eles afirmaram que, em geral, agrupamento de linhagens com base em morfologia das raízes não foi consistente com o “background” genético e origem das linhagens de milho. Ao nosso conhecimento, há poucos trabalhos na literatura sobre diversidade genética de painéis de linhagens envolvendo caracteres de morfologia de raiz, avaliados em condições contrastantes de N, principalmente com linhagens de milho tropical.

Diante do exposto, a principal proposta desse trabalho foi caracterizar a variação genética de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea em estágio de plântulas, em condições contrastantes de N, entre 150 linhagens endogâmicas de milho tropical. Os objetivos específicos foram: (i) quantificar a variabilidade genética entre as linhagens em condições contrastantes de N; (ii) estimar as correlações entre os vetores de valores genéticos dos caracteres avaliados em condições contrastantes de N; (iii) identificar caracteres secundários com potencial para serem empregados na seleção de linhagens de milho superiores para morfologia de raiz; (iv) avaliar a diversidade genética entre as linhagens de milho tropical em relação à morfologia de raiz e arquitetura de plântula em condições contrastantes de N; e (v) identificar linhagens de milho tropical superiores para caracteres de raiz em condições contrastantes de N.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Material Genético

Foram utilizadas 150 linhagens endogâmicas de milho tropical oriundas do Banco Ativo de Germoplasma do Programa Milho[®], Programa de Melhoramento de Milho da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia. As 150 linhagens foram selecionadas com base em suas origens, seu desempenho '*per se*' para caracteres agronômicos de arquitetura de planta e produção de grãos. Elas foram extraídas de diferentes fontes de germoplasma de milho, como híbridos comerciais, populações melhoradas e variedades de polinização aberta. Elas são resultantes de

pelo menos oito gerações de autofecundação e, em teoria, aproximadamente todos os locos encontram-se em homozigose.

3.2.2. Caracterização e Avaliação das Linhagens

Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação localizada no Campo Experimental Diogo Alves de Melo, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (latitude 20°46'S; longitude 42°52'W; 640 metros de altitude). Um experimento foi conduzindo em condição de alto N e o outro em condição de baixo N. Em cada experimento foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com três repetições realizadas no tempo. As datas de plantio da primeira, segunda e terceira repetição foram 09 de março, 28 de abril e 20 de junho de 2016, respectivamente. As plantas foram coletadas no estágio vegetativo de cinco folhas completamente expandidas (V5), aproximadamente 35 dias após o plantio. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso de polietileno com as seguintes dimensões: 0,15 m de diâmetro, 0,50 m de altura e volume de 9,00 dm³, preenchido com substrato constituído por areia lavada e vermiculita inerte numa proporção de 3:1. Cada vaso continha uma planta. Dez dias após a semeadura, as plântulas passaram a ser adubadas com 0,3 litros de solução nutritiva em intervalos de dois dias. Nos dias em que não foi fornecida solução nutritiva, as plantas foram irrigadas com água deionizada, e a umidade mantida próxima da capacidade de campo. A solução nutritiva utilizada foi adaptada à descrita por Chun et al. (2005). A solução nutritiva em alto nível de N continha (em mmol L⁻¹): 8,0 Ca(NO₃)₂, 3,0 K₂SO₄, 0,65 MgSO₄, 0,4KCl, 1,0 KH₂PO₄, 4x10⁻³ H₃BO₃, 4x10⁻³ MnSO₄, 4x10⁻⁴ CuSO₄, 4x10⁻³ ZnSO₄, 2x10⁻⁵ (NH₄)₆Mo₇O₂₄, e 0,4 Fe-EDTA. A solução que foi fornecida ao experimento de baixo N, continha dez vezes menos nitrogênio (0,8 mmol L⁻¹ de Ca(NO₃)₂) e a concentração de cálcio foi compensada pela adição de CaCl₂. Para os demais nutrientes, a concentração foi igual à solução que foi fornecida ao experimento de alto N.

No momento da coleta, as plântulas foram cortadas ao nível do substrato, e as raízes foram separadas da parte aérea, e essas acondicionadas separadamente em sacos de papel e colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 70°C por 72 horas. A parte radicular foi lavada e estocada em solução de água e álcool (3:1) para posterior análise de imagem. Os seguintes caracteres foram avaliados: altura de

planta (ALT, cm), diâmetro do colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa da parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR, mg mg⁻¹), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm²), volume radicular (VOL, cm³) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm⁻³).

As raízes foram avaliadas utilizando-se o software WinRHIZO Pro 2009a (Basic, Reg, Pro & Arabidopsis for Root Measurement), acoplado ao scanner EPSON Perfetion V700/V750 equipado com luz adicional de acordo com os procedimentos sugeridos por Bouma et al. (2000). Para facilitar o processo de caracterização das linhagens, Trachsel et al. (2009), em trabalho realizado com milho, propuseram a simplificação das dez classes de diâmetro fornecidas pelo WinRHIZO Pro 2009a em apenas duas. Assim, fragmentos de raiz com diâmetro inferior a 0,5 mm são classificadas como raiz lateral e fragmentos com diâmetro superior a 0,5 mm como raiz axial. Após a avaliação do sistema radicular, as raízes foram secadas em estufa a 70°C por 72 horas para a obtenção da massa de raiz seca. Além da massa da parte aérea e raiz secas, também foram calculados a massa total seca, a razão raiz:parte aérea e a densidade do tecido radicular. A densidade do tecido radicular foi obtida pela razão entre a massa de raiz seca pelo volume radicular (BIROUSTE et al., 2014).

3.2.3. Análises Estatísticas

Para a realização das análises estatísticas foi adotada a metodologia de modelos mistos via REML/BLUP, a qual combina o procedimento de predição de valores genéticos de médias BLUP (melhor predição linear não-viesada) com o procedimento de estimação de componentes de variância REML (máxima verossimilhança residual ou restrita), associados a um modelo linear misto, que é um modelo que contém efeitos fixos além da média geral e efeitos aleatórios além do erro experimental. Esta metodologia tem se mostrado adequada quando se dispõe de experimentos não balanceados, como foi o caso do presente estudo, em que houve a perda de sete parcelas.

Para análise conjunta dos experimentos (alto e baixo N), foi adotado o seguinte modelo estatístico: $y = Xr + Zg + Wi + e$, em que: y , r , g , i e e : são vetores de observações, de efeitos de ambientes (níveis de N) e blocos (assumidos como fixos) somados à média geral, de efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), de efeitos da interação genótipos x ambientes (aleatórios) e de erros (aleatórios), respectivamente. X , Z e W : são matrizes de incidência para os efeitos de r , g e i , respectivamente.

Para cada nível de N (experimento individual), foi adotado o seguinte modelo estatístico: $y = Xr + Zg + e$, em que: y , r , g e e : são vetores de observações, de efeitos de blocos (assumidos como fixos) somados à média geral, de efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios) e de erros (aleatórios), respectivamente. X e Z são matrizes de incidência para os efeitos r e g , respectivamente.

Na análise de modelos mistos, os efeitos aleatórios do modelo não são testados via testes F, como é feito na metodologia de análise de variância. Nesse caso, para os efeitos aleatórios, o teste recomendado é o teste da razão de verossimilhança (TRV), por meio da análise de deviance (ANADEV). Os modelos foram comparados pela diferença entre os logaritmos do ponto máximo da função de verossimilhança residual (Log L) dos modelos completo e restrito (sem o efeito a ser testado). A deviance de cada modelo foi calculada da seguinte maneira: $D = -2 \log L$. A estimativa TRV foi obtida pela expressão:

$$TRV_{ij} = 2 (\log L_i - \log L_j)$$

em que: $\log L_i$ = função de verossimilhança para o modelo completo i ; $\log L_j$ = função de verossimilhança para o modelo reduzido j . O TRV permite a comparação de modelos com diferentes efeitos aleatórios, porém com uma mesma estrutura de efeitos fixos.

A estimativa TRV foi calculada e comparada pelo teste do qui-quadrado tabelado, com n graus de liberdade e níveis de significância de 1% e 5%, em que n é a diferença entre o número de parâmetros dos modelos completo e restrito. Se o TRV_{ij} for superior ao qui-quadrado tabelado, a variável incluída no modelo completo teria efeito significativo. A hipótese de nulidade testada foi de que os modelos não diferiram entre si. No presente trabalho, a significância dos efeitos aleatórios foi testada via TRV utilizando o teste qui-quadrado com um grau de liberdade.

As estimativas de herdabilidade ao nível de média de genótipos, nas análises dos ambientes individuais e conjunta, respectivamente, foram calculadas pelas seguintes expressões:

$$\hat{h}_{\bar{x}}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \frac{\hat{\sigma}^2}{r}} \text{ e } \hat{h}_{\bar{x}}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \frac{\hat{\sigma}_{ga}^2}{a} + \frac{\hat{\sigma}^2}{ra}},$$

em que $\hat{h}_{\bar{x}}^2$ é a estimativa de herdabilidade ao nível de média de genótipos, $\hat{\sigma}_g^2$, $\hat{\sigma}_{ga}^2$ e $\hat{\sigma}^2$ são as estimativas da variância genética, devido às interações genótipos x ambientes e ao erro aleatório, respectivamente. r e a referem-se ao número de repetições e ambientes, respectivamente.

As análises estatísticas pela metodologia REML/BLUP foram realizadas com auxílio do pacote “lme4” implementado no software R (R Development Core Team, 2015) e pelo software Selegen-REML/BLUP (RESENDE, 2007).

Em ambos os níveis de N, foi estimada a matriz dos coeficientes de correlação de Pearson entre vetores de valores genéticos dos caracteres avaliados, e também foi estimada a correlação de Spearman entre ambientes para cada caractere.

Foi realizado o diagnóstico de multicolinearidade para os experimentos com o intuito de identificar possíveis relações lineares entre linhas ou colunas da matriz de correlação residual (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Esses autores relatam que, se houver colinearidade em níveis de moderados a severos, as estimativas dos parâmetros podem assumir valores incoerentes com o fenômeno biológico estudado. Devido à colinearidade severa detectada, baseada na classificação proposta por Montgomery e Peck (2001), alguns dos caracteres foram descartados para que fosse possível a continuidade das análises estatísticas de correlações canônicas e de diversidade genética. Os critérios utilizados para o descarte dos caracteres foram: os caracteres de maior peso nos últimos autovetores e a importância prática dos caracteres para o presente estudo. Os mesmos caracteres foram eliminados nos dois experimentos, a fim de que fosse possível comparar os dendogramas de cada ambiente, oriundos das análises de diversidade genética.

Para a análise de correlações canônicas foram estabelecidos dois grupos: grupo I: caracteres de raiz e grupo II: caracteres de parte aérea, com a finalidade de verificar se existe a relação entre caracteres de raiz e de parte aérea em plântulas de linhagens de milho tropical, para níveis contrastantes de N.

Na quantificação da diversidade genética entre as 150 linhagens de milho utilizou-se o método de agrupamento da ligação média entre grupos (UPGMA) com base na matriz de dissimilaridade genética obtida pela distância euclidiana média padronizada a partir das médias BLUP. A padronização dos dados foi feita com o intuito de evitar que as unidades escolhidas para medir os caracteres afetassem a similaridade entre os indivíduos e também para que os caracteres contribuíssem igualmente na avaliação da similaridade entre os indivíduos (CRUZ et al., 2011). Nesse caso, é recomendável o cálculo das distâncias utilizando-se os valores padronizados. O valor padronizado é calculado da seguinte forma:

$$y_j = \frac{Y_j}{\hat{\sigma}_j}$$

em que o $\hat{\sigma}_j$ é o desvio-padrão associado ao j-ésimo caractere.

A distância euclidiana média é dada por:

$$d_{ii'} = \sqrt{\frac{1}{v} \sum_j (Y_{ij} - Y_{i'j})^2}$$

em que v é o número de caracteres considerados, e i representando os genótipos e j os caracteres.

O método de agrupamento da ligação média entre grupos (UPGMA) (SOKAL e MICHENER, 1958) consiste em uma técnica de agrupamento que utiliza médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, evitando-se utilizar valores extremos, como mínimo e máximo, entre os grupos considerados. A determinação do número de grupos foi estabelecida pelo método de Mojena (1977), que é um procedimento baseado no tamanho relativo dos níveis de fusões no dendograma. O valor referencial de corte é dado por:

$$\theta_k = \bar{\alpha} + k\hat{\sigma}_\alpha$$

sendo $\bar{\alpha}$ e $\hat{\sigma}_\alpha$ a média e o desvio-padrão dos valores de α , respectivamente, α_j o valor de distâncias dos níveis de fusão correspondentes ao estágio j, e k uma constante. Este método consiste em selecionar um número de grupos no estágio j que satisfizer a seguinte condição: $\alpha_j > \theta_k$. Adotou-se o valor da constante k = 1,25 como valor para a definição do número de grupos, como sugerido por Milligan e Cooper (1985).

A diversidade genética entre as linhagens foi estimada nos seguintes cenários: i) alto N, ii) baixo N e iii) análise conjunta desconsiderando os efeitos da interação, para que a diferença entre os agrupamentos pudesse ser comparada. As análises de

diversidade genética e construção dos dendogramas foram realizadas com auxílio do pacote *ape*, implementado no software R (R Development Core Team, 2015).

A contribuição relativa dos caracteres para divergência genética foi estimada por meio do critério proposto por Singh (1981), utilizando o software GENES (CRUZ, 2013). No entanto, é importante mencionar que essa estimativa é calculada com as distâncias médias não padronizadas. A consistência do agrupamento foi avaliada pelo coeficiente de correlação cofenética, segundo Sokal e Rohlf (1962) quanto maior o valor da correlação cofenética, menor será a distorção provocada pelo agrupamento.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Amplitude e média de valores genotípicos

Houve efeito de ambiente (nível de N) significativo ($P < 0,05$) para quase todos os caracteres, com exceção de DIAM, VOL e CRL. O estresse por N ocasionou redução no valor genotípico médio da maioria dos caracteres, com exceção de MRS, RSR, DRM e DTR (Tabela 1). A deficiência de N resultou em aumento nas médias de MRS (5,62%), RSR (45,45%), DRM (4,0%) e DTR (15,83%) em relação ao alto N. Para os demais caracteres, a deficiência de N resultou em redução em suas médias, com a porcentagem de redução variando de 6,75% (CRA) a 27,98% (MPAS). Li et al. (2015) avaliaram 218 linhagens recombinantes de milho (RILs) para caracteres de raiz com condições de alto e baixo N e encontraram um aumento para RSR de 53% em baixo N. Em trabalho com duas linhagens de milho contrastantes para eficiência no uso de N, Liu et al. (2009) encontraram que a linhagem mais responsiva à deficiência de N foi a que possuía maior comprimento total de raiz, massa de raiz seca e alta razão massa raiz: parte aérea na condição de estresse. Segundo Chun et al. (2005), uma maior RSR pode ser uma resposta adaptativa que conserva o N da planta enquanto ela maximiza a capacidade de absorver mais N do solo. Além disso, os autores destacam que o desenvolvimento radicular em estresse de N depende da alocação de carbono da parte aérea para raiz.

