

GEÍSA PINHEIRO PAES

**DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E MAPEAMENTO ASSOCIATIVO EM  
POPULAÇÕES DE MILHO-PIPOCA RELACIONADAS POR CICLOS DE  
SELEÇÃO**

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  
2014

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

T

Paes, Geísa Pinheiro, 1985-  
P126d Desequilíbrio de ligação e mapeamento associativo em  
2014 populações de milho-pipoca relacionadas por ciclos de seleção /  
Geísa Pinheiro Paes. – Viçosa, MG, 2014.  
ix, 48f. : il. ; 29 cm.

Orientador: José Marcelo Soriano Viana.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.27-32.

1. Milho - Qualidade. 2. Milho - Melhoramento genético.  
3. Desequilíbrio de fase gamética. 4. SNP. 5. Detecção de QTL.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-graduação em Genética e  
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 635.677

GEÍSA PINHEIRO PAES

**DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E MAPEAMENTO ASSOCIATIVO EM  
POPULAÇÕES DE MILHO-PIPOCA RELACIONADAS POR CICLOS DE  
SELEÇÃO.**

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: 27 de fevereiro 2014

---

Moisés Nascimento

---

Fabyano Fonseca e Silva  
(Coorientador)

---

José Marcelo Soriano Viana  
(Orientador)

*Aos meus pais, Francisco e Maria Aparecida,*

*Aos meus irmãos, Sabrina e Fabiano,*

*Ao meu marido, Rodrigo,*

*A todos meus familiares e amigos.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por guiar e iluminar meus passos.

Ao Mestre Meishu-Sama pelos Seus ensinamentos que me tornam a cada dia uma pessoa melhor, pela proteção e pela permissão de todas as conquistas ao longo da minha vida.

Aos meus pais, Francisco e Maria Aparecida, pelo amor incondicional e por acreditarem sempre que sou capaz.

Aos meus irmãos, Sabrina e Fabiano, pelo carinho e pelo apoio.

Ao meu marido Rodrigo, pelo seu amor, paciência, confiança e por sua vontade em me fazer feliz sempre.

Aos meus demais familiares e a todos os amigos, pelo incentivo e pela amizade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Professor José Marcelo Soriano Viana, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim para realização deste projeto, pela paciência para enfrentar os obstáculos e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao professor Fabyano Fonseca e Silva e ao professor Moysés Nascimento pela disponibilidade de participação na banca e pelas sugestões que contribuíram enormemente.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, Éder, Telma e Paulo Mafra, pela ótima convivência e pela amizade. Ao Ciro Maia pela enorme ajuda e incentivo durante a realização dos trabalhos, além da sua grande amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC), pela recepção, colaboração e valiosas sugestões.

Aos funcionários, Leonardo e Márcio, pelo apoio na condução do experimento. Em especial, ao colega Gabriel, pelo apoio e pela dedicação para com os experimentos de campo e aos estagiários, Leonardo, Vinícius, Yasmim e Manu pela ajuda durante a fenotipagem do material.

A todos meus colegas da Pós Graduação em Genética e Melhoramento pelos momentos de estudos e troca de conhecimentos.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação profissional.

**MUITO OBRIGADA!**

## **BIOGRAFIA**

GEÍSA PINHEIRO PAES, filha de Francisco de Sales Paes e Maria Aparecida Pinheiro Paes, nasceu em 31 de agosto de 1985, em Ponte Nova/MG.

Estudou na Escola Municipal José Maria da Fonseca e concluiu o Ensino Médio no Colégio Equipe de Ponte Nova em 2003.

Em maio de 2006 iniciou o curso de Graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em julho de 2011.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
POPULAÇÕES.....	12
EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	12
GENOTIPAGEM.....	13
FENOTIPAGEM.....	15
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
ALTERAÇÕES DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.....	17
ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	19
MAPEAMENTO ASSOCIATIVO.....	22
AGRADECIMENTOS.....	25
REFERÊNCIAS .....	26
FIGURA.....	32
TABELAS.....	36

## RESUMO

PAES, Geísa Pinheiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Desequilíbrio de ligação e mapeamento associativo em populações de milho-pipoca relacionadas por ciclos de seleção.** Orientador: José Marcelo Soriano Viana. Coorientadores: Fabyano Fonseca e Silva e Eveline Teixeira Caixeta.

Desequilíbrio de ligação (LD) é definido como a associação não aleatória entre alelos de diferentes locos em uma população e mapeamento associativo (MA) refere-se à associação estatística significativa entre o marcador molecular e a característica fenotípica. Os objetivos deste trabalho foram: (1) estimar o desequilíbrio de ligação em populações de milho pipoca relacionadas por ciclos de seleção utilizando marcadores SNP, (2) comparar as populações quanto ao grau de LD, (3) avaliar alterações de frequências alélicas e (4) identificar associações significativas entre marcadores e características relacionadas à qualidade do milho pipoca. No total foram avaliadas 465 amostras, sendo 354 amostras pertencentes à população ‘Viçosa’ e 111 amostras pertencentes à população ‘Beija-flor’, ambas as populações pertencentes ao germoplasma do Programa de Melhoramento de Milho-Pipoca da Universidade Federal de Viçosa. As populações foram submetidas aos seguintes ciclos de seleção: Viçosa ciclo 1 e Beija-Flor ciclo 1, obtidas após um ciclo de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos, Viçosa ciclo 4, obtida após quatro ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos, Viçosa ciclo 2 famílias de irmãos completos (FIC), obtidas após dois ciclos de seleção entre e dentro de famílias de irmãos completos, Viçosa S<sub>4</sub>, obtida por seleção de progênie S<sub>4</sub>. Foram utilizados 96 marcadores SNP devidamente selecionados em regiões de QTL pré-identificadas para qualidade. Os seguintes caracteres foram mensurados: capacidade de expansão (ml/g), densidade dos grãos (g/ml), esfericidade dos grãos e peso de 100 grãos (g). Em comparação a Viçosa c0, utilizada como população de referência os maiores valores médios de LD por grupo de ligação foram encontrados em Viçosa c2 fic ( $D'=0,8911$ ;  $r^2=0,1905$ ), assim como para SNPs ligados e não ligados ( $D'=0,8911$ ;  $r^2=0,1905$ ). Na análise de MA foram encontradas associações significativas ( $p < 0,05$ ) para todas as características avaliadas, sendo treze associações relacionadas com a característica capacidade de expansão, vinte e três com a esfericidade dos grãos, oito com o peso de 100 grãos e dezessete com a densidade dos grãos.