Em relação à DTR foi observado, em geral, tecidos radiculares menos densos em alto N (Tabela 1). Alguns estudos demonstraram que tecidos menos densos permitem uma relativa taxa de crescimento rápida e uma rápida aquisição de recursos enquanto a planta se desenvolve com um baixo investimento em matéria seca

(RYSER 1996; RYSER e LAMBERS 1995; WAHL e RYSER 2000; BIROUSTE et al., 2014). Entretanto, esses tecidos tendem a ter um curto prazo de vida e são usualmente mais vulneráveis à herbivoria e patógenos comparados com tecidos mais densos (TJOELKER et al., 2005; BIROUSTE et al., 2014). Segundo Eissenstat et al. (2000), a longevidade das raízes está negativamente correlacionada com a concentração de N, taxas de respiração específicas e comprimento específico da raiz.

Em relação aos valores genotípicos máximos e mínimos dos caracteres, CRT foi um dos caracteres que apresentou maior amplitude, ele variou de 2499,68 a 4600,94 cm e de 2926,78 a 5094,02 cm em baixo e alto N, respectivamente. A RSR também variou consideravelmente, no ambiente de alto N de 0,14 a 0,54 mg mg⁻¹ e em baixo N de 0,25 a 0,49 mg mg⁻¹. A MRS variou de 275,71 a 913,74 mg em baixo N e 236,95 a 733,24 mg em alto N; enquanto que para a MPAS as amplitudes foram de 822,17 a 2668,67 mg e 1065,30 a 3716,34 mg em baixo e alto N, respectivamente. Em baixo N, RSR e MPAS foram os caracteres que apresentaram coeficientes de variação (CV) mais elevados, de 44,67% e 30,29%, respectivamente. Em alto N, RSR e MRS apresentaram CV mais altos em relação aos demais caracteres, de 37,25% e 31,34%, respectivamente. Os demais caracteres apresentaram CV de intermediários para baixos, para estudos dessa natureza (LI et al., 2015; MUNDIM et al., 2013, KUMAR et al., 2012). Em relação ao estresse de N, os CV foram muito semelhantes entre os dois níveis de N.

Tabela 1 Valores genotípicos mínimo, média e máximo, coeficiente de variação e porcentagem de redução da média dos caracteres altura de planta (ALT, cm), diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR mg mg⁻¹), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm²), volume radicular (VOL, cm³) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm⁻³) avaliados em um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical nos ambientes de baixo e alto nitrogênio.

Caracteres	Baixo nitrogênio				Alto nitrogênio				% de redução da média ^{2/}
	Mín.	Média	Máx.	CV(%) ^{1/}	Mín.	Média	Máx.	CV(%) ^{1/}	
ALT (cm)	11,63	18,00	24,78	12,13	11,03	19,69	28,95	10,43	-8,58
DIAM (mm)	6,17	8,04	10,23	10,33	6,30	9,31	11,90	9,75	- ^{3/}
MRS (mg)	275,71	468,47	913,74	28,68	236,95	443,53	733,24	31,34	5,62
MPAS (mg)	822,17	1511,73	2668,67	30,29	1065,30	2098,93	3716,34	28,61	-27,98
MTS (mg)	1102,50	1980,20	3607,84	27,61	1319,30	2542,47	4365,20	27,06	-22,12
RSR (mg mg ⁻¹)	0,25	0,32	0,49	44,67	0,14	0,22	0,54	37,25	45,45
CD (cm)	0,40	0,55	0,72	12,20	0,43	0,65	0,88	10,19	-15,38
CRL (cm)	1815,42	2346,78	3282,55	26,68	2154,78	2804,87	3644,15	27,26	-
CRA (cm)	627,81	938,63	1495,12	18,77	792,34	1006,60	1434,41	19,74	-6,75
CRT (cm)	2499,68	3286,26	4600,94	23,40	2926,78	3812,88	5094,02	24,17	-13,81
DRM (mm)	0,43	0,52	0,59	9,17	0,43	0,50	0,55	8,74	4,00
ASR (cm ²)	344,07	530,17	842,69	20,65	431,36	597,61	865,99	21,60	-11,28
VOL (cm ³)	3,61	6,91	12,04	22,90	4,94	7,56	11,50	23,44	-
DTR (mg cm ⁻³)	56,74	66,29	77,76	15,01	44,58	57,23	73,53	19,77	15,83

^{1/} CV(%): coeficiente de variação residual, calculado em porcentagem, dividindo-se o desvio-padrão da variância residual pela média fenotípica de cada caractere. ^{2/}% de redução da média = $\frac{[(\overline{BN} - \overline{AN})]}{\overline{AN}} \times 100\%$; $\overline{AN}$ e $\overline{BN}$ são as médias genotípicas nos ambientes de alto e baixo N, respectivamente. ^{3/}"-" para caracteres em que não foi observado efeito de ambiente (nível de N) significativo ($P < 0,05$) no teste F.

3.3.2. Estimativas de componentes de variância, herdabilidade e acurácia

Sabe-se que a variabilidade genética é essencial para o melhoramento genético de espécies e este painel de 150 linhagens de milho tropical apresentou variabilidade genética e grande potencial para seleção e obtenção de ganhos genéticos. O efeito de linhagem foi significativo ($P<0,01$) para todos os caracteres avaliados pela análise conjunta e pelas análises individuais em cada nível de N. Quanto aos efeitos da interação genótipos x ambientes (linhagens x doses de N), observou-se efeito significativo ($P<0,05$) apenas para os caracteres MPAS e MTS. Em relação às estimativas de herdabilidade a nível de média de genótipos, todos os caracteres apresentaram herdabilidades superiores a 0,50, com exceção da RSR em baixo N (Tabela 2). Foi observado para maioria dos caracteres, estimativas de variância genética e herdabilidade menores no ambiente de baixo N, o que também foi relatado por Coque e Gallais (2006). De maneira geral, genótipos exibem maior variabilidade genética em ambientes que proporcionam condições favoráveis ao seu desenvolvimento, pois esses possibilitam a expressão máxima de seu potencial (CRUZ et al., 2011).

Os valores genéticos para os caracteres avaliados foram preditos com alta acurácia. De acordo com Resende e Duarte (2007), valores de acurácia entre 0,70 e 0,90 são classificados como de alta precisão e valores acima de 0,90 de precisão muito alta. Com exceção do caractere RSR em baixo nitrogênio (0,59), os demais foram preditos com acurácias acima de 0,70, variando de 0,73 a 0,92 (Tabela 2). É interessante notar que as acurácias da análise conjunta foram superiores às das análises individuais, o que é esperado em razão da análise conjunta envolver uma maior quantidade de informações.

Tabela 2 Estimativas de parâmetros genéticos para os caracteres altura de planta (ALT, cm), diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR mg mg⁻¹), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm²), volume radicular (VOL, cm³) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm⁻³) avaliados em um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical nos ambientes de baixo e alto nitrogênio.

Caracteres ^{1/}	Baixo nitrogênio			Alto nitrogênio			Análise conjunta			
	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{h}_{\bar{x}}^2$	AC	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{h}_{\bar{x}}^2$	AC	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_{ga}^2$	$\hat{h}_{\bar{x}}^2$	AC
ALT (cm)	7,18**	0,82	0,90	8,15**	0,85	0,92	7,73**	5,50x10 ^{-2ns}	0,91	0,95
DIAM (mm)	7,19x10 ^{-1**}	0,74	0,86	1,53**	0,84	0,91	1,11**	4,88x10 ^{-2ns}	0,87	0,93
MRS (mg)	13755,95**	0,68	0,83	13211,10**	0,65	0,81	13228,17**	335,13 ^{ns}	0,79	0,89
MPAS (mg)	146303,47**	0,71	0,84	325440,47**	0,78	0,89	210507,44**	25027,47*	0,81	0,90
MTS (mg)	223733,89**	0,71	0,84	448459,10**	0,78	0,88	302749,91**	32490,00*	0,81	0,90
RSR (mg mg ⁻¹)	5,10x10 ^{-3**}	0,34	0,59	5,29x10 ^{-3**}	0,59	0,77	5,36x10 ^{-3**}	2,18x10 ^{-4ns}	0,61	0,78
CD (cm)	4,14x10 ^{-3**}	0,78	0,88	4,67x10 ^{-3**}	0,82	0,90	4,43x10 ^{-3**}	4,40x10 ^{-5ns}	0,89	0,94
CRL (cm)	127951,64**	0,54	0,73	154458,28**	0,56	0,75	120391,25**	19499,6 ^{ns}	0,64	0,80
CRA (cm)	24219,37**	0,71	0,84	19458,89**	0,65	0,81	20632,10**	1037,63 ^{ns}	0,79	0,89
CRT (cm)	241269,11**	0,58	0,76	275591,00**	0,59	0,77	225536,63**	30270,87 ^{ns}	0,68	0,82
DRM (mm)	1,18x10 ^{-3**}	0,60	0,77	9,02x10 ^{-4**}	0,55	0,74	1,06x10 ^{-3**}	2,70x10 ^{-5ns}	0,73	0,85
ASR (cm ²)	9321,12**	0,71	0,84	8879,40**	0,67	0,82	8473,73**	518,49 ^{ns}	0,79	0,89
VOL (cm ³)	2,50**	0,75	0,87	1,97**	0,68	0,82	2,20**	4,21x10 ^{-2ns}	0,83	0,91
DTR (mg cm ⁻³)	42,35**	0,54	0,74	63,56**	0,54	0,74	53,06**	1,71 ^{ns}	0,70	0,84

^{1/} $\hat{\sigma}_g^2$: estimativa da variância genotípica; $\hat{\sigma}_{ga}^2$: estimativa da variância da interação genótipos x ambientes; $\hat{h}_{\bar{x}}^2$: estimativa da herdabilidade a nível de média de genótipos; AC: acurácia da seleção de genótipos; ** e *, significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente, e ^{ns} não significativo, pelo teste da razão de verossimilhança (TRV).

3.3.3. Correlações entre caracteres

As correlações de Spearman entre ambientes, representadas na diagonal da Tabela 3, foram positivas, significativas ($P < 0,01$) e apresentaram valores relativamente altos, indicando que o estresse não foi suficiente para reduzir substancialmente a correlação entre ambientes dos caracteres. Em relação às estimativas de correlações de Pearson entre vetores de valores genéticos dos caracteres em cada ambiente, foram identificados caracteres de parte aérea associados a caracteres de raiz, como DIAM e MPAS. A utilização destes caracteres na seleção indireta para morfologia de raiz pode ser útil, devido a maior facilidade e praticidade de mensurar os caracteres de parte aérea.

O DIAM, que também é um caractere importante para seleção de genótipos resistentes ao acamamento em milho, apresentou correlações positivas e significativas ($P < 0,01$) com quase todos os caracteres de raiz, em ambos os níveis de N, com exceção de DTR em baixo N. Segundo Falconer e Mackay (1996), a seleção indireta pode promover maiores ganhos em relação à direta se o caractere secundário apresentar maior herdabilidade que o principal, e se a correlação genética entre ambos for positiva e de alta magnitude, como é o entre pares de caracteres no presente trabalho. Em geral, o DIAM apresentou estimativas de herdabilidades maiores em relação à maioria dos caracteres de raiz, menores valores de coeficiente de variação e maiores estimativas de acurácias na predição de valores genéticos. Além disso, com a seleção indireta por DIAM, os custos e o tempo despendidos na medição de caracteres de raiz poderiam ser reduzidos.

MPAS também se apresentou como um caractere de parte aérea importante apresentando correlações positivas e significativas ($P < 0,05$) com todos os caracteres em ambos os níveis de nitrogênio. A correspondência entre caracteres de parte aérea e radiculares levanta a possibilidade de que os caracteres radiculares possam, em parte, serem previstos a partir de caracteres de parte aérea mais facilmente observados (TJOELKER et al., 2005). ALT e CD também apresentaram correlações positivas e significativas com a maioria dos caracteres de raiz, porém com menores magnitudes. Manavalan et al. (2011) avaliaram 26 linhagens de milho para caracteres de raiz e parte aérea e verificaram que algumas das linhagens com sistemas radiculares mais profundos também apresentaram alto comprimento da parte aérea

(medido da superfície do solo até a ponta da folha mais longa). Em nosso trabalho, observamos esse comportamento para algumas linhagens. Em alto N, dentre as linhagens que se destacaram para CRT, VML144, VML076, VML032 e VML106 também estão entre as linhagens mais altas; e VML144, VML076, VML022, VML092 e VML106 também apresentaram alta MPAS. Em baixo N, dentre as linhagens com maiores CRT, VML144 e VML076 também estão entre as mais altas; e VML144, VML076, VML178, VML138 e VML046 também apresentaram alta MPAS.

A MRS apresentou correlações positivas e significativas ($P < 0,01$) com os demais caracteres de raiz. Em geral com magnitudes altas, acima de 0,50 (Tabela 3), com exceção de DRM em alto N (0,36) e DTR em baixo N (0,41), mas ainda assim moderadas e significativas. MRS apresentou correlações de alta magnitude com os caracteres radiculares: CRL, CRA, CRT, ASR e VOL. Abdel-Ghani et al. (2013) relataram em seu trabalho que MRS e CRT em alto e baixo nível de N foram altamente e significativamente correlacionados ($r = 0,79, 0,76$, respectivamente), resultados condizentes com os obtidos no presente trabalho. É possível observar que, muitas vezes, linhagens que apresentaram elevados valores genéticos para MRS, também apresentaram elevados valores para CRT; isso pode ser explicado pelo fato desses caracteres serem relacionados linearmente apresentando correlações de 0,71 e 0,78 em alto e baixo N, respectivamente (Tabela 3). Kumar et al. (2012) trabalharam com um painel de 74 linhagens de milho e também verificaram que MRS é significativamente correlacionada com vários caracteres de raiz. Outros autores também apontaram MRS como um possível bom preditor para eficiência nutricional de genótipos (LIU et al., 2009; ABDEL-GHANI et al., 2013).

CRA, CRL e CRT também apresentaram correlações positivas e significativas com a maioria dos caracteres de raiz, em ambos os níveis de N, com algumas exceções como, por exemplo, CRL e CRT com DRM em baixo N e CRA e DTR em ambos os níveis de N. DRM e VOL apresentaram correlações de 0,45 e 0,66, nos ambientes de alto e baixo nível de N, respectivamente; enquanto VOL e ASR apresentaram correlações de 0,96 para ambos. Nossos resultados indicam que a maioria dos caracteres radiculares é, em geral, relacionada linearmente uns com os outros, em ambos os níveis de N e, logo, podem ser utilizados na seleção indireta de caracteres de difícil mensuração.

Tabela 3 Estimativas de correlações entre vetores de valores genéticos dos caracteres altura de planta (ALT, cm), diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de raiz seca (MRS, mg), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), massa total seca (MTS, mg), relação raiz:parte aérea (RSR mg mg⁻¹), crescimento diário (CD, cm), comprimento radicular lateral (CRL, cm), comprimento radicular axial (CRA, cm), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm), área superficial radicular (ASR, cm²), volume radicular (VOL, cm³) e densidade do tecido radicular (DTR, mg cm⁻³) avaliados em um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical nos ambientes de baixo e alto nitrogênio.

Caracteres ^{1/}	ALT	DIAM	MRS	MPAS	MTS	RSR	CD	CRL	CRA	CRT	DRM	ASR	VOL	DTR
ALT (cm)	0,83**	0,09 ^{ns}	0,32**	0,60**	0,57**	-0,48**	0,92**	0,35**	0,34**	0,36**	-0,02 ^{ns}	0,35**	0,31**	0,12 ^{ns}
DIAM (mm)	-0,08 ^{ns}	0,80**	0,58**	0,65**	0,66**	-0,31**	0,09 ^{ns}	0,41**	0,46**	0,43**	0,29**	0,52**	0,55**	0,29**
MRS (mg)	0,29**	0,54**	0,64**	0,76**	0,83**	0,01 ^{ns}	0,18*	0,66**	0,79**	0,71**	0,36**	0,82**	0,84**	0,64**
MPAS (mg)	0,57**	0,50**	0,68**	0,71**	0,99**	-0,52**	0,47**	0,57**	0,64**	0,60**	0,25**	0,68**	0,69**	0,42**
MTS (mg)	0,54**	0,54**	0,80**	0,98**	0,70**	-0,44**	0,43**	0,61**	0,69**	0,65**	0,28**	0,74**	0,74**	0,47**
RSR (mg mg ⁻¹)	-0,41**	-0,11 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,52**	-0,40**	0,58**	-0,48**	-0,09 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,14 ^{ns}
CD (cm)	0,94**	-0,06 ^{ns}	0,22**	0,51**	0,47**	-0,38**	0,79**	0,29**	0,26**	0,29**	-0,07 ^{ns}	0,27**	0,22**	-0,01 ^{ns}
CRL (cm)	0,16*	0,50**	0,69**	0,53**	0,61**	0,07 ^{ns}	0,16*	0,47**	0,87**	0,99**	-0,23**	0,90**	0,74**	0,17*
CRA (cm)	0,24**	0,51**	0,88**	0,64**	0,74**	0,05 ^{ns}	0,23**	0,78**	0,61**	0,92**	0,17*	0,98**	0,94**	0,15 ^{ns}
CRT (cm)	0,19*	0,53**	0,78**	0,59**	0,67**	0,07 ^{ns}	0,19*	0,98**	0,88**	0,50**	-0,13 ^{ns}	0,95**	0,81**	0,17*
DRM (mm)	0,18*	0,26**	0,51**	0,35**	0,42**	-0,03 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,48**	0,07 ^{ns}	0,54**	0,18*	0,45**	0,05 ^{ns}
ASR (cm ²)	0,24**	0,57**	0,90**	0,66**	0,76**	0,06 ^{ns}	0,23**	0,84**	0,98**	0,92**	0,43**	0,60**	0,96**	0,17*
VOL (cm ³)	0,25**	0,53**	0,90**	0,65**	0,75**	0,05 ^{ns}	0,24**	0,65**	0,96**	0,77**	0,66**	0,96**	0,67**	0,16 ^{ns}
DTR (mg cm ⁻³)	0,12 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,41**	0,18*	0,25**	0,21**	-0,01 ^{ns}	0,22**	0,02 ^{ns}	0,17*	-0,19*	0,08 ^{ns}	~0,00 ^{ns}	0,57**

^{1/}** e * significativo a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente, e ^{ns} não significativo, pelo teste t. Acima da diagonal – correlações de Pearson para o ambiente de alto nitrogênio, abaixo da diagonal – correlações Pearson para o ambiente de baixo nitrogênio e diagonal – correlações de Spearman entre ambientes dos caracteres.

3.3.4. Correlações canônicas entre grupos de caracteres

De acordo com a análise de multicolinearidade, foi detectado colinearidade severa e optou-se por descartar alguns caracteres para que fosse possível a continuidade das análises estatísticas de correlações canônicas e de diversidade genética. Os seguintes caracteres continuaram nas análises subsequentes: DIAM, MPAS, RSR, CD, MRS, CRT e DRM.

Para as análises de correlações canônicas, foi estabelecido o Grupo I, com caracteres de parte aérea, constituído pelos caracteres DIAM, MPAS e CD; e o Grupo II, com caracteres de morfologia de raiz, constituído pelos caracteres MRS, CRT e DRM. No ambiente de alto N, dos três pares canônicos formados, apenas o primeiro foi significativo ($P < 0,05$) com correlação de 0,79. Os coeficientes canônicos indicaram associação de relação inversa entre os caracteres MPAS e CD do Grupo I. Com relação aos coeficientes canônicos entre os grupos, foi observado que MRS esteve diretamente relacionada à MPAS e inversamente relacionada ao CD. Essas associações indicam que o acúmulo de biomassa radicular está relacionado ao acúmulo de biomassa na parte aérea e, no entanto, que ambos os caracteres são inversamente relacionados ao CD (Tabela 4).

Tabela 4 Estimativas de correlações e coeficientes canônicos no ambiente de alto nitrogênio; Grupo I: diâmetro de colmo (DIAM, mm); massa de parte aérea seca (MPAS, mg); crescimento diário (CD, cm); Grupo II: massa de raiz seca (MRS, mg); comprimento radicular total (CRT, cm); diâmetro radicular médio (DRM, mm).

	Correlação	<i>p</i> valor	Coeficientes canônicos					
			DIAM	MPAS	CD	MRS	CRT	DRM
1	0,79	0,04	0,12	1,01	-0,26	0,88	0,13	0,07
2	0,23	0,86	0,16	-0,40	1,14	-1,03	1,39	-0,03
3	0,16	0,51	1,35	-1,11	0,27	-1,27	1,05	1,32

No ambiente de baixo N, somente o primeiro par canônico foi relevante ($P = 0,17$) com correlação de 0,73. Da mesma forma que no ambiente de alto N, os caracteres com maiores coeficientes canônicos nos Grupos I e II foram MPAS e MRS, respectivamente. Entre os caracteres do Grupo I, DIAM e MPAS estiveram diretamente relacionados. Como discutido anteriormente, estes caracteres têm

potencial para serem utilizados na seleção indireta de caracteres de raiz e apresentam a vantagem de ser facilmente mensurados. Entre os caracteres do Grupo II, a MRS apresentou relação direta com CRT. Considerando os coeficientes canônicos entre os grupos, foi observado que MRS e CRT apresentaram relação direta com MPAS (Tabela 5). As diferentes relações e magnitude dos valores observados, quando comparados os ambientes, podem ser devido à resposta biológica do painel de linhagens ao estresse nutricional por N.

Tabela 5 Estimativas de correlações e coeficientes canônicos no ambiente de baixo nitrogênio; Grupo I: diâmetro de colmo (DIAM, mm); massa de parte aérea seca (MPAS, mg); crescimento diário (CD, cm); Grupo II: massa de raiz seca (MRS, mg); comprimento radicular total (CRT, cm); diâmetro radicular médio (DRM, mm).

	Correlação	p valor	Coeficientes canônicos					
			DIAM	MPAS	CD	MRS	CRT	DRM
1	0,73	0,17	0,36	0,79	-0,07	0,55	0,43	0,19
2	0,09	1,00	1,22	-1,14	0,45	-2,06	1,90	0,74
3	0,04	0,86	0,16	-0,52	1,20	-0,75	0,15	1,22

3.3.5. Diversidade genética

Pela análise de diversidade genética, os agrupamentos das linhagens nos ambientes separadamente e em análise conjunta, ilustrados pelos dendogramas (Figuras 1, 2 e 3), demonstram expressivas diferenças em sua composição. Isso evidencia que, apesar de somente alguns caracteres terem apresentado interação genótipos x ambientes, esses caracteres relacionam-se com outros caracteres de importância e essas relações não podem ser desprezadas quando o objetivo é selecionar linhagens superiores e divergentes em um dado nível de N. Quando genótipos são avaliados em diferentes ambientes, há o interesse em se ter um padrão de agrupamento em cada um dos ambientes e inferir quanto à estabilidade das associações entre os genótipos (CRUZ et al., 2011). No ambiente de alto N, o dendograma gerado com UPGMA com base nos BLUPs dos caracteres DIAM, MPAS, RSR, CD, MRS, CRT e DRM, agrupou as linhagens em 12 grupos, sendo os maiores: o grupo I com 63 linhagens, grupo III com 37 linhagens, o grupo IV com 19 linhagens e o grupo VII com 11 linhagens (Figura 1); enquanto os demais com

número reduzido de linhagens. No ambiente de baixo N, o dendograma gerado com UPGMA com base nos BLUPs dos mesmos caracteres agrupou as linhagens em 15 grupos, sendo os maiores dentre eles os grupos I e IV, com 48 e 61 linhagens, respectivamente (Figura 2). No agrupamento da análise conjunta, desprezando-se os efeitos da interação, 15 grupos foram formados, sendo os grupos I, IV e V os maiores, com 88, 11 e 25 linhagens, respectivamente, e os demais com número reduzido de linhagens (Figura 3). É viável que programas de melhoramento concentrem seus esforços para seleção de genótipos considerando-se cada ambiente (nível de N) separadamente. Segundo Bazinger et al. (1997), programas de melhoramento de milho devem incluir ambientes de baixo N para maximizar os ganhos quando objetiva-se focar em condições tropicais de baixo N.

Em alto N, os pares de linhagens VML144 e VML170, VML142 e VML 170, VML125 e VML144, VML134 e VML170, e VML022 e VML170 foram os que apresentaram maiores divergências entre as linhagens estudadas, com distâncias de 4,22, 4,20, 4,07, 3,88 e 3,85, respectivamente; enquanto que VML 053 e VML073, VML021 e VML070, VML064 e VML075, VML052 e VML110, e VML095 e VML124 apresentaram as maiores similaridades, com distâncias de 0,20, 0,23, 0,24, 0,24 e 0,24, respectivamente. Em baixo N, as linhagens que apresentaram maiores dissimilaridades foram VML002 e VML144, VML052 e VML144, VML084 e VML144, VML144 e VML152, VML002 e VML076, apresentando distâncias de 4,63, 4,10, 4,07, 4,00 e 3,94, respectivamente; e as linhagens mais similares foram VML050 e VML179, VML004 e VML101, VML064 e VML077, VML057 e VML096, e VML005 e VML164, com distâncias de 0,14, 0,17, 0,18, 0,24 e 0,24, respectivamente. O cruzamento entre indivíduos geneticamente divergentes promove o aparecimento do fenômeno denominado heterose. A heterose é um fenômeno biológico que é definido como a superioridade da média dos filhos em relação à média dos pais. Segundo Falconer e Mackay (1996), a magnitude da heterose depende do grau de diversidade alélica e do nível de dominância; e ela só ocorre se houver, simultaneamente, dominância e diversidade alélica.

Mundim et al. (2013) avaliaram 25 linhagens de milho pipoca em relação a 12 caracteres de raiz e parte aérea associados com eficiência do uso de nitrogênio em alto e baixo N, os autores utilizaram 10 caracteres para análise de diversidade. Em ambos níveis de N, foram formados quatro grupos. No trabalho de Manalavan et al.

(2011), os autores avaliaram 26 linhagens de milho para comprimento de raiz e parte aérea e para ambos os caracteres considerados, foram formados três grupos. Makumbi et al. (2011) estudaram a variabilidade genética entre 15 linhagens de milho em condições de estresse, seca e baixo N, e sem estresse usando marcadores AFLP, RFLP e SSR e identificaram quatro grupos de linhagens, que foram agrupadas de acordo com o pedigree. Por outro lado, no trabalho de Kumar et al. (2012), em que avaliaram a magnitude da variabilidade genética para caracteres de raiz de um painel de 74 linhagens de milho nos estádios de 6, 10 e 14 dias, os autores mencionam que a análise de agrupamento alocou as linhagens em dois grupos, e que, em geral, agrupamento de linhagens com base em morfologia das raízes não foi consistente com o “background” genético e origem das linhagens de milho.

A correlação cofenética nos informa sobre a consistência do agrupamento. As correlações cofenéticas nos cenários de alto N, baixo N e análise conjunta foram 0,71, 0,71 e 0,68, respectivamente. Isso demonstra relativa consistência do agrupamento e pequena distorção provocada pelo agrupamento.

A avaliação da importância relativa dos caracteres na diversidade genética do painel de linhagens endogâmicas de milho tropical, pelo método de Singh (1981), indicou que de todos os caracteres considerados na análise de diversidade (DIAM, MPAS, RSR, CD, MRS, CRT e DRM), os que contribuíram com aproximadamente cem por cento para a dissimilaridade entre as linhagens foram: MRS, MPAS e CRT, em ambos os níveis de N. MPAS foi o caractere que mais contribuiu para a dissimilaridade genética entre as linhagens em condição de alto N (0,60), seguido por CRT e MRS (0,38 e 0,02); enquanto que CRT foi o caractere que mais contribuiu para a dissimilaridade genética entre as linhagens em condição de baixo N (0,55), seguido por MPAS e MRS (0,41 e 0,04). Esses resultados corroboram com a hipótese de que a plasticidade fenotípica de caracteres de raiz pode ser útil em condições de estresses abióticos e que plantas com sistemas radiculares mais vigorosos, são mais aptas a lidar com esse tipo de adversidade. Abdel-Ghani et al. (2013) concluíram em seu trabalho que CRT e MRS devem ser suficientes para efetivamente caracterizar grande número de genótipos e identificar linhagens com sistemas radiculares superiores em estágio de plântula, em vista desses caracteres apresentarem correlações altas com outros caracteres de raiz e também apresentarem altas herdabilidades.

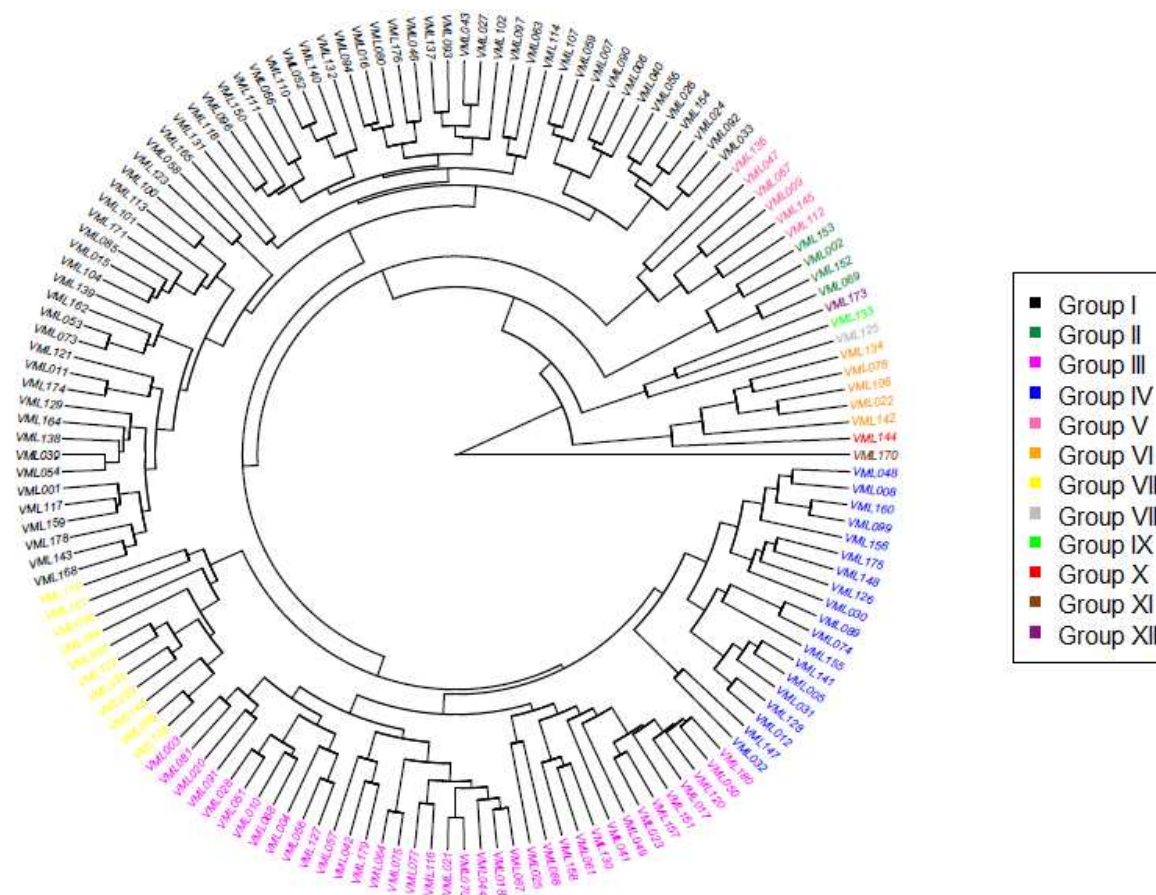


Figura 1 Dendrograma de um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical avaliado em condição de alto nitrogênio, baseado no método UPGMA, obtido de médias BLUP de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea de plântulas no estágio V5.