## ABSTRACT

PAES, Geísa Pinheiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2014. **Linkage disequilibrium and association mapping in popcorn populations related by selection cycles.** Adviser: José Marcelo Soriano Viana. Co-advisers: Fabyano Fonseca e Silva and Eveline Teixeira Caixeta.

Linkage disequilibrium (LD) is defined as the non-random association between alleles of different loci in a population and association mapping (MA) refers to a statistically significant association between molecular marker and phenotypic trait. The objectives of this study were: (1) estimate the linkage disequilibrium in populations of popcorn related by cycles of selection using SNP markers, (2) compare the populations in the degree of LD, (3) evaluate changes in allele frequencies and (4) identify significant associations between markers and quality related characteristics of popcorn. In total 465 samples were evaluated, with 354 samples belonging to the population 'Viçosa' and 111 samples belonging to the population 'Beija-Flor', both populations belonging to the germplasm Improvement Program popcorn, Federal University of Viçosa. The populations were subjected to the following cycles of selection: Viçosa cycle 1 and cycle 1 Beija-Flor, obtained after one cycle of selection among and within half-sib families, Viçosa cycle 4, obtained after four cycles of selection among and within half-sib families, Viçosa cycle 2 full-sib families (FIC), obtained after two cycles of selection among and within full-sib families, Viçosa S4, obtained by selection of progeny S4. Ninety-six SNPs markers in properly selected QTL regions for quality, already identified above were used. The following characters were measured: capacity expansion (ml/g), grain density (g/ml), sphericity of grains and 100 grains weight (g). In comparison the Viçosa c0 used as the reference population for the highest mean values for LD linking group found in Viçosa c2 fic ( $D' = 0,8911$ ;  $r^2 = 0,1905$ ) as well as to related and unrelated SNPs ( $D' = 0,8911$ ,  $r^2 = 0,1905$ ). Regarding the MA significant associations ( $p < 0.05$ ) were found for all traits, with thirteen associations related to the feature expandability, twenty three with the sphericity of the grains, eight with the weight of 100 grains and seventeen density of the grains.

## INTRODUÇÃO

Desequilíbrio de ligação (LD) é a associação não aleatória entre alelos de diferentes locos em uma população. Em relação a marcadores bialélicos, as estatísticas mais usadas para expressar o LD são o valor absoluto da diferença entre as frequências gaméticas observada e esperada sob equilíbrio de ligação gênica (D), a proporção de D em relação ao valor máximo na população (D') e o quadrado da correlação entre os valores de alelos de dois locos ( $r^2$ ) (Flint-Garcia et al., 2003).

Vários fatores podem influenciar o LD. Alguns são responsáveis pelo aumento no LD, incluindo autofecundações, pequenos tamanhos populacionais, isolamento genético entre linhagens, subdivisão populacional, baixa taxa de recombinação, mistura populacional, seleção artificial e natural, dentre outros. Alguns outros fatores são responsáveis pela queda do LD, incluindo acasalamento ao acaso, elevadas taxas de recombinação e mutações, dentre outros. Existem fatores que podem aumentar ou quebrar o LD, ou podem aumentar o LD entre determinado par de alelos e diminuir o LD entre outros pares de alelos. Por exemplo, a mutação pode romper o LD entre pares de alelos que envolvem alelos selvagens, e promover LD entre os pares de alelos dos mutantes envolvidos (Gupta et al., 2005).

Estudos têm sido realizados para investigar o LD no milho, utilizando diferentes tipos de populações e de marcadores. Yanli Lu et al. (2011), analisaram um total de 287 linhagens tropicais e 160 linhagens temperadas que foram genotipadas com 1943 marcadores SNPs e comparadas quanto a queda de LD. Significativa variação na queda da distância de LD (2-100 kb) foi encontrada em todo o genoma. Em média a queda da distância de LD (10-100 kb) no germoplasma temperado foi de duas a dez vezes maior do que no germoplasma tropical (5-10 kb), concluindo que o milho tropical possui uma rápida queda do LD que fornece maiores possibilidades para a seleção. Já Stich et al. (2005) estudaram o desequilíbrio de ligação (LD) em relação 147 linhagens elites de milho da Europa (dent e flint) e dos Estados Unidos (stiff stalk e non stiff stalk). Foram utilizados 100 marcadores SSR. O LD foi significativo para 49% dos pares de marcas nas 80 linhagens flint e para 56% dos pares de marcas nas 57 linhagens dent. A proporção entre locos em LD e em equilíbrio foi de 1:1, nos grupos dent e flint. A proporção de pares de locos em LD em cada cromossomo variou entre 27 e 86% no grupo flint e entre 33 e 93% no grupo dent. O número total de blocos de desequilíbrio foi maior no grupo flint, em comparação ao grupo dent. Contudo, o grupo dent apresentou blocos

de LD de maior tamanho. Os maiores blocos de LD foram encontrados nos cromossomos 2 (105 cM) e 8 (103 cM), em relação aos grupos flint e dent, respectivamente. O tamanho médio dos grupos de LD foi de 33 cM.