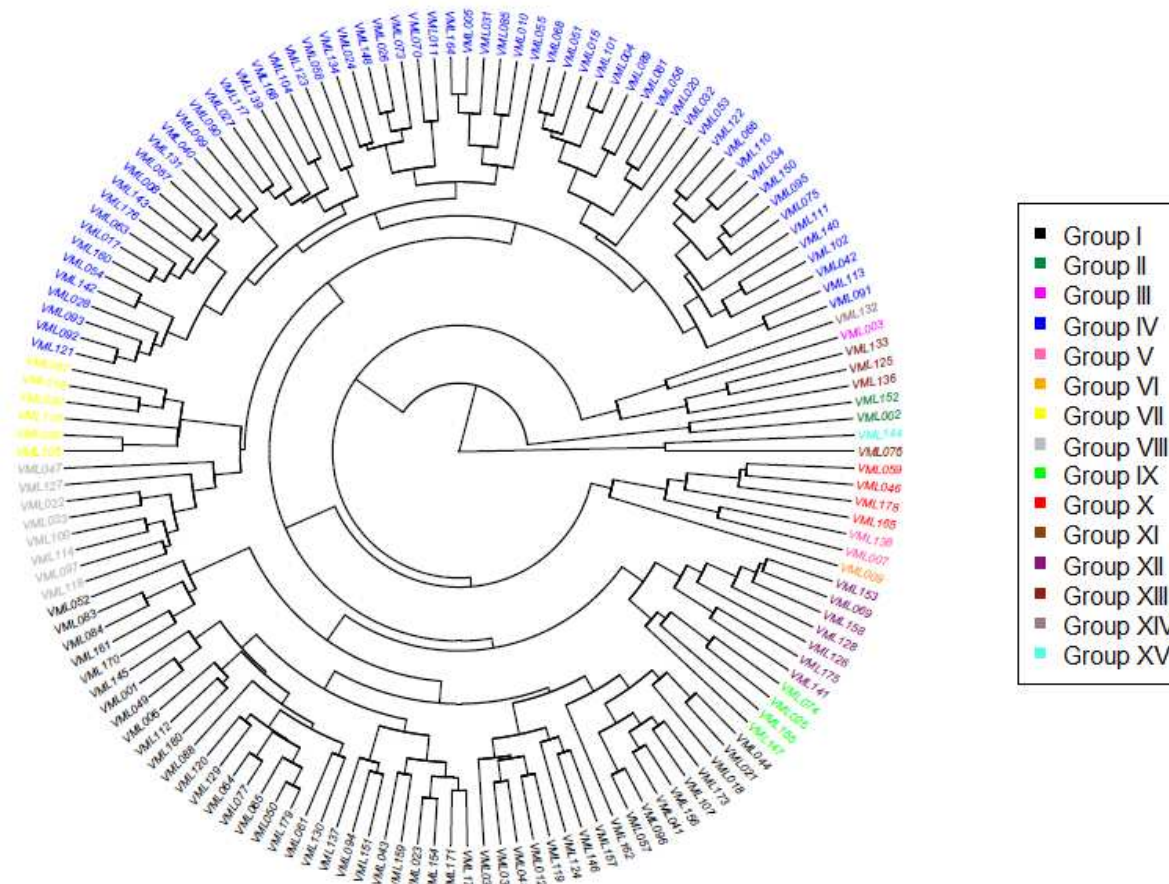


Figura 2 Dendrograma de um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical avaliado em condição de baixo nitrogênio, baseado no método UPGMA, obtido de médias BLUP de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea de plântulas no estágio V5.

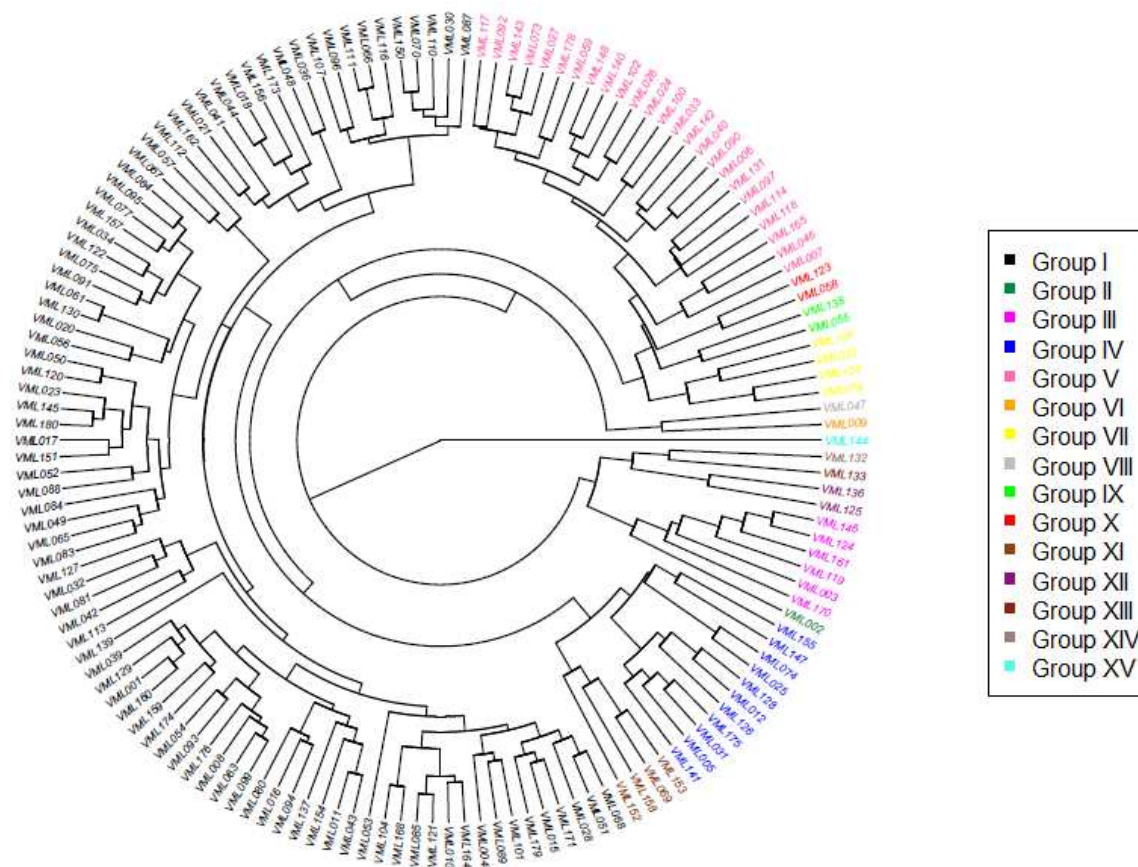


Figura 3 Dendrograma de um painel de 150 linhagens endogâmicas de milho tropical considerando a análise conjunta dos ambientes, desprezando-se os efeitos da interação, baseado no método UPGMA, obtido de médias BLUP de caracteres de morfologia de raiz e parte aérea de plântulas no estágio V5.

3.3.6. Seleção de linhagens para caracteres de raiz

Com a finalidade de facilitar a visualização e seleção de grupos superiores, com maiores médias para cada caractere, foi feito um agrupamento de médias de grupos pelo método de Tocher (Tabelas 6 e 7). No ambiente de alto N, os grupos VI (linhagens VML134, VML076, VML106, VML022 e VML142) e X (linhagem VML144) destacaram-se por apresentar médias genotípicas altas para os caracteres radiculares MRS e CRT, além do caractere de parte aérea MPAS (Tabela 6). Nota-se que para esses grupos, as médias dos caracteres DIAM e CD também foram altas quando comparadas com as médias dos demais grupos. As linhagens VML006, VML096, VML118 e VML040, pertencentes ao grupo I, também se destacaram para o caractere MRS; enquanto as linhagens VML131, VML110, VML032, VML140, VML165 e VML092, dos grupos I e IV, destacaram-se por apresentar médias altas de CRT. O grupo XI, composto apenas pela linhagem VML170, foi o que apresentou maior RSR; enquanto o grupo V foi o que apresentou maior média para o caractere DRM, e as linhagens VML047, VML067 e VML136, contidas neste grupo, as que apresentaram maiores valores genéticos para DRM.

Em baixo N, os grupos que mais se destacaram, por apresentar elevadas médias para os caracteres de raiz MRS e CRT, foram VI, XI e XV, compostos por uma linhagem cada, sendo elas VML009, VML076 e VML144, respectivamente (Tabela 7). Entretanto, linhagens dos grupos V, VII, VIII, X e XIV também se destacaram para caracteres radiculares; como por exemplo, as linhagens VML047 (VIII), VML106 (VII), VML127 (VIII), VML033 (VIII), VML022 (VIII), VML118 (VIII) e VML178 (X) para MRS e as linhagens VML007 (V), VML178 (X), VML046 (X), VML138 (V), VML132 (XIV), VML116 (VII) e VML080 (VII) para CRT. O grupo XIV, composto apenas pela linhagem VML132, foi o que apresentou maior RSR; enquanto os grupos que apresentaram as maiores médias para o caractere DRM foram VI, VIII e XV; sendo a linhagem VML047, do grupo VIII, a que apresentou maior valor genético médio para DRM, seguida pelas linhagens VML053, VML089, VML081 e VML140, todas do grupo IV.

Na análise conjunta, desprezando-se os efeitos da interação, as dez linhagens que apresentaram as maiores médias para MRS foram VML144, VML106, VML022, VML134, VML076, VML009, VML118, VML047, VML033 e VML040 (dos

grupos V, VI, VII, VIII e XV); e para CRT foram VML144, VML076, VML106, VML007, VML131, VML022, VML134, VML046, VML132 e VML080 (dos grupos I, V, VII, XIV e XV) (Figura 3). Algumas das linhagens de milho que se destacaram na análise conjunta para estes caracteres de raiz, coincidem com linhagens que se destacaram em ambos ambientes em suas análises individuais, por exemplo: VML144, VML106, VML022 e VML076. No entanto, o ordenamento e magnitude dos valores genéticos mudaram consideravelmente. Os diferentes agrupamentos e valores genéticos das linhagens, para cada cenário, apontam a importância de selecionar linhagens em cada ambiente separadamente. Esses resultados contribuirão para a orientação e o planejamento de cruzamentos entre as linhagens superiores para caracteres de raiz em dada condição de N, com a finalidade de obter e identificar cultivares com sistemas radiculares mais vigorosos.

Conforme a relevância dos caracteres MRS e CRT, tanto pela importância relativa indicada pelo método de Singh (1981), quanto pelos relatos na literatura, optamos por considerar estes caracteres para a seleção de genótipos superiores em morfologia de raiz. Em baixo N, as cinco linhagens que apresentaram maiores CRT foram VML144, VML007, VML076, VML178 e VML009, cada alocada em grupo diferente: XV, V, XI, X e VI, respectivamente; enquanto as cinco linhagens com maiores MRS foram VML144, VML009, VML047, VML106, VML076 dos grupos XV, VI, VIII, VII e XI, respectivamente. Já em alto N, as cinco linhagens com maiores CRT foram VML144, VML131, VML022, VML106 e VML076, dos grupos X, I, VI, VI e VI, respectivamente; para MRS foram VML022, VML106, VML134, VML144 e VML076, dos grupos VI, VI, VI, X e VI. Em baixo N, as linhagens VML106, VML076 e VML022 pertenciam a grupos diferentes, já em alto N, elas foram designadas ao mesmo grupo.

Tabela 6 Resumo do agrupamento baseado no método de Mojena, valores genotípicos médio, mínimo e máximo dos caracteres diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), crescimento diário (CD, cm), relação raiz: parte aérea (RSR, mg mg⁻¹), massa de raiz seca (MRS, mg), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm) nos diferentes grupos no ambiente de alto nitrogênio.

Grupos	DIAM (mm)	MRS (mg)	MPAS (mg)	RSR (mg mg ⁻¹)	CD (cm)	CRT (cm)	DRM (mm)
Grupo I	10,15 ^a (8,03-11,90)	482,70 ^c (332,73-620,05)	2416,72 ^b (1779,04-3373,85)	0,20 ^c (0,14-0,28)	0,67 ^b (0,56-0,79)	3999,91 ^c (3264,11-4874,25)	0,50 ^b (0,47-0,54)
Grupo II	8,06 ^a (7,70-8,34)	275,59 ^f (236,95-297,90)	1460,74 ^d (1420,87-1564,66)	0,18 ^c (0,16-0,20)	0,69 ^b (0,62-0,76)	3397,83 ^c (3272,33-3548,68)	0,45 ^d (0,44-0,46)
Grupo III	8,75 ^a (7,36-10,29)	397,03 ^d (250,01-515,57)	1780,18 ^d (1243,08-2474,49)	0,22 ^c (0,16-0,29)	0,63 ^b (0,53-0,72)	3486,49 ^c (2926,78-3971,86)	0,51 ^b (0,48-0,54)
Grupo IV	8,55 ^a (7,39-9,76)	404,90 ^d (332,73-517,75)	1999,90 ^c (1554,20-2382,98)	0,20 ^c (0,17-0,24)	0,67 ^b (0,58-0,80)	3900,22 ^c (3476,58-4454,80)	0,48 ^c (0,46-0,50)
Grupo V	9,46 ^a (8,06-10,57)	474,94 ^c (413,27-524,28)	1945,06 ^c (1739,83-2257,49)	0,27 ^c (0,19-0,35)	0,57 ^b (0,50-0,62)	3378,64 ^c (3213,71-3534,99)	0,54 ^a (0,53-0,55)
Grupo VI	10,42 ^a (9,62-11,90)	679,70 ^a (622,23-733,24)	3272,94 ^a (2877,11-3716,34)	0,21 ^c (0,16-0,24)	0,71 ^b (0,69-0,76)	4603,46 ^b (4326,14-4854,47)	0,51 ^b (0,50-0,53)
Grupo VII	7,80 ^b (6,91-8,70)	365,18 ^e (326,20-461,15)	1457,71 ^d (1230,01-1700,61)	0,29 ^c (0,23-0,38)	0,59 ^b (0,55-0,65)	3585,17 ^c (3221,28-3853,39)	0,48 ^c (0,45-0,51)
Grupo VIII	9,34 ^a (9,34-9,34)	476,39 ^c (476,39-476,39)	1303,22 ^d (1303,22-1303,22)	0,45 ^b (0,45-0,45)	0,43 ^c (0,43-0,43)	3488,35 ^c (3488,35-3488,35)	0,52 ^b (0,52-0,52)
Grupo IX	9,09 ^a (9,09-9,09)	419,80 ^d (419,80-419,80)	1256,16 ^d (1256,16-1256,16)	0,44 ^b (0,44-0,44)	0,53 ^b (0,53-0,53)	4229,84 ^b (4229,84-4229,84)	0,47 ^c (0,47-0,47)
Grupo X	9,79 ^a (9,79-9,79)	676,65 ^a (676,65-676,65)	3504,57 ^a (3504,57-3504,57)	0,19 ^c (0,19-0,19)	0,88 ^a (0,88-0,88)	5094,02 ^a (5094,02-5094,02)	0,50 ^b (0,50-0,50)
Grupo XI	6,30 ^b (6,30-6,30)	280,49 ^f (280,49-280,49)	1065,30 ^d (1065,30-1065,30)	0,54 ^a (0,54-0,54)	0,66 ^b (0,66-0,66)	3475,90 ^c (3475,90-3475,90)	0,46 ^c (0,46-0,46)
Grupo XII	9,59 ^a (9,59-9,59)	515,57 ^b (515,57-515,57)	1679,70 ^d (1679,70-1679,70)	0,29 ^c (0,29-0,29)	0,56 ^b (0,56-0,56)	4227,57 ^b (4227,57-4227,57)	0,49 ^b (0,49-0,49)

^a, ^b, ^c, ^d, ^e e ^f: Agrupamento de médias dos grupos pelo método de Tocher.

Tabela 7 Resumo do agrupamento baseado no método de Mojena, valores genotípicos médio, mínimo e máximo dos caracteres diâmetro de colmo (DIAM, mm), massa de parte aérea seca (MPAS, mg), crescimento diário (CD, cm), relação raiz: parte aérea (RSR, mg mg⁻¹), massa de raiz seca (MRS, mg), comprimento radicular total (CRT, cm), diâmetro radicular médio (DRM, mm) nos diferentes grupos no ambiente de baixo nitrogênio.

Grupos	DIAM	MRS	MPAS	RSR	CD	CRT	DRM
Grupo I	7,83 ^c (6,17-9,00)	405,61 ^b (316,49-480,79)	1242,23 ^c (980,17-1615,55)	0,33 ^d (0,27-0,39)	0,51 ^b (0,44-0,58)	3074,36 ^d (2499,68-3633,25)	0,51 ^b (0,47-0,54)
Grupo II	6,77 ^d (6,45-7,09)	296,22 ^c (291,66-300,78)	909,54 ^d (822,17-996,90)	0,42 ^b (0,41-0,42)	0,53 ^b (0,46-0,60)	2816,33 ^e (2676,66-2956,01)	0,44 ^c (0,43-0,45)
Grupo III	6,87 ^d (6,87-6,87)	396,48 ^b (396,48-396,48)	1424,29 ^c (1424,29-1424,29)	0,44 ^b (0,44-0,44)	0,60 ^b (0,60-0,60)	3167,04 ^d (3167,04-3167,04)	0,51 ^b (0,51-0,51)
Grupo IV	8,13 ^c (6,84-9,81)	486,48 ^b (380,53-610,68)	1653,11 ^b (1129,13-2149,20)	0,30 ^d (0,26-0,39)	0,57 ^b (0,48-0,65)	3288,89 ^d (2845,24-3805,09)	0,53 ^b (0,50-0,57)
Grupo V	9,25 ^b (9,03-9,47)	476,23 ^b (419,27-533,20)	1954,39 ^b (1844,59-2064,19)	0,27 ^d (0,25-0,29)	0,51 ^b (0,50-0,52)	4247,90 ^b (4012,29-4483,51)	0,47 ^c (0,47-0,47)
Grupo VI	10,23 ^a (10,23-10,23)	738,28 ^a (738,28-738,28)	1773,76 ^b (1773,76-1773,76)	0,38 ^b (0,38-0,38)	0,48 ^c (0,48-0,48)	4053,72 ^b (4053,72-4053,72)	0,55 ^a (0,55-0,55)
Grupo VII	8,28 ^c (7,80-9,05)	591,69 ^b (544,59-681,32)	1554,16 ^c (1405,40-1761,95)	0,35 ^c (0,30-0,37)	0,54 ^b (0,51-0,57)	3852,74 ^b (3649,04-3934,53)	0,51 ^b (0,49-0,53)
Grupo VIII	8,65 ^c (7,55-9,47)	632,89 ^b (565,10-713,22)	1875,59 ^b (1648,61-2090,16)	0,32 ^d (0,29-0,35)	0,59 ^b (0,53-0,63)	3620,72 ^c (3406,13-3796,55)	0,56 ^a (0,54-0,59)
Grupo IX	7,05 ^d (6,92-7,29)	385,66 ^b (337,23-480,79)	1486,86 ^c (1459,71-1506,93)	0,28 ^d (0,26-0,31)	0,66 ^a (0,60-0,72)	3147,34 ^d (2888,09-3456,43)	0,51 ^b (0,48-0,52)
Grupo X	9,63 ^b (9,27-9,93)	576,50 ^b (499,02-622,07)	1897,13 ^b (1636,80-2139,75)	0,30 ^d (0,29-0,31)	0,52 ^b (0,47-0,57)	3699,45 ^c (3167,62-4055,61)	0,51 ^b (0,50-0,53)
Grupo XI	8,93 ^b (8,93-8,93)	669,92 ^b (669,92-669,92)	2564,78 ^a (2564,78-2564,78)	0,28 ^d (0,28-0,28)	0,68 ^a (0,68-0,68)	4290,66 ^b (4290,66-4290,66)	0,51 ^b (0,51-0,51)
Grupo XII	7,15 ^d (6,89-7,38)	342,47 ^b (275,71-401,04)	1351,50 ^c (1117,33-1698,20)	0,28 ^d (0,26-0,32)	0,57 ^b (0,49-0,61)	3009,56 ^d (2694,45-3602,15)	0,47 ^c (0,46-0,49)
Grupo XIII	8,21 ^c (7,95-8,54)	495,22 ^b (416,99-576,50)	1180,29 ^c (1011,07-1294,42)	0,43 ^b (0,41-0,47)	0,42 ^c (0,40-0,44)	3343,38 ^d (2843,03-3623,39)	0,53 ^b (0,52-0,54)
Grupo XIV	7,51 ^d (7,51-7,51)	517,25 ^b (517,25-517,25)	1266,09 ^c (1266,09-1266,09)	0,49 ^a (0,49-0,49)	0,55 ^b (0,55-0,55)	3940,60 ^b (3940,60-3940,60)	0,50 ^b (0,50-0,50)
Grupo XV	8,41 ^c (8,41-8,41)	913,74 ^a (913,74-913,74)	2668,67 ^a (2668,67-2668,67)	0,32 ^d (0,32-0,32)	0,69 ^a (0,69-0,69)	4600,94 ^a (4600,94-4600,94)	0,55 ^a (0,55-0,55)

^a, ^b, ^c, ^d e ^e : Agrupamento de médias dos grupos pelo método de Tocher.

3.4. Conclusões

O painel de linhagens de milho tropical estudado apresenta variabilidade genética e potencial para ser utilizado para fins de melhoramento genético. Por meio de análise de correlação canônica, conclui-se que existe relação entre caracteres de parte aérea e de raiz para ambos os níveis de N. Os caracteres de parte aérea MPAS e DIAM podem vir a ser utilizados na seleção indireta de linhagens para morfologia de raiz.

Estudos de diversidade genética apresentaram diferentes agrupamentos para os cenários considerados, o que demonstra a importância de considerar cada nível de N separadamente no momento da seleção. Foram identificados grupos e linhagens promissoras para CRT e MRS, importantes caracteres de morfologia de raiz. Em baixo N, as principais linhagens selecionadas foram VML009, VML076, VML144, VML178 e VML106, dos grupos VI, XI, XV, X e VII, respectivamente; e em alto N, as que se destacaram para os referidos caracteres foram VML022, VML076, VML106, VML131 e VML144, sendo VML022, VML076 e VML106 do grupo VI e VML131 e VML144, dos grupos I e X, respectivamente. As informações geradas pelo estudo da diversidade genética do painel de linhagens serão utilizadas para orientar o planejamento de cruzamentos entre linhagens superiores para caracteres de raiz.

3.5. Referências Bibliográficas

ABDEL-GHANI, A. H.; KUMAR, B.; REYES-MATAMOROS, J.; GONZALEZ-PORTILHA, P. J.; JANSEN, C.; MARTIN, J. P. S.; LEE, M.; LUBBERSTEDT, T. Genotypic variation and relationships between seedlings and adult plant traits in maize (*Zea mays* L.) inbred lines grown under contrasting nitrogen levels. *Euphytica*, v. 189, n.1, p.123-133, 2013.

BAZINGER, M.; BETRAN, F.J.; LAFITTE, H.R. Efficiency of high-nitrogen selection environments for improving maize for low-nitrogen target environments. *Crop Science*, v. 37, p.1103-1109, 1997.

BIROUSTE, M.; ZAMORA-LEDEZMA, E.; BOSSARD, C.; PÉREZ-RAMOS, I. M.; ROUMET, C. Measurement of fine root tissue density: a comparison of three

methods reveals the potential of root dry matter content. *Plant Soil*, v. 374, p. 299-313, 2014.

BORDISKY, B.L.; POPP, A.; LOTZE-CAMPEN, H.; DIETRICH, J.P.; ROLINSKI, S.; WEINDL, I.; SCHMITZ, C.; MULLER, C.; BONDSCH, M.; HUMPHENODER, F.; BIEWALD, A.; STEVANOVIC, M. Reactive nitrogen requirements to feed the world in 2050 and potential to mitigate nitrogen pollution. *Nature Communications*, v.5, 2014. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4858>. Acesso em: 04 de nov. de 2016.

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

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

COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. Seja doutor do seu milho – Nutrição e adubação. *Arquivo do Agrônomo Potafos*, n.2, p.1-25, 1995.

COQUE, M.; GALLAIS, A. Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, v.112, n.7, p.1205-1220, 2006.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Viçosa: Editora UFV, 2011. 620p.

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

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2003. 579p.

DORLODOT, S.; FORSTER, B.; PAGÈS, L.; PRICE, A.; TUBEROSA, R. DRAYE, X. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Plant Science*, v.12, p. 1360-1385, 2007.

EISSENSTAT, D.M.; WELLS, C.E.; YANAI, R.D.; WHITBECK, J.L. Building roots in a changing environment: implications for root longevity. *New Phytologist*, v.147, p.33-42, 2000.

ERISMAN, J. W.; GALLOWAY, J.N.; SEITZINGER, S.; BLEEKER, A.; DISE, N.B.; PETRESCU, A.M.R.; LEACH, A.M.; DE VRIES, W. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of Royal Society B*, v.368, n.1621, 2013.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. Introduction to Quantitative Genetics. 4. ed. Harlow: Longmans Green, 1996. 464p.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 396, p. 295-306, 2004.

GARNETT, T.; CONN, V.; KAISER, B.N. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant, Cell and Environment*, v.32, p.1272-83, 2009.

GOOD, A.G.; SHRAWAT, A.K.; MUENCH, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *TRENDS in Plant Science*, v.9, n.12, p. 597-605, 2004.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTACNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology*, v.125, n.3, p.1258-1270, 2001.

HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, v. 162, p. 9-24, 2004.

KUMAR, B.; ABDEL-GHANI, A.H.; REYES-MATAMOROS, J.; HOCHHOLDINGER, F.; LUBBERSTEDT, T. Genotypic variation for root architecture traits in seedlings of maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Plant Breeding*, v.131, p.465-478, 2012.

LI, P.; CHEN, F.; CAI, H.; LIU, J.; PAN, Q.; LIU, Z.; GU, R.; MI, G.; ZHANG, F.; YUAN, L. A genetic relationship between nitrogen use efficiency and seedling root traits in maize as revealed by QTL analysis. *Journal of Experimental Botany*, v.66, n.11, p. 3175-3188, 2015.

LIU, J.; CHEN, F.; OLOKHNUUD, C.; GLASS, A.D.M.; TONG, Y.; ZHANG, F.; MI, G. Root size and nitrogen-uptake in two maize (*Zea mays*) inbred lines differing in nitrogen-use efficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v.172, p.230-236, 2009.

MAKUMBI, D.; BETRÁN, J.F.; BAZINGER, M.; RIBAUT, J.M. Combining ability, heterosis and genetic diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) under stress and non-stress conditions. *Euphytica*, v.180, n.2, p.143-162, 2011.

MANAVALAN, L. P.; MUSKET, T.; NGUYEN, H.T. Natural genetic variation for root traits among diversity lines of maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, v.56, n.1, p.1707-1717, 2011.

MILLIGAN, G.; COOPER, M.C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. *Psychometrika*, v.50, p.159-179, 1985.

MOJENA, R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. *Computer Journal*, v.20, p.359-363, 1977.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, v.74, n.3, p.562-564, 1982.

MONTGOMERY, D.C.; PECK, E.A. Introduction to linear regression analysis. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 504p.

MU, X.; CHEN, F.; WU, Q.; CHEN, Q.; WANG, J.; YUAN, L.; MI, G. Genetic improvement of root growth increases maize yield via enhanced post-silking nitrogen uptake. *European Journal of Agronomy*, v.63, p.55-61, 2015.

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

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 5 fev. 2016.

RAUN, W.R.; JOHNSON, G.V.; PHILLIPS, S.B.; WESTERMAN, R.L. Effect of long-term N fertilization on soil organic C and total N in continuous wheat under conventional tillage in Oklahoma. *Soil Tillage*, v. 47, p. 323–330, 1999.

RESENDE, M. D. V. Selegen-REML/BLUP: Sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 359p.

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

RYSER, P. The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. *Functional Ecology*, v. 10, p. 717-723, 1996.

RYSER, P.; LAMBERS, H. Root and leaf attributes accounting for the performance of fast and slow-growing grasses at different nutrient supply. *Plant Soil*, v. 170, p.251-265, 1995.

SINGH, Y.P.; KUMAR, A.; CHAUHAN, B.P.S. Genetic divergence in pearl millet. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v.41, n.1, p.186-190, 1981.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, v.38, p.1409–1438, 1958.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendograms by objective methods. *Taxon*, v.11, p.30-40, 1962.

TIAN, Q.Y.; CHEN, F.J.; ZHANG, F.S.; MI, G.H. Genotypic difference in nitrogen acquisition ability in maize plants is related to the coordination of leaf and root growth. *Journal Plant Nutrition*, v.29, p.317-330, 2006.

TJOELKER, M.G.; CRAINE, J.M.; WEDIN, D.; REICH, P.B.; TILMAN, D. Linking leaf and root trait syndromes among 39 grasslands and savannah species. *New Phytologist*, v.167, p. 493-508, 2005.

TRACHSEL, S.; MESSMER, R.; STAMP, P.; HUND, A. Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. *Theoretical Applied Genetics*, v.119, p.1413-1424, 2009.

WAHL, S.; RYSER, P. Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist*, v.148, p. 459-471, 2000.

YORK, L.M.; GALINDO-CASTAÑEDA, T.; SCHUSSLER, J.R.; LYNCH, J.P. Evolution of US maize (*Zea mays* L.) root architectural and anatomical phenes over the past 100 years corresponds to increased tolerance of nitrogen stress. *Journal of Experimental Botany*, v.66, n.8, p.2347-2358, 2015.