Com o objetivo de investigar a extensão e a distribuição do LD entre pares de marcadores AFLP e comparar os resultados com os obtidos utilizando marcadores SSR, Stich et al. (2006) utilizaram 72 linhagens elite européias, genotipadas com 452 marcadores AFLP e 93 marcadores SSR. O LD foi significativo ( $p < 0,05$ ) para 15% dos pares de marcadores AFLP e para 49% dos pares de marcadores SSR em cada um dos dois grupos de germoplasma utilizados, flint e dent. Em ambos os grupos, a proporção de pares de locos ligados e não ligados em LD foi maior para AFLPs que para SSRs. A observação de LD devido à ligação para ambos os tipos de marcadores, sugeriu que o uso de mapeamento associativo é possível utilizando tanto marcadores AFLPs quanto SSRs. Segundo Remington et al. (2001) estudos de associação com base em LD podem fornecer alta resolução para a identificação de genes que podem contribuir para a variação fenotípica. Em um estudo realizado utilizando 102 linhagens de milho ele observou que o LD intragênico geral caiu rapidamente com a distância ( $r^2 < 0,1$  dentro de 1.500 pb), porém, as taxas de declínio foram muito variáveis entre os genes. Linhagens recombinantes apresentaram um bom resultado para o mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) em regiões de 10-30 cM. Portanto, estudos de associação com base em desequilíbrio de ligação podem permitir a identificação dos genes representados por QTLs.

Mapeamento associativo é a identificação de QTL com base em associação estatística significativa entre fenótipo e marcador molecular, devida a desequilíbrio de ligação entre o marcador e pelo menos um QTL (Gupta et al., 2005). Suas principais vantagens em relação ao mapeamento de QTL são uso de populações naturais ao invés de populações derivadas de cruzamentos entre linhas puras ou linhagens e potencialmente maior número de alelos por loco (Flint-Garcia et al., 2005). No entanto, o mapeamento associativo só é capaz de identificar efeitos fenotípicos de alelos com frequência razoavelmente alta na população. Além disso, a eficiência do mapeamento associativo é significativamente influenciada pela estrutura da população, o que pode gerar associações espúrias, isto é, entre marcador e QTL não ligados (Sorkheh et al., 2008).

Phumichai et al. (2012) realizaram um estudo utilizando um conjunto de 60 linhagens de milho para identificar associações entre 48 marcadores SSR e a resistência ao míldio. A análise de variância revelou associações significativas ( $p < 0,05$ ) entre três marcadores e a

característica avaliada. Estes três locos SSR significativos ainda não tinham sido relatados em estudos de mapeamento anteriores. Assim, os resultados sugerem que novas variações alélicas associadas à resistência ao míldio nessas coleções de germoplasma deverão ser úteis para ajudar a identificar novas linhagens que possam transportar os alelos de resistência ao míldio em programas de seleção assistida por marcadores.

Já Belo et al. (2008) utilizaram mapeamento associativo para identificar locos relacionados ao teor de ácido oléico em grãos de milho. Foram utilizados haplótipos para 8.590 marcadores SNPs em 553 linhagens de milho e um pico principal de associação foi identificado no cromossomo quatro. A associação mais significativa foi entre o marcador MZA10924 e o teor de ácido oléico ( $p < 3,7 \times 10^{-12}$  na subpopulação 1, mapeado entre 380 e 384 cM no mapa genético). Este pico de associação foi altamente significativo em três das seis diferentes subpopulações de linhagens testadas (subpopulações 1, 3 e 4 e material complementar S4). Na subpopulação 1, a largura do pico com P-valor para a associação do marcador MZA10924 com o teor de ácido oléico se estendeu por 7 cM, aproximadamente. A análise da subpopulação 1 também identificou picos menos proeminentes da associação nos cromossomos 3, 7, 8, e 10, que não foram evidentes em outras subpopulações. Um único marcador (MZA10275 mapeado entre 158 e 162 cM no cromossomo 6 do mapa genético) mostrou associação altamente significativa ( $p < 6,7 \times 10^{-7}$ ) na subpopulação 1. No entanto, marcadores adjacentes não foram significativamente associados, em contraste aos outros marcadores significativos que ocorreram nos outros grupos.

Devido ao grande polimorfismo encontrado no genoma do milho, o uso de marcadores do tipo SNP tem se mostrado uma excelente ferramenta para programas de seleção assistida, construção de mapas de ligação, identificação de QTLs, diagnose genética, análise genética de estrutura de populações, análises filogenéticas, etc. (Ching et al., 2002). O mapeamento associativo tornou-se um método de alta resolução para mapear locos de características quantitativas com base em desequilíbrio de ligação e representa uma grande promessa para a identificação de genes relacionados a características genéticas complexas (Yu e Buckler, 2006). Assim, os objetivos deste trabalho foram: (1) estimar o desequilíbrio de ligação em populações de milho pipoca relacionadas por ciclos de seleção utilizando marcadores SNP, (2) comparar as populações quanto ao grau de LD, (3) avaliar alterações de frequências alélicas e (4) identificar associações significativas entre os marcadores e as características relacionadas à qualidade do milho pipoca (capacidade de expansão, esfericidade, peso de cem grãos e densidade).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Populações

O total de 465 amostras foi utilizado neste estudo, sendo 354 amostras pertencentes à população ‘Viçosa’ e 111 amostras pertencentes à população ‘Beija-flor’, ambas as populações pertencentes ao germoplasma do Programa de Melhoramento de Milho-Pipoca da Universidade Federal de Viçosa. As populações foram submetidas aos seguintes ciclos de seleção com base em capacidade de expansão: Viçosa ciclo 1 e Beija-Flor ciclo 1, obtidas após um ciclo de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos, Viçosa ciclo 4, obtida após quatro ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos, Viçosa ciclo 2 famílias de irmãos completos (FIC), obtidas após dois ciclos de seleção entre e dentro de famílias de irmãos completos, Viçosa S<sub>4</sub>, obtida por seleção de progênies S<sub>4</sub>. O número de indivíduos de cada população variou entre 63 e 73, tendo Viçosa c0 72 indivíduos, Viçosa c1 63 indivíduos e as demais populações 73 indivíduos.

### Extração e quantificação de DNA

As amostras de tecido foram coletadas de folhas novas, acondicionadas em microtubos de 2,0 mL devidamente identificados e mergulhadas em nitrogênio líquido para que não houvesse degradação do DNA. Posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até a realização da extração do DNA. A extração do DNA das plantas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do Departamento de Fitotecnia da UFV, utilizando o KitWizard® Genomic DNA Purification, conforme protocolo descrito pelo fabricante, porém com modificações, descritas a seguir.

Primeiramente o tecido vegetal foi macerado em cadinho, utilizando nitrogênio líquido, e aproximadamente 40 mg da amostra foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 600 µL de Nuclei Lysis Solution (tampão de lise). Posteriormente o microtubo foi homogeneizado em vórtex por um a três segundos para a solução entrar em contato com todo o tecido. Então foram adicionados 10 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e os microtubos foram invertidos suavemente de 2 a 5 vezes. As amostras foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 1 hora e invertidas suavemente a cada 10 minutos. Em seguida

foram adicionados 3  $\mu\text{L}$  de RNase Solution e as amostras foram invertidas de 2 a 5 vezes e incubadas em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Retiradas do banho-maria, as amostras esfriaram a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de Protein Precipitation Solution e homogeneizou-se com um vórtex vigoroso a alta velocidade por 20 segundos.

Com o objetivo de separar as fases orgânicas e aquosas, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 16.000 g (rcf) e 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante contendo o DNA (fase aquosa-superior) foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL, contendo 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, a temperatura ambiente. A fim de promover a precipitação do DNA os microtubos foram homogeneizados por inversões suaves durante 10 minutos. Posteriormente, procedeu-se uma centrifugação por 1 minuto a 16.000 g, descartou-se o sobrenadante e o pellet de DNA formado no fundo do microtubo foi lavado com 600  $\mu\text{L}$  de Etanol 70%, a temperatura ambiente. As amostras foram deixadas para secar durante 15 minutos a temperatura ambiente e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de DNA Rehydration Solution, incubando a 65 °C por 1 hora. Periodicamente, a cada 10 minutos, os microtubos foram homogeneizados suavemente. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C e previamente identificadas como “DNA estoque”.

Para quantificação das amostras de DNA foi usado o fluorômetro Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies), que quantifica o DNA presente na amostra, indispensável para análise na Plataforma BeadXpress da Illumina, que exige DNA a uma concentração mínima de 50 ng/ $\mu\text{L}$ . O nível de pureza foi determinado pelo NanoVue Spectrophotometer (GE Healthcare Life Science), onde foram mensurados os valores de absorbância (260 nm) e a razão (260/280 nm). Para obter o “DNA de trabalho”, as amostras tiveram suas concentrações padronizadas em 50 ng/ $\mu\text{L}$ , por diluição em água ultrapura.

## **Genotipagem**

A genotipagem foi feita em relação a 96 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), os quais foram selecionados em função de estarem localizados em regiões com QTLs para características relacionadas à qualidade de milho-pipoca. Três SNPs não produziram resultados. Os SNPs foram selecionados do maize SNP50 array de 56 Kb (56110 SNPs from ~19,000 genes), a partir da localização dos primers SSR (Simple Sequence Repeats) flanqueadores dos QTLs para qualidade (capacidade de expansão, volume do floco, número

de grãos não estourados, tamanho do floco) identificados por Li et al. (2009, 2008a, b, 2007, 2006), Babu et al. (2006) e Lu et al. (2003), e das informações dos bancos de dados MaizeGDB ([www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)) e NCBI (National Center for Biotechnology Information) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tabelas 1 e 2, e Figura 1). O número de plantas genotipadas e fenotipadas nas populações Viçosa, Viçosa c1, Viçosa c4, Viçosa c2 fsf, Viçosa S4 e Beija-Flor c1 foram 72, 63, 73, 73, 73 e 73, respectivamente.

A genotipagem foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV, empregando o analisador de SNP BeadXpress, da Illumina. A Plataforma BeadXpress Reader combina o Ensaio de Genotipagem GoldenGate com a tecnologia VeraCode, proporcionando um ensaio com resultados de alto rendimento por amostra, qualidade superior dos dados e baixo custo por amostra. O primeiro passo no ensaio GoldenGate é a ativação do DNA, que permite que as amostras de DNA se liguem às partículas paramagnéticas. Este processo de ativação é altamente resistente e requer 250 ng de DNA. Os oligonucleotídeos do ensaio (denominado pela Illumina de OPA), o tampão de hibridização e as partículas paramagnéticas são então combinados com o DNA ativado na etapa de hibridização. Três oligonucleotídeos são projetados para cada SNP, sendo que dois oligonucleotídeos (denominados ASO) não são oligos alelos-específicos e o terceiro oligonucleotídeo (denominado LSO), é um oligo loco-específico que hibridiza várias bases à jusante do loco do SNP. Todos os três oligonucleotídeos contêm sequências de primers universais; o LSO contém um endereço de sequência única que tem como alvo uma determinada microbead, denominada VeraCode. Durante o processo de hibridização dos primers, os ASOs e os LSOs hibridizam com a amostra de DNA genômico ligada às partículas paramagnéticas.