4. Capítulo 2:

Multi-trait multi-environment Bayesian model reveals G x E interaction for nitrogen-use efficiency components in tropical maize

Abstract - Identifying maize inbred lines that are more efficient in nitrogen (N) use is an important strategy in the context of environmental and economic impacts attributed to the excessive N fertilization. N-uptake efficiency (NUpE) and N-utilization efficiency (NUtE) are components of N-use efficiency (NUE). Despite the fact that most maize breeding data have a multi-trait structure, they are often analyzed under a single-trait framework. We aimed to estimate the genetic parameters for NUpE and NUtE in contrasting N levels, in order to identify superior maize inbred lines, and to propose a Bayesian multi-trait multi-environment (MTME) model. Sixty-four tropical maize inbred lines were evaluated in two experiments: at high (HN) and low N (LN) levels. The MTME model was compared to single-trait multi-environment (STME) models. Based on deviance information criteria (DIC), both multi- and single-trait models revealed genotypes x environments (G x E) interaction. In the MTME model, NUpE was found to be weakly heritable with posterior modes of heritability of 0.016 and 0.023 under HN and LN, respectively. NUtE at HN was found to be highly heritable (0.490), whereas under LN condition it was moderately heritable (0.215). We adopted the MTME model, since combined analysis often presents more accurate breeding values than single models. Superior inbred lines for NUpE and NUtE were identified and this information can be used to plan crosses to obtain maize hybrids that have superior nitrogen use efficiency.

Keywords: *Zea mays* L.; inbred lines; nitrogen utilization efficiency; nitrogen uptake efficiency; MCMC algorithm.

Modelo Bayesiano multi-característico multi-ambiente revela interação G x A para componentes de eficiência no uso de nitrogênio em milho tropical

Resumo - A identificação de linhagens de milho mais eficientes no uso de nitrogênio (N) é uma estratégia importante em contexto de impactos ambientais e econômicos sendo atribuídos à fertilização excessiva de N. A eficiência na absorção (NUpE) e eficiência na utilização de N (NUtE) são componentes da eficiência no uso de N (NUE). Apesar da maioria dos conjuntos de dados em melhoramento terem uma estrutura multi-característica, frequentemente eles são explorados de forma uni-característica. Objetivou-se estimar parâmetros genéticos para NUpE e NUtE em condições contrastantes de N, identificar linhagens superiores, e propor um modelo Bayesiano multi-característico multi-ambiente (MTME). Para isso, 64 linhagens foram avaliadas em dois ensaios: em alto (HN) e baixo (LN) nível de N. Comparou-se o modelo MTME com modelos uni-característicos multi-ambiente (STME). Baseado no critério de informação dos desvios (DIC), os modelos revelaram interação genótipos x ambientes (G x A). No modelo MTME, NUpE, em HN e LN, apresentou herdabilidades baixas com modas *a posteriori* iguais a 0,016 e 0,023, respectivamente. NUtE em HN apresentou herdabilidade alta (0,490), enquanto em LN foi moderadamente herdável (0,215). Optamos por adotar os valores genéticos obtidos a partir deste modelo, uma vez que análises combinadas geralmente representam melhor a realidade, levando-se em consideração um maior número de dados. Linhagens superiores para NUpE e NUtE foram identificadas e essa informação será considerada ao se planejar cruzamentos para a obtenção de variedades superiores.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; linhagens endogâmicas; eficiência na utilização de nitrogênio, eficiência na absorção de nitrogênio; algoritmo MCMC.

4.1. Introduction

Maize is the leading cereal crop in terms of production and, together with rice and wheat, it is one of the most important sources of the global population's daily caloric requirement (RANUM et al., 2014). Most of the maize planted in the tropics is grown in areas where soils are acidic and low in nutrients, especially nitrogen (N). Nitrogen plays an essential role in the cycle of most crops and maize requires a large amount of this nutrient. In tropical areas, together with drought, low N conditions represent the major cause of yield loss in maize (PINGALI and PANDEY, 2001). On the other hand, some economic and ecological impacts are attributed to excessive N fertilization. Consequently, it is important to improve the N-use efficiency of maize to avoid the environmental damage associated with excess N-based fertilizers, and to develop maize cultivars that perform better under low N conditions.

Nitrogen-use efficiency (NUE) is defined as grain yield per unit of N available in the soil and is composed of N-uptake efficiency (NUpE) and N-utilization efficiency (NUE) (MOLL et al., 1982). NUpE refers to the quantity of N absorbed by the plant relative to N in the soil, whereas NUE quantifies the amount of grain produced per unit of N uptake. Liu et al. (2010) found that a global average N recovery rate is almost 60%, indicating that two-fifths of N inputs are lost in ecosystems. In a recent review, Ciampitti et al. (2014) analyzed the available literature (from a period of over 100 years) on associations between maize yield and plant N dynamics to better understand the plant's nutrient uptake. They found that fertilizer N accounted for 40% of the total N required by tropical maize. The NUE can be increased through the improvement of NUE and NUpE. According to Gallais and Coque (2005), at low nitrogen (LN) input, variation in NUE is more important than variation in N uptake, whereas at high nitrogen (HN) input, the reverse is observed. This highlights the potential of selecting superior maize inbred lines for N use components in order to develop cultivars that are better able to extract the available N in the soil and better exploit that N to produce grain.

The selection of maize inbred lines that are superior for NUE and its components is complex, since they are controlled by many genes and are strongly affected by the environment. Several studies have shown that there is genetic variability for NUE in maize (PRESTERL et al., 2002; WORKU et al., 2007; WU et al., 2011) at low and high N levels. However, at low N conditions, there is an

increase in the heterogeneity of the fields, generally resulting in higher error variances and lower heritability estimates compared to high N levels (BAZINGER et al., 1997; PRESTERL et al., 2002; COQUE and GALLAIS, 2006). Thus, at low N, the genetic gains are usually lower than at high N. In addition, in experiments with maize under contrasting N levels have shown that there are significant interactions between genotype (G) and environment (N levels; E) for grain yield and NUE components (MOLL et al., 1987; BERTIN and GALLAIS, 2000; HIREL et al., 2001; COQUE and GALLAIS, 2006). Bazinger et al. (1997) concluded that maize breeding programs should include LN (low nitrogen level) environments to maximize selection gains when targeting tropical, low N environments. According to Presterl et al. (2002), the high variance in the G x E interaction emphasizes the need for multi-environment testing to identify N-use efficient cultivars with a broad adaptation to different N levels.

In plant breeding, the genetic evaluation of multiple traits is relevant because superior varieties combine optimal attributes for several traits simultaneously. Despite the fact that data collected in plant breeding studies often present a multi-trait multi-environment structure, these data are rarely analyzed in a combined analysis (MALOSETTI et al., 2008). Although combined analysis is a better representation of reality, as it takes into consideration the genetic correlations and the G x E interaction, it requires more complex models. In this context, Bayesian inference has become a useful statistical tool to deal with complex models. In the Bayesian approach, the parameters are interpreted as random variables, following the law of probability that reflects a priori knowledge assumption (HAYASHI and IWATA, 2013). The Bayesian approach has been successfully used due to the reduced number of biased estimates when there are few observations and furthermore, it produces more precise estimations by intervals (SORENSEN and GIANOLA, 2002). Some studies have shown the potential of the Bayesian approach for genetic evaluation in plant breeding with complex models such as multi-trait, multi-environment or multi-trait multi-environment models (CANE-RETAMALES et al., 2011; ARRIAGADA et al., 2012; MORA and SERRA, 2014; JUNQUEIRA et al., 2016). In a study on popcorn, Couto et al. (2015) concluded that a Bayesian model could produce more reliable results for the identification of genotypes with broad or specific adaptability than the frequentist model. Thus, the Bayesian

approach could be useful to select maize inbred lines for N-uptake efficiency and N-utilization efficiency at both low and high N levels.

The objectives of this study were therefore to use Bayesian inference to: (i) estimate genetic parameters for N-uptake efficiency and N-utilization efficiency under contrasting N levels in the soil; (ii) identify superior maize inbred lines for N-uptake efficiency and N-utilization efficiency; (iii) propose a multi-trait multi-environment model under a Bayesian approach.

4.2. Material and Methods

4.2.1. Plant Material

The genetic material consisted of 64 tropical maize inbred lines. The maize inbred lines represent a set of diverse germoplasm from the maize breeding program of Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais state, Brazil. They were obtained from different sources of tropical maize germoplasm: commercial maize hybrids, maize populations and maize open-pollinated varieties.

4.2.2. Field Experiments

The 64 tropical maize inbred lines were evaluated in 2014 at UFV Experimental Station in Coimbra (latitude 20°51'24"S; longitude 42°48'10"W; altitude of 720 m asl), located in southwest Minas Gerais state, Brazil. Maize inbred lines were evaluated in two independent experiments under contrasting levels of N: low nitrogen (LN) and high nitrogen (HN). The design of each experiment was an 8 x 8 lattice square with two replications and two-row plots. The plot size was 6.4 m² (4 m long with 0.8 m row spacing and 0.2 m plant spacing). At the LN level, 30 kg ha⁻¹ of N was applied. At the HN level, 180 kg ha⁻¹ was applied. Trait management was the same for all N level experiments, employing standard agricultural practices.

Grain yield was recorded from all ears on the plot at physiological maturity. Ears were shelled, the grain weight and grain moisture percentage were recorded, and grain yield (kg ha⁻¹) was calculated at 145 g kg⁻¹ moisture. At physiological maturity, five representative plants were harvested from each plot by cutting them close to the soil surface. All plant stover together with cobs (with kernels removed) at maturity were chopped and oven-dried to a constant weight at 70°C for 72 hours. The harvest ears were also oven-dried at 70°C for 72 hours. Grain and stover samples

were milled using an analytical mill and analyzed for N according to the Kjeldahl method (BEMNER and MULVANEY, 1982).

The components of NUE were calculated according to Moll et al. (1982): N-uptake efficiency was calculated as the ratio of the total N (kg ha⁻¹) in the aboveground biomass to total N in the soil (kg ha⁻¹) and N-utilization efficiency was calculated as the ratio of grain yield (kg ha⁻¹) to total N (kg ha⁻¹) in the aboveground biomass.

4.2.3. Statistical Analysis

N-uptake efficiency and N-utilization efficiency were analyzed using single and multi-trait models via the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Bayesian approach. The idea was to compare: (i) the full model (considering the interaction between the genotypes and N levels) with the null model (not considering the interaction); (ii) the estimates of the genetic parameters from single- and multi-trait models at LN and HN levels.

The multi-trait multi-environment model was given by:

$$y = X\beta + Z_1r + Z_2b + Z_3u + \varepsilon \quad (1)$$

Which can be rewritten as:

$$(2) \quad \begin{pmatrix} Y_1 \\ \dots \\ Y_2 \end{pmatrix} = X \begin{pmatrix} \beta(\ell,1) \\ \beta(h,1) \\ \dots \\ \beta(\ell,2) \\ \beta(h,2) \end{pmatrix} + Z_1 \begin{pmatrix} r_1(\ell,1) \\ r_2(h,1) \\ \dots \\ r_1(\ell,2) \\ r_2(h,2) \end{pmatrix} + Z_2 \begin{pmatrix} b_{11}(\ell,1) \\ \vdots \\ b_{82}(h,1) \\ \dots \\ b_{11}(\ell,2) \\ \vdots \\ b_{82}(h,2) \end{pmatrix} + Z_3 \begin{pmatrix} u(\ell,1) \\ u(h,1) \\ \dots \\ u(\ell,2) \\ u(h,2) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon(\ell,1) \\ \varepsilon(h,1) \\ \dots \\ \varepsilon(\ell,2) \\ \varepsilon(h,2) \end{pmatrix}$$

Where: ℓ represents low and h represents high N; 1 represents NUpE and 2 represents NUtE; y is the vector of the phenotypic values of the traits (NUpE and NUtE); β is the vector of systematic effects of environment (N levels), $\beta \sim N(\mu, I \otimes \Sigma_\beta)$; r is the vector of the replication inside the environment effect, $r \sim N(0, I \otimes \Sigma_r)$; b is the vector of random effects of block inside replication inside environment, $b \sim N(0, I \otimes \Sigma_b)$; u is the vector of random effects of genotypes,

$\mathbf{u} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I} \otimes \Sigma_u)$; ε is the vector of random residual effects, $\varepsilon \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I} \otimes \Sigma_\varepsilon)$. $\mathbf{X}$ is the incidence matrix of environment (N level) effects, $\mathbf{Z}_1$ is the incidence matrix of replication inside the environment effect, $\mathbf{Z}_2$ is the incidence matrix of block inside replication inside environment effects and $\mathbf{Z}_3$ is the incidence matrix of genotype effects.

The (co)variance matrix estimates are given by:

$$\begin{aligned} \Sigma_u &= \begin{pmatrix} \overset{2}{\sigma_{u\ell(1)}} & \sigma_{u\ell,h(1)} & \cdots & \sigma_{u\ell(1,2)} & \sigma_{u\ell,h(1,2)} \\ \sigma_{u\ell,h(1)} & \overset{2}{\sigma_{uh(1)}} & \cdots & \sigma_{u\ell,h(1,2)} & \sigma_{uh(1,2)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ \sigma_{u\ell(1,2)} & \sigma_{u\ell,h(1,2)} & \cdots & \overset{2}{\sigma_{u\ell(2)}} & \sigma_{u\ell,h(2)} \\ \sigma_{u\ell,h(1,2)} & \sigma_{uh(1,2)} & \cdots & \sigma_{u\ell,h(2)} & \overset{2}{\sigma_{uh(2)}} \end{pmatrix} & \Sigma_r &= \begin{pmatrix} \overset{2}{\sigma_{r\ell(1)}} & \sigma_{r\ell,h(1)} & \cdots & \sigma_{r\ell(1,2)} & \sigma_{r\ell,h(1,2)} \\ \sigma_{r\ell,h(1)} & \overset{2}{\sigma_{rh(1)}} & \cdots & \sigma_{r\ell,h(1,2)} & \sigma_{rh(1,2)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ \sigma_{r\ell(1,2)} & \sigma_{r\ell,h(1,2)} & \cdots & \overset{2}{\sigma_{r\ell(2)}} & \sigma_{r\ell,h(2)} \\ \sigma_{r\ell,h(1,2)} & \sigma_{rh(1,2)} & \cdots & \sigma_{r\ell,h(2)} & \overset{2}{\sigma_{rh(2)}} \end{pmatrix} \\ \Sigma_b &= \begin{pmatrix} \overset{2}{\sigma_{b\ell(1)}} & \sigma_{b\ell,h(1)} & \cdots & \sigma_{b\ell(1,2)} & \sigma_{b\ell,h(1,2)} \\ \sigma_{b\ell,h(1)} & \overset{2}{\sigma_{bh(1)}} & \cdots & \sigma_{b\ell,h(1,2)} & \sigma_{bh(1,2)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ \sigma_{b\ell(1,2)} & \sigma_{b\ell,h(1,2)} & \cdots & \overset{2}{\sigma_{b\ell(2)}} & \sigma_{b\ell,h(2)} \\ \sigma_{b\ell,h(1,2)} & \sigma_{bh(1,2)} & \cdots & \sigma_{b\ell,h(2)} & \overset{2}{\sigma_{bh(2)}} \end{pmatrix} & \Sigma_\varepsilon &= \begin{pmatrix} \overset{2}{\sigma_{\varepsilon\ell(1)}} & \sigma_{\varepsilon\ell,h(1)} & \cdots & \sigma_{\varepsilon\ell(1,2)} & \sigma_{\varepsilon\ell,h(1,2)} \\ \sigma_{\varepsilon\ell,h(1)} & \overset{2}{\sigma_{\varepsilon h(1)}} & \cdots & \sigma_{\varepsilon\ell,h(1,2)} & \sigma_{\varepsilon h(1,2)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ \sigma_{\varepsilon\ell(1,2)} & \sigma_{\varepsilon\ell,h(1,2)} & \cdots & \overset{2}{\sigma_{\varepsilon\ell(2)}} & \sigma_{\varepsilon\ell,h(2)} \\ \sigma_{\varepsilon\ell,h(1,2)} & \sigma_{\varepsilon h(1,2)} & \cdots & \sigma_{\varepsilon\ell,h(2)} & \overset{2}{\sigma_{\varepsilon h(2)}} \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Where: ℓ represents LN and h represents HN; 1 represents NUpE and 2 represents NUtE. We assumed that the variance-covariance matrices follow an inverted Wishart distribution, which was used as a priori to model the variance-covariance matrix (VAN TASSELL and VAN VLECK, 1996).

The model was implemented in the “MCMCglmm” R package (HADFIELD, 2010; HADFIELD and NAKAGAWA, 2010) of R software (R Development Core Team, 2016). A total of 1,000,000 samples were generated, and assuming a burn-in period and sampling interval of 500,000 and 5 iterations, respectively, this resulted in a final total of 100,000 samples. The convergence of MCMC was checked by the criterion of Geweke (1992), which was performed using the “boa” (SMITH, 2007) and “CODA” (convergence diagnosis and output analysis; PLUMMER et al., 2006) R packages.

The full (considering the inbred lines x N levels interaction) models were compared with the null (not considering the interaction) models by the deviance information criterion (DIC) proposed by Spiegelhalter et al. (2002): $DIC = D(\bar{\theta}) + 2p_D$, where $D(\bar{\theta})$ is a point estimate of the deviance obtained by replacing the parameters with their posterior means estimates in the likelihood function and p_D is the effective number of parameters in the model. Models with smaller DIC should be preferred to models with higher DIC.

Variance components, broad-sense heritability *per plot*, coefficients of residual and genetic variation, the variation index and the genotypic correlation coefficients between traits and breeding values were calculated from the posterior distribution. The package “boa” of R software was used to calculate the highest posterior density (HPD) intervals for all parameters. Posterior estimates for the broad-sense heritability of NUpE and NUtE for each interaction were calculated from the posterior samples of variance components obtained by the model, using the expression:

$$h^{2(i)} = \frac{\sigma_g^{2(i)}}{\left(\sigma_g^{2(i)} + \sigma_r^{2(i)} + \sigma_b^{2(i)} + \sigma_\varepsilon^{2(i)} \right)},$$

Where: $\sigma_g^{2(i)}$, $\sigma_r^{2(i)}$, $\sigma_b^{2(i)}$ and $\sigma_\varepsilon^{2(i)}$ are the genetic, replication, block inside replication and residual variances for each iteration, respectively. The genetic association between the pairs of traits in each environment was calculated as:

$$r_{\ell(1,2)} = \frac{\sigma_{g\ell(1,2)}}{\sqrt{\sigma_{g\ell(1)}\sigma_{g\ell(2)}}} \text{ (genetic correlation between traits at LN level)}$$

$$\text{and } r_{h(1,2)} = \frac{\sigma_{gh(1,2)}}{\sqrt{\sigma_{gh(1)}\sigma_{gh(2)}}} \text{ (genetic correlation between traits at HN level).}$$

4.3. Results and Discussion

All chains achieved convergence via the criterion of Geweke (1992). According to the deviance information criteria (DIC), there was positive evidence of interactions between inbred lines and N levels for all models analyzed (Table 1). The inbred lines x N levels interaction for plant traits indicates that the best genotypes

under LN are not the same as at an HN level (MEDICI et al., 2005). Thus, when selecting maize inbred lines, the target environment must be considered.

Table 1 Deviance information criteria for the full (considering G x E interaction) and null (not considering the interaction) models.

Model	Trait ^{1/}	Deviance information criteria (DIC)	
		Full model	Null model
Multi-trait	NUpE, NUtE	604.79	1958.81
Single-trait	NUpE	102.42	197.35
Single-trait	NUtE	226.89	1814.98

^{1/}NUpE (N-uptake efficiency, kg ha⁻¹ of N absorbed/kg ha⁻¹ of N supply); NUtE (N-utilization efficiency, kg ha⁻¹ of grain/kg ha⁻¹ of N in the plant at maturity).

For the full model, the average values for NUpE were 0.499 and 2.103, and for NUtE were 28.842 and 30.318, under HN and LN, respectively (Table 2). In the multi-trait multi-environment (MTME) model, NUpE at HN and LN were found to be weakly heritable with Bayesian credible intervals (probability of 95%): $h^2 = 4.177 \times 10^{-5} - 0.090$ and $h^2 = 6.644 \times 10^{-5} - 0.135$, posterior modes: $h^2 = 0.016$ and $h^2 = 0.023$, at HN and LN, respectively. The NUtE at HN was found to be highly heritable whereas at LN it was moderately heritable, with credible intervals (probability of 95%) ranging from: $h^2 = 0.240 - 0.674$ and $h^2 = 0.084 - 0.396$, posterior modes: $h^2 = 0.490$ and $h^2 = 0.215$, respectively. The difference between mean, mode and median heritability estimates (Table 2 and Table 3) reflects some lack of symmetry in the posterior distribution estimates (MORA and SERRA, 2014). In our study, we found higher heritability for NUpE at LN and higher heritability for NUtE at HN level. In a study on maize hybrids in three N levels, Presterl et al. (2002) also found that, for NUpE, the estimates of heritability (h^2) increased with a decrease in N level, whereas for NUtE, the highest heritability was estimated at an HN level.

Table 2 Posterior inferences for the mean and genetic variance; the mode, mean, median and higher posterior density (HPD) interval of the broad-sense heritability; and the mode, mean, median and higher posterior density (HPD) interval of the genetic correlation, considering the proposed multi-trait multi-environment model.

Trait ^{1/}	N level	Mean	σ_g^2	h^2			HPD (95%)	
				Mode	Mean	Median	Lower	Upper
NUpE	HN	0.499	0.095	0.016	0.038	0.032	4.177E-05	0.090
NUpE	LN	2.103	0.183	0.023	0.057	0.049	6.644E-05	0.135
NUtE	HN	28.842	40.323	0.490	0.463	0.475	0.240	0.674
NUtE	LN	30.318	27.534	0.215	0.233	0.229	0.084	0.396
				Genotypic correlation			HPD (95%)	
				Mode	Mean	Median	Lower	Upper
NUpExNUtE	HN	-	-	-0.052	-0.051	-0.052	-0.330	0.241
NUpExNUtE	LN	-	-	0.018	-0.002	-0.003	-0.328	0.338

^{1/}NUpE (N-uptake efficiency, kg ha⁻¹ of N absorbed/kg ha⁻¹ of N supply); NUtE (N-utilization efficiency, kg ha⁻¹ of grain/kg ha⁻¹ of N in the plant at maturity).

In the current study, the posterior mean of the genetic correlation between NUpE and NUtE was not significantly different from zero (95% credible intervals) under both N levels (HN: -0.330 to 0.241; LN: -0.328 to 0.338) (Table 2). Although some studies consider NUpE and NUtE to be not independent from a statistical point of view, in the present study the opposite was observed. Presterl et al. (2002) evaluated N-utilization efficiency and N-uptake efficiency in two sets of maize hybrids, one produced from crosses among maize inbred lines selected at HN and another set of hybrids from inbred lines selected at LN. The authors found that at LN, for hybrids from lines selected at HN, N-utilization efficiency was positively related to NUpE, whereas at HN, it was negatively and highly related to NUpE. However, for hybrids from lines selected at LN, there was no correlation among components of NUE and both components of NUE were independent. Bertin and Gallais (2000) also found that the genetic correlation between components of NUE was not significant and each was approximately equally related to NUE. Thus, for maize inbred lines, NUpE cannot be used for indirect selection of NUtE, and vice versa, and the genetic improvement for NUE in maize breeding programs should consider the improvement of NUtE and NUpE.

For the single- and multi-trait models, the means estimates for NUpE and NUtE were always higher in LN inputs than in HN (Table 2 and Table 3), with a more pronounced difference between environments for NUpE than NUtE. Gallais

and Coque (2005) reported that NUE is higher at LN level than at HN level and this is due to the fact that the efficiency of N decreases as the fertilization level increases. These authors also mentioned that *quantitative trait loci* (QTL) studies tend to confirm that variation in NUtE is greater than variation in NUpE at LN environments and the opposite occurs at HN environments. In the present study, the genetic variance was greater for NUpE in LN and greater for NUtE in HN (Table 3). These different values between the environments (N levels) may be due to the biological response of the inbred lines to the nutritional N stress. Gallais and Hirel (2004) verified that the genes responsible for the control of NUE are expressed according to the availability of the nutrient to the plant and consequently, the magnitude of genetic variability is expressed differently in contrasting environments. It was noticed here that posterior inferences for the genetic parameters obtained through the multi-trait model were very similar to the ones obtained through the single-trait models (Table 2 and Table 3).

Table 3 Posterior inferences for the mean and genetic variance; the mode, mean, median and higher posterior density (HPD) interval of the broad-sense heritability, considering the single-trait multi-environment models.

Trait	N level	Mean	σ_g^2	h^2			HPD (95%)	
				Mode	Mean	Median	Lower	Upper
NUpE	HN	0.492	0.051	0.014	0.039	0.033	1.227E-05	0.095
NUpE	LN	2.111	0.156	0.067	0.092	0.084	2.064E-04	0.199
NUtE	HN	28.872	40.854	0.500	0.462	0.476	0.223	0.673
NUtE	LN	30.336	29.320	0.226	0.239	0.235	0.081	0.411

¹/NUpE (N-uptake efficiency, kg ha⁻¹ of N absorbed/kg ha⁻¹ of N supply); NUtE (N-utilization efficiency, kg ha⁻¹ of grain/kg ha⁻¹ of N in the plant at maturity).

One of the advantages of Bayesian methods is the ability to access the posterior density intervals of genetic parameters (Fig. 1 and Fig. 2). The breeding values of the maize inbred lines for each trait and their highest posterior density (HPD) intervals were obtained and were used to assist in the selection of genotypes.

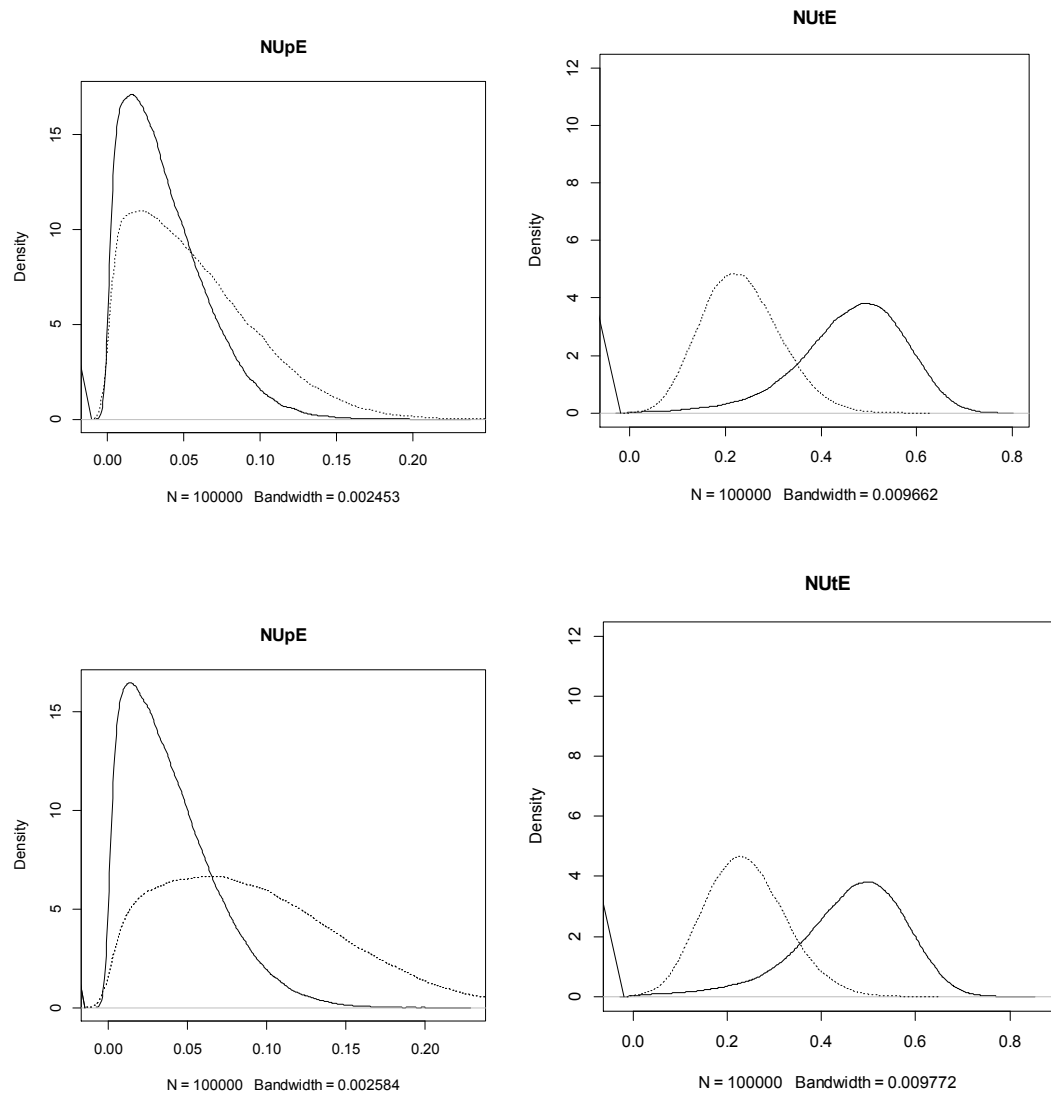


Figure 1 Posterior density for the multi-trait multi-environment model above (left: NUpE and right: NUtE) and for each of the single-trait multi-environment models below (left: NUpE and right: NUtE). The solid line represents the posterior density for the HN level, while the dotted line represents the posterior density for the LN level.

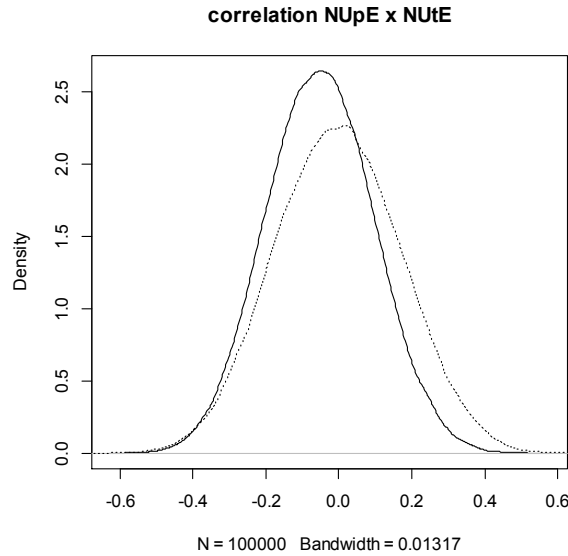


Figure 2 Posterior density for the genotypic correlation between the traits nitrogen-uptake efficiency (NUpE) and nitrogen-utilization efficiency (NUtE) for the multi-trait multi-environment model. The solid line represents the posterior density for the HN level, while the dotted line represents the posterior density for the LN level.