Devido à hibridização ocorrer antes de qualquer etapa de amplificação, a amplificação introduzida no ensaio não possui nenhuma tendência. Após a hibridização, são realizadas várias etapas de lavagem, a fim de remover o excesso de oligonucleotídeos mal hibridizados. A extensão do ASO apropriado e a ligação ao produto da extensão do LSO unem informações sobre o genótipo presente no loco do SNP à sequência de endereço no LSO. Os produtos da ligação servem como moldes para os primers universais (P1, P2 e P3) na PCR. Os primers P1 e P2 são marcados com a fluorescência Cy3 e Cy5, respectivamente. Após o processamento da fita simples à jusante, os produtos da PCR marcados com as fluorescências são hibridizados com a sua bead complementar por meio do seu endereço de sequência única. A hibridização dos produtos do Ensaio GoldenGate com as beads VeraCode separa

individualmente os produtos do ensaio para leitura do genótipo do SNP. Após a hibridação, o leitor BeadXpress® é usado para identificação do código da microbead e detecção do sinal fluorescente. Durante a leitura, um feixe de laser penetra a microbead VeraCode que possui um código holográfico inscrito digitalmente para gerar a imagem do código binário, que permite uma detecção rápida e altamente específica. Os dados gerados usando o Leitor BeadXpress foram analisados utilizando o software de análise de dados, Genome Studio TM da Illumina, que executa um agrupamento automatizado da chamada do genótipo de cada amostra em relação aos SNPs.

## **Fenotipagem**

As plantas genotipadas foram mensuradas em relação às características: capacidade de expansão, densidade e esfericidade dos grãos e peso de 100 grãos. As avaliações de capacidade de expansão foram feitas empregando forno de microondas de 27 L e 900 W, a partir de amostras de 10 g por planta. O peso de 100 grãos foi determinado com balança eletrônica com duas casas decimais. A esfericidade é medida pela função

$$\text{esfericidade} = (\text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{espessura})^{1/3} / \text{maior medida}$$

em que comprimento é a distância do ápice à base do grão, largura é a medida da maior face do grão e espessura é a distância entre as duas faces do grão (Tian et al., 2001). As medidas de comprimento, largura e espessura foram feitas em 10 grãos empregando paquímetro digital com precisão de 0,005 mm. A densidade dos grãos foi determinada empregando 50 grãos. Após a pesagem os grãos foram colocados em proveta de 100 mL, com graduação de 1 mL, contendo 50 mL de etanol 90%. O volume de grãos foi a diferença volume final – 50 (Vyn e Tollenaar, 1998).

## **Análises estatísticas**

Os resultados foram obtidos empregando os softwares PowerMarker 3.25 (Liu e Muse, 2005) e GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2006). Um SNP foi considerado não polimórfico quando a menor frequência alélica (maf) foi inferior a 1%. A análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feita com base no teste exato de Fisher a 5%. A análise de LD foi feita apenas em relação aos SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram estimadas três medidas de LD: o valor absoluto da diferença entre as frequências gaméticas observadas e esperadas sob

equilíbrio de ligação gênica ( $D$ ), a proporção de  $D$  em relação ao valor máximo na população ( $D'$ ) e o quadrado da correlação entre alelos de dois locos ( $r^2$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Alterações de frequências alélicas

O estudo das frequências gênicas e de outros parâmetros genéticos populacionais revelou 23 a 50% de SNPs não polimórficos, apenas 8 a 45% de SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3), diferenciação populacional (Tabela 4) e alterações relevantes de frequências alélicas dos SNPs (Tabela 5). Observou-se que a seleção com base em capacidade de expansão determinou indiretamente aumento no número de SNPs não polimórficos e diminuição do número de SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Isto se deveu mais provavelmente às alterações indiretas de frequências alélicas dos SNPs, uma vez que os tamanhos efetivos foram aproximadamente 800 com famílias de meios-irmãos, 400 com famílias de irmãos completos e 300 com progênies endógamas. A seleção também determinou indiretamente aumento na frequência de heterozigotos (Tabela 3). Embora seja surpreendente o reduzido número de SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações Viçosa (45%) e Beija-Flor (25%), uma vez que não há registro anterior de seleção em ambas, a diminuição observada nas populações melhoradas é provavelmente devido a efeito indireto da seleção de plantas dentro de famílias, pois assumindo um SNP não sujeito a efeito indireto da seleção, sua frequência deveria variar ao acaso e em magnitude reduzido em razão dos tamanhos efetivos. Em relação a um SNP sujeito a efeito indireto da seleção, a seleção entre famílias deveria proporcionar alteração de frequência alélica, mas não o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que todas as progênies selecionadas foram recombinadas.

Outra evidência relevante de efeito indireto da seleção com base em capacidade de expansão nas frequências alélicas dos SNPs é a diferenciação populacional das populações melhoradas em relação à população Viçosa, principalmente após dois a quatro ciclos de seleção, comparável à diferenciação entre Viçosa e Beija-Flor c1 (Tabela 4). Deve ser destacado também que a diferenciação entre as populações melhoradas é reduzida. A análise de variância molecular revelou que 45% da variabilidade gênica foi observada entre populações. Portanto, a variabilidade é maior dentro das populações.

Outro destaque nesse estudo foram as magnitudes de alteração de frequência alélica em relação à população Viçosa, provavelmente em razão dos SNPs estarem em região com QTL

para qualidade e caracteres relacionados. Essas alterações foram proporcionais ao número de ciclos de seleção e as de magnitude maior que 30% envolveram 74 a 100% dos SNPs (Tabela 5).

Ao estudar alterações de frequências alélicas, Stuber et al. (1980) relataram mudanças nas frequências alélicas em oito locos de isoenzimas em famílias de irmãos completos e em ciclos de seleção recorrente recíproca em duas populações de milho para produtividade dos grãos, sugerindo que alterações nas frequências dos alelos estão associadas a mudanças devido a seleção praticada a favor da característica. Com o objetivo de monitorar as alterações de frequências alélicas durante a seleção recorrente em aveia, De Koeyer et al. (2001), utilizaram 97 loci RFLP, detectados por 73 clones de cDNA. Variações significativas foram detectadas em oito regiões genômicas. Quatro grupos de ligação foram estudados mais detalhadamente a fim de identificar QTLs. No total, foram identificados sete QTLs utilizando correlação nas alterações das frequências alélicas e/ou dados de análise de variância, sendo seis destas regiões associadas ao rendimento de grãos e uma associada a altura de plantas, concluindo que variações alélicas podem ser utilizadas para identificação de QTLs nos ciclos de seleção recorrente.

Botrel e Carvalho 2004 utilizaram variações de frequências alélicas com o intuito de determinar os níveis de variabilidade genética mantidos entre e dentro de populações, a estrutura genética e o tamanho efetivo populacional em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). Foram utilizadas três populações naturais fragmentadas, onde coletou-se 30 indivíduos adultos nas populações 1 e 3 (Matinha e Bom Sucesso) e 35 indivíduos na população 2 (Subestação) e os parâmetros foram estimados a partir das frequências alélicas de dez locos isoenzimáticos. Foram identificados vinte seis alelos distribuídos em 10 locos. Os índices de diversidade estimados para as três populações revelaram média de 2,4 alelos por loco e heterozigosidade média observada maior que a esperada para as três populações, revelando um excesso de heterozigotos. O polimorfismo foi de 90,0% nas populações 1 e 2 e de 100% na população 3. O índice de fixação foi negativo em todas populações. A estrutura genética revelou que há excesso de heterozigotos para o conjunto das populações. A divergência gênica entre as populações foi baixa (0,061), revelando que 6,1% da variabilidade genética encontram-se entre e 93,9% dentro das populações. O tamanho efetivo estimado para cada população foi de 32, 48 e 42 indivíduos, respectivamente. Assim, concluíram que as informações obtidas neste estudo auxiliarão em projetos de manejo e conservação genética de *M. villosum*.

Já Reis et al. (2011) realizaram um trabalho para estimar a variabilidade genética em dois ciclos de seleção recorrente do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis*) e avaliar o impacto da seleção nas progênies selecionadas via alterações nas frequências alélicas, detectadas com uso de marcadores microssatélites. Vinte e três marcadores SSR foram utilizados na genotipagem de 66 progênies de irmãos completos. Foram encontrados 32 alelos nas populações, dos quais apenas dois foram perdidos durante a seleção. As diferenças nas frequências alélicas nos dois ciclos de seleção recorrente não foram significativas. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) média no primeiro ciclo de seleção foi de 0,20 por loco, ligeiramente maior que a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) (0,15). No segundo ciclo de seleção, o valor médio da  $H_o$  foi menor que o da  $H_e$ , com média de 0,12. Houve pequena perda de variabilidade e alterações nas frequências alélicas; porém, esta oscilação pode ser considerada normal quando se pratica seleção.

### **Análise de desequilíbrio de ligação**

O estudo de LD revelou aumento do LD médio nas populações melhoradas, em relação ao observado na população Viçosa, o qual foi proporcional ao número de ciclos de seleção (Tabela 6). Isso também evidencia efeito indireto da seleção com base em capacidade de expansão sobre o LD em relação aos SNPs, provavelmente em razão da existência de um ou mais QTLs para características de qualidade nas regiões de localização dos SNPs. Gupta et al. (2005) e Flint-Garcia et al. (2003) destacam a seleção como um dos fatores que afetam o LD em populações. As estatísticas  $D$ ,  $D'$  e  $r^2$  foram calculadas e os marcadores SNPs foram comparados par a par para analisar o grau de LD entre os locos nos diferentes ciclos de seleção por grupos de ligação e para todos SNPs ligados e não ligados. Os maiores valores médios de  $D$ ,  $D'$  e  $r^2$  foram encontrados após dois ciclos de seleção em famílias de irmãos completos (Viçosa c2 fic), tanto para grupos de ligação quanto para todos os SNPs e os menores valores foram atribuídos a Viçosa S4, obtida após quatro ciclos de seleção em famílias endógamas. Ao comparar os ciclos de seleção, foi observado um maior aumento nos valores de LD após dois ciclos em famílias de irmãos completos que após quatro ciclos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos (Tabela 6), mostrando que a seleção feita utilizando famílias de irmãos completos pode ser mais eficiente em promover o desequilíbrio entre os locos.

Estudos têm sido realizados a fim de estudar o desequilíbrio de ligação nos germoplasmas da maioria das culturas. O ensaio GoldenGate desenvolvido pela Illumina, com 1.536 SNPs de 582 locos de milho, foi utilizado por Yan et al. (2009) para genotipagem de uma coleção mundial de milho, altamente diversificada com 632 linhagens temperadas, tropicais e subtropicais. Um total de 1.229 SNPs e 1749 haplótipos dentro de 327 locos foi utilizado. O desequilíbrio de ligação foi medido no geral e dentro de cromossomos, nos grupos de frequências alélicas, nos subgrupos relacionados por origem geográfica e subgrupos com diferentes tamanhos amostrais. O LD caiu com a distância e foi diferente entre cromossomos, variando entre 1 a 10 kb. O LD aumentou com o aumento da distância em menores frequências alélicas e em amostras de tamanhos menores, incentivando o cuidado ao usar poucas linhagens para realização de estudos de LD. A queda do LD com a distância foi muito maior em linhagens de clima temperado do que em linhagens tropicais e subtropicais, isto porque as linhagens tropicais e subtropicais são mais diversificadas e contem alelos mais raros do que linhagens temperadas.