The relative variation index is the ratio of the coefficient of genotypic variation to the coefficient of residual variation (CV_g/CV_e). Relative variation indices that are greater than the unit suggest that genetic variation is more influential than residual variation. This was observed in this study for both traits but only in HN input, suggesting that there was a greater influence of the residual variation under low N level than high N level. Highest CV_e and CV_g were observed for NUpE in HN input, whereas lowest CV_g was observed for NUtE in LN input (Table 4).

Table 4 Coefficient of residual variation (CVe, %), coefficient of genotypic variation (CVg, %) and relative variation index (CVg/CVe) for the multi-trait multi-environment model and the single-trait multi-environment models.

Model	Trait	N level	CVe (%)	CVg (%)	CVg/CVe
Multi-trait	NUpE	HN	51.36	61.66	1.20
	NUpE	LN	21.61	20.35	0.94
	NUtE	HN	19.53	22.02	1.13
	NUtE	LN	29.49	17.31	0.59
Single-trait	NUpE	HN	38.31	45.67	1.19
	NUpE	LN	19.18	18.74	0.98
	NUtE	HN	19.57	22.14	1.13
	NUtE	LN	29.33	17.85	0.61

¹NUpE (N-uptake efficiency, kg ha⁻¹ of N absorbed/kg ha⁻¹ of N supply); NUtE (N-utilization efficiency, kg ha⁻¹ of grain/kg ha⁻¹ of N in the plant at maturity).

We adopted the MTME model for the inbred lines selection, since a combined analysis takes more data into consideration and consequently is often more accurate to predict breeding values than single models (PIEPHO and MOHRING, 2007; VIANA et al., 2012). According to Thompson and Meyer (1986), the increase in accuracy with the use of multi-trait best linear unbiased prediction (BLUP) analysis compared with single-trait analysis is proportional to the difference between the genetic and environmental correlations of the analyzed traits. In order to compare the ranking of the most efficient tropical maize inbred lines between multi- and single-trait models for each trait in a given environment, the percentage of coincidence of the top 10 inbred lines list (not considering their order in the list) was calculated. For NUpE the coincidence percentage between models was 80% and 70% at LN and HN, respectively. The coincidence percentage for NUtE was 100% under both N levels. The high percentage of coincidence between rankings of the multi- and single-trait models may be, as already mentioned, due to the fact that the genetic correlation between the traits was not significant. Genetic merit estimates of individuals, whether or not they consider genomic information, are in general estimated more accurately when they are based on analyses that consider all the traits simultaneously – that is, under a multivariate approach (SILVA et al., 2011; AZEVEDO et al., 2013). In a study with popcorn half-sib families, Viana et al. (2010) found that multi-trait BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) was more accurate and efficient in family selection than single-trait BLUP. The effect of the G

$G \times E$ interaction was significant, which indicates that the maize inbred lines responded differently to N levels. In order to compare the ranking of inbred lines between the environments (HN and LN) for each trait in a given model, the percentage of coincidence of the top 10 inbred lines list was calculated as described above. For the trait NUpE, 20% and 30% of coincidence between N levels was observed for the multi-trait and single-trait models, respectively, whereas for NUtE, the coincidence was 100% for both models. This result suggests that the trait NUpE was more influenced by the N level than NUtE.

Superior inbred lines in a given environment (N level) for a given trait were identified through the breeding values obtained in the MTME analysis. The superior inbred lines presented greater breeding values for the given trait. The inbred lines that stood out from the others for NUpE were, at the HN level, VML010, VML017, VML077, VML014, VML037, VML009, VML016, VML032, VML005, VML040, whereas at the LN level, VML017, VML051, VML016, VML002, VML033, VML019, VML022, VML188, VML048 and VML034 presented good performances compared to the other inbred lines. For NUtE, the most efficient maize inbred lines were VML081, VML022, VML183, VML032, VML051, VML016, VML020, VML027, VML028 and VML013 for both N levels. Another observation that must be reported is that the VML016 inbred line was the only one that appeared in the top 10 list for both traits in the two considered N levels, possibly constituting an important source of genes for NUE traits.

4.4. Conclusions

In this study, N-uptake efficiency and N-utilization efficiency were found to be influenced by the $G \times E$ interaction. NUpE was not significantly genetically correlated to NUtE in HN and LN environments. Plant breeders often deal with data involving a group of genotypes that are evaluated for multiple traits across a range of environments, so this study demonstrates the use of a multi-trait rather than single-trait model and brings a new perspective on the application of Bayesian methods to plant breeding.

The panel of inbred lines evaluated presents genetic variability, which is fundamental for the selection and improvement of traits of interest. This variability is particularly important in low nitrogen environments, which is the condition that most

small farmers that grow maize in the tropics experience. Considering the results of this study, the next step is to cross maize inbred lines selected for N-uptake efficiency and N-utilization efficiency and to evaluate the hybrids produced.

4.5. References

ARRIAGADA, O.; MORA, F.; DELLAROSA, J. C.; FERREIRA, M.F.S.; CERVIGNI, G.D.L; Schuster I. Bayesian mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling soybean cyst nematode resistant. *Euphytica*, v.186, n.3, p.907-917, 2012.

AZEVEDO, C. F.; SILVA, F. F.; RESENDE, M. D. V.; PETERNELLI, L. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S. Quadrados mínimos parciais uni e multivariado aplicados na seleção genômica para características de carcaça em suínos. *Ciência Rural*, v.43, n.9, p.1642-1649, 2013.

BAZINGER, M.; BETRAN, F.J.; LAFITTE, H.R. Efficiency of high-nitrogen selection environments for improving maize for low-nitrogen target environments. *Crop Science*, v. 37, p.1103-1109, 1997.

BERTIN, P.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen use efficiency in a set of recombinant inbred lines. I. Agrophysiological results. *Maydica*, v.45, p.53-66, 2000.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.A.; KEENEY, D.R. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Madison:American Society of Agronomy, 1982. p. 595-624.

CANÉ-RETAMALES, C.; MORA, F.; VARGAS-REEVE, F.; PERRET, S.; CONTRERAS-SOTO, R. Bayesian threshold analysis of breeding values, genetic correlation and heritability of flowering intensity in *Eucalyptus cladocalyx* under arid conditions. *Euphytica*, v.178, p.177-183, 2011.

CIAMPITTI, I.A.; VYN, T.J. Understanding Global and Historical Nutrient Use Efficiencies for Closing Maize Yield Gaps. *Agronomy Journal*, v.106, n.6, p.2107-2117, 2014.

COQUE, M.; GALLAIS, A. Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, v.112, n.7, p.1205-1220, 2006

COUTO, M.F.; NASCIMENTO, M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do; SILVA, F.F.; VIANA, A.P.; VIVAS, M. Eberhart and Russell's Bayesian Method in the Selection of Popcorn Cultivars. *Crop Science*, v. 55, n.2, p. 571-577, 2015.

GALLAIS, A.; COQUE, M. Genetic variation and selection for nitrogen use efficiency in maize: a synthesis. *Maydica*, v.50, n.3, p.531-547, 2005.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 396, p. 295-306, 2004.

GEWEKE, J. Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments. In: BERNARDO, J. M.; BERGER, J. O.; DAWID, A. P.; SMITH, A.F.M. (Ed.) *Bayesian statistics 4*. Oxford: Clarendon, 1992. p. 625-631.

HADFIELD, J. MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package. *Journal of Statistical Software*, v.33, p.1-22, 2010.

HADFIELD, J. D.; NAKAGAWA, S. General quantitative genetic methods for comparative biology: phylogenies, taxonomies and multi-trait models for continuous and categorical characters. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 23, p.494-508, 2010.

HAYASHI, T.; IWATA, H. A Bayesian method and its variational approximation for prediction of genomic breeding values in multiple traits. *BMC bioinformatics*, v.14, n.1, p.34, 2003.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTACNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology*, v.125, n.3, p.1258-1270, 2001.

JUNQUEIRA, V.S.; PEIXOTO, L.A.; GALVÊAS LAVIOLA, B.; BHERING, L.L.; MENDONÇA, S.; COSTA, T.S.A.; ANTONIASSI, R. Bayesian Multi-Trait Analysis Reveals a Useful Tool to Increase Oil Concentration and to Decrease Toxicity in *Jatropha curcas* L.. *Plos One*, v.11, n.6, 2016. Disponível em: doi:10.1271/journal.pone.0157038. Acesso em: 8 ago. 2016.

LIU, J.; YOU, L.; AMINI, M.; OBERSTEINER, M.; HERRERO, M.; ZEHNDER, A.J.B.; YANG, H. A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.107, n.17, p.8035-8040, 2010.

MALOSETTI, M.; RIBAUT J.M.; VARGAS, M.; CROSSA J.; VAN EEUWIJK, F.A. A multi-trait multi-environment QTL mixed model with application to drought and nitrogen stress traits in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, v.161, p.241-257, 2008.

MEDICI, L.O.; PEREIRA, M.B.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Identification of maize lines with contrasting responses to applied nitrogen. *Journal of Plant Nutrition*, v.28, n.5, p.903-915, 2005.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, v.74, n.3, p.562-564, 1982.

MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.J.; JACKSON, W.A. Development of nitrogen efficient prolific hybrids of maize. *Crop Science*, v.27, p.181-186, 1987.

MORA, F.; SERRA, N. Bayesian estimation of genetic parameters for growth, stem straightness, and survival in *Eucalyptus globulus* on an Andean Foothill site. *Tree Genetics and Genomes*, v.10, p.711-719, 2014.

PIEPHO, H.P.; MOHRING, J. Computing Heritability and Selection Response From Unbalanced Plant Breeding Trials. *Genetics*, v.177, p.1881-1888, 2007.

PINGALI, P.L.; PANDEY, S. (2001). World Maize Needs Meeting: Technological Opportunities and Priorities for the Public Sector. In: PINGALI, P.L. (Ed.). *1999-2000 World Maize Facts and Trends. Meeting World Maize Needs: Technological opportunities and Priorities for the Public Sector*. Mexico: CIMMYT, 2001. p.1-24.

PLUMMER, M.; BEST, N.; COWLES, K.; VINES, K. CODA: Convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R news*, v.6, n.1, p.7–11, 2006.

PRESTERL, T.; SEITZ, G.; LANDBECK, M.; THIEMT, E. M.; SCHMIDT, W.; GEIGER, H. H. Improving Nitrogen-Use Efficiency in European Maize: Estimation of Quantitative Genetic Parameters. *Crop Science*, v.43, p.1259–1265, 2003.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 5 fev. 2016.

RANUM, P.; PENA-ROSAS, J.P.; GARCIA-CASAL, M.N. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1312, p.105-112, 2014.

SILVA, F.F.; ROSA, G.J.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; DE LOS CAMPOS, G. Three-step Bayesian factor analysis applied to QTL detection in crosses between outbred pig populations. *Livestock Science*, v.142, p.210-215, 2011.

SMITH, B.J. boa: an R package for MCMC output convergence assessment and posterior inference. *Journal of Statistical Software*, v.21, n.11, p.1–37, 2007.

SORENSEN, D. A.; GIANOLA, D. Likelihood, Bayesian and MCMC methods in quantitative genetics: statistics for biology and health. New York: Springer-Verlag, 2002. 740p.

SPIEGELHALTER, D. J.; BEST, N.G.; CARLIN B.P.; VAN DER LINDE, A. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society*, v.64, p.583–640, 2002.

SUTTON, M.A.; BLEEKER, A. Environmental science: The shape of nitrogen to come. *Nature | News & Views*, v.494, p.435-437, 2013.

THOMPSON, R.; MEYER, K. A review of theoretical aspects in the estimation of breeding values for multi-trait selection. *Livestock Production Science*, v.15, n.4, p.299-313, 1986.

VAN TASSEL, C.P.; VAN VLECK, L.D. Multiple-trait Gibbs sampler for animal models: flexible programs for Bayesian and likelihood-based (co)variance component inference. *Journal of Animal Science*, v.74, p.2586-2597, 1996.

VIANA, J.M.S.; SOBREIRA, F.M.; RESENDE, M.D.V.; FARIA, V.R. Multi-trait BLUP in half-sib selection of annual crops. *Plant Breeding*, v.129, p.599-604, 2010.

VIANA, J.M.S.; DELIMA, R.O.; FARIA, V.R.; MUNDIM, G.B.; RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F. Relevance of Pedigree, Historical Data, Dominance, and Data Unbalance for Selection Efficiency. *Agronomy Journal*, v. 104, p.722-728, 2012.

WORKU, M.; BAZINGER, M.; SCHULTE, G.; FRIESEN, D.; DIALLO, A.O.; HORST, W.J. Nitrogen uptake and utilization in contrasting nitrogen efficient tropical maize hybrids. *Crop Science*, v.47, p. 519-528, 2007.

WU, Y.; LIU, W.; LI, X.; LI, M.; ZHANG, D.; HAO, Z.; WENG, J.; XU, Y.; ZHANG, S.; XIE, C. Low-nitrogen stress tolerance and nitrogen agronomic efficiency among maize inbreds: comparison of multiple indices and evaluation of genetic variation. *Euphytica*, v.180, p.281-290, 2011.

5. Conclusões Gerais

Os painéis de linhagens endogâmicas de milho tropical estudados, em ambos os capítulos, apresentaram variabilidade genética para os caracteres avaliados; portanto apresentam potencial para serem utilizados para fins de melhoramento genético.

Quanto à interação genótipos x ambientes (linhagens x doses de N), no Capítulo 1 observou-se efeito significativo ($P < 0,05$) para os caracteres MPAS e MTS. Estudos de diversidade genética apresentaram diferentes agrupamentos de linhagens para cada nível de N, evidenciando a importância de considerar os ambientes separadamente no ato da seleção de genótipos. No Capítulo 2, de acordo com o Critério de Informação dos Desvios (DIC), NUpE e NUtE foram influenciados pela interação genótipos x ambientes em todos os modelos testados.

Linhagens promissoras foram identificadas para importantes caracteres de raiz e componentes da eficiência no uso de N, nos Capítulos 1 e 2, respectivamente. Como mencionado na Introdução Geral, das 150 e 64 linhagens presentes nos experimentos dos Capítulos 1 e 2, respectivamente, 42 estiveram presentes em ambos os experimentos. As linhagens que foram destaque no Capítulo 1, para caracteres de raiz, e que também estão presentes no Capítulo 2: VML009, VML022 e VML076. Dentre estas, destacou-se no Capítulo 2 a VML022, que foi a 7ª e 19ª linhagem mais eficiente na absorção de N, e a 3ª e 2ª linhagem mais eficiente na utilização de N, em baixo e alto N, respectivamente. Já a linhagem VML016, destaque no Capítulo 2 para eficiência na absorção e utilização em ambos os níveis de N, no Capítulo 1 ela foi a 24ª e 30ª com maior comprimento radicular total, em baixo e alto N, respectivamente; e a 19ª com maior massa radicular seca, tanto em baixo quanto em alto N. Essas informações serão de grande importância para o planejamento e orientação dos futuros cruzamentos entre as linhagens do Programa de Melhoramento de Milho – Programa Milho UFV visando à obtenção de híbridos eficientes no uso de N.