Os sistemas de acasalamento e misturas podem fortemente influenciar o LD. Assim, Labate et al. (2000) compararam populações de milho mantidas em acasalamento ao acaso. O modo de acasalamento pode ser realizado tanto através de técnicas de polinização feita manualmente (BSS (R)) ou em blocos isolados polinizados pelo vento (BSCB1 (R)). Oitenta e dois marcadores RFLP foram utilizados para descobrir se as frequências genotípicas observadas nos dois tipos de acasalamentos estavam conforme os resultados esperados em uma população em acasalamento ao acaso. Para pares de locos polimórficos foi observado equilíbrio de ligação nas populações progenitoras de BSSs(R) e BSCB1s(R) (em menos de 5 % de todos os testes de equilíbrio foi rejeitada a hipótese de nulidade a 5% de significância). As populações BSSs(R)CO, BSCB1(R)CO e BSCB1(R)C12 apresentaram pequenos aumentos na proporção de pares de locos em desequilíbrio de ligação em comparação com as populações progenitoras (em cerca de 8,4 % de todos os pares de loco foi rejeitada a hipótese de nulidade a 5% nível de significância). BSSs(R)C12 foi um extremo discrepante com 25% de todos os pares de locos polimórficos em desequilíbrio de ligação. Este resultado foi provavelmente causado pelo agrupamento artificial de três BSSs(R) com 97 plantas BSSs(R)C12 nas instalações durante a amostragem.

Nota-se uma grande escassez de informações sobre o LD em populações de milho, uma vez que a maioria dos trabalhos desenvolvidos tem empregado painel de linhagens, onde podemos citar os trabalhos de Wang et al. (2008) e Van Inghelandt et al. (2011). Wang et al.

(2008) avaliaram o LD em relação a 95 linhagens de milho da China, empregando 145 marcadores SSR. O LD foi significativo em 64% dos pares de marcadores. Em cada subpopulação esse valor variou de 19 a 40%. Em relação ao painel de linhagens, 83% dos locos ligados apresentaram LD significativo.

Já Van Inghelandt et al. (2011) analisaram o LD em relação a 1537 linhagens de milho comerciais, empregando 359 marcadores SSR e 8244 SNPs. Em relação aos marcadores ligados, não se observou diferenças relevantes entre as medidas de LD obtidas com marcadores SSR (lower density) e SNPs (higher density) nos pools heteróticos Flint e Lancaster. Nos pools heteróticos SSS e Iodent, e no painel de linhagens o LD médio com base nos SNPs foi 45 a 52% maior. Em relação aos marcadores independentes, o valor do LD maior com marcadores SSR.

A fim de estudar o desequilíbrio de ligação na cultura do trigo, Hao et al. 2011 utilizaram 250 linhagens de trigo para pão e 512 marcadores SSR distribuídos por todo o genoma. Variedades modernas exibiram em todo o genoma uma queda média do LD mais ampla para pares de locos com  $r^2 > 0.05$  ( $p < 0,01$ ) do que raças primitivas. A distância média da queda do LD para as raças primitivas em todo o genoma foi de 5 cM, enquanto que as variedades modernas tiveram uma queda do LD por uma distância maior, variando de 5 a 10 cM. Distâncias da queda do LD também foram diferentes para cada um dos 21 cromossomos, sendo maior para a maioria dos cromossomos das variedades modernas (5,25 cM), em comparação com as raças (5,15 cM), provavelmente indicando as influências da domesticação e do melhoramento.

Barnaud et al. (2010) apresentaram a primeira caracterização de LD em videira francesa selvagem, *Vitis vinifera L. subsp. silvestris*. Para avaliar o padrão e a extensão de LD foi utilizada uma amostra de 85 plantas do sul da França e 36 marcadores SSR distribuídos em mais de cinco grupos de ligação. O LD decaiu rapidamente com a distância, com valores de  $r^2$  diminuindo até 0,1 em 1,4 cM quando foram utilizados haplótipos. Comparando os resultados com um estudo anterior sobre a videira cultivada subespécie sativa, em que o LD significativo caiu até uma distância de 16,8 cM, foi observado que o LD em subespécies silvestres foi 12 vezes menor, uma vez que esta apresentou valores significativos na queda do LD até no máximo 1,4 cM de distância. Gargalos de domesticação e propagação vegetativa são os principais fatores responsáveis por essa diferença entre videiras cultivadas e silvestres.

A diminuição natural do LD à medida que a distância aumenta, ocorre mais lentamente em populações melhoradas, devido à recombinação que é severamente reduzida e ao

polimorfismo genético que permanece correlacionado com a distância física (Morrell et al., 2005). A seleção praticada a favor de características de interesse, que causa afinamento genético para locos específicos, pode criar LD entre o alelo selecionado e o loco ligado. Além disso, a seleção a favor ou contra um fenótipo determinado por dois genes não ligados pode também criar LD, embora os locos não estejam fisicamente ligados. O impacto do melhoramento na magnitude e no padrão de LD nas espécies melhoradas será aumentado devido à interferência do homem no processo de seleção.

### **Mapeamento associativo**

O mapeamento associativo empregando nível de significância de 5% permitiu a identificação de 41 associações significativas para as características avaliadas. Ao analisar cada ciclo de seleção individualmente, observou-se 11 associações significativas para Viçosa, 12 para Viçosa c1, 2 para Viçosa c4, 4 para Viçosa c2 fic, 27 para Viçosa S4 e 8 para Beija-Flor c1 (Tabelas 7 a 10). Dentre os marcadores analisados, 20 foram associados a mais de uma característica. Para as características, capacidade de expansão, esfericidade, peso de 100 grãos e densidade, foram identificados 13, 23, 8 e 17 marcadores, respectivamente. Apenas os marcadores PUT-163a-16922676-1070, localizado no cromossomo 1 e SYN 22745, localizado no cromossomo 4, foram associados a três características das quatro avaliadas, sendo o primeiro associado à esfericidade, densidade e peso de 100 grãos e o segundo a esfericidade, densidade e volume de expansão.

Estudos de mapeamento associativo têm sido realizados em várias espécies de cereais, como por exemplo, milho, trigo, arroz e sorgo. Breseghello e Sorrells (2006) realizaram um estudo de mapeamento associativo em uma amostra de 95 cultivares de trigo macio de inverno (*Triticum aestivum* L.), que foram avaliados quanto a morfologia dos grãos e a qualidade de moagem. Associação significativa para as características relacionadas com a morfologia dos grãos e qualidade de moagem foram encontradas em 62 marcadores SSR nos cromossomos 2D, 5A e 5B. Sendo 33 marcas encontradas no cromossomo 2D, 20 marcas no cromossomo 5A e 9 marcas no cromossomo 5B. De acordo com análises anteriores de QTL, marcadores significativos para o tamanho do grão, foram detectados nos três cromossomos testados, e foram identificados alelos potencialmente úteis para a seleção. Portanto, os resultados demonstraram que o mapeamento associativo pode complementar e reforçar informações prévias de QTL em estudos de seleção assistida por marcadores.

Já Agrama et al. (2007) realizaram um estudo de mapeamento associativo na cultura do arroz. Noventa e dois acessos de germoplasmas recentemente introduzidos a partir de sete regiões geográficas da África, Ásia e América Latina, e onze cultivares norte-americanos, incluídos como controle, foram avaliadas quanto às características de rendimento dos grãos e genotipadas com 123 marcadores SSR. Características complexas relacionadas à produção, como largura e comprimento dos grãos, relação largura/comprimento dos grãos e peso de 1000 grãos, foram estimadas. A análise de associação identificou associação significativa ( $p < 0,05$ ) para todos os caracteres avaliados. As características rendimento dos grãos, largura dos grãos e relação largura/comprimento dos grãos foram associadas a cinco marcadores cada. Já o comprimento dos grãos foi associado a seis marcadores e peso de 1000 grãos a quatro marcadores. Um total de 25 associações marcador-traço foi identificado com 21 diferentes marcadores SSR. Quatro marcadores foram associados a duas características: RM85 no cromossomo 3 foi associado a largura dos grãos e peso de 1000 grãos, RM122 no cromossomo 5 foi associado ao comprimento dos grãos e peso de 1000 grãos, RM459 também no cromossomo 5 foi associado ao comprimento dos grãos e peso de 1000 grãos e RM228 no cromossomo 10 foi ao rendimento de grão e a relação largura/comprimento dos grãos. Muitos dos marcadores associados estavam localizados em regiões de QTL que já tinham sido identificados anteriormente.

Yu et al. (2006) propuseram um método para mapeamento associativo aplicável a painéis de linhagens (grupo de linhagens). O método permite eliminar associações espúrias atribuídas à estruturação populacional das linhagens e emprega BLUP (Melhor Predição Linear Não Viesada) com informação de parentesco. Os resultados relativos a um painel de 277 linhagens de milho, genotipadas em relação a 533 SNPs, com ampla diversidade molecular e fenotípica, demonstrou melhor controle das taxas de erros Tipos 1 e 2, em relação aos métodos de associação estruturada e controle genômico.

Stich e Melchinger (2009) compararam nove métodos de mapeamento associativo quanto às taxas de erro Tipos 1 e 2, empregando dados simulados e reais relativos a cinco espécies. O melhor método combina o uso das matrizes de estrutura populacional e de parentesco, em uma abordagem BLUP. Os métodos de mapeamento associativo sem controle de estrutura populacional e de parentesco (GLM ou ANOVA), com controle apenas de estrutura populacional ou parentesco e com controle dos dois fatores foram avaliados por Yang et al. (2010). Eles empregaram um novo painel de 155 linhagens de milho de clima temperado, com fenotipagem relativa a 34 caracteres e genotipagem em relação a 82 locos

SSR e 1536 SNPs. O melhor método foi o que controla o parentesco, o qual foi equivalente ao método completo, mas superior ao que controla apenas a estrutura populacional.

Assim, Larsson et al. 2013 concluem que o mapeamento associativo oferece maior resolução em mapas de ligação devido à rápida queda do desequilíbrio de ligação e que um estudo prévio da estrutura populacional é de fundamental importância para o controle de falsos positivos (associações espúrias) em análises de mapeamento associativo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- AGRAMA, H. A., EIZENGA, G. C., YAN, W. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. **Molecular Breeding**, 19:341–356.
- BABU, R., NAIR, S.K., KUMAR, A., RAO, H.S., VERMA, P., GAHALA, A., SINGH, I.S., GUPTA, H.S. 2006. Mapping QTL for popping ability in a popcorn× flint corn cross. **Theoretical and Applied Genetics**, 112, 1392-1399.
- BARNAUD, A., LAUCOU, V., THIS, P., LACOMBE, T. AND DOLIGEZ, A. 2010. Linkage disequilibrium in wild French grapevine, *Vitis vinifera* L. subsp. *Silvestris*. **Heredity**, 104: 431–437.
- BELO, A., ZHENG, P., LUCK, S., SHEN, B., MEYER, D. J., LI, B., TINGEY, S., RAFALSKI, A. 2008. Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. **Molecular Genetic and Genomics**, 279:1–10.
- BOTREL, M. C. G. e CARVALHO, D. 2004. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). **Revista Brasileira Botânica**, V.27, n.4, p.621-627.
- BRESEGHELLO, F. e SORRELLS, M. E. 2006. Association Mapping of Kernel Size and Milling Quality in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. **Genetics**, 172: 1165–1177.
- CHING, A., CALDWELL<sup>1</sup>, K. S., JUNG, M., DOLAN, M., SMITH, O. S., TINGEY, S., MORGANTE, M., RAFALSK, A. J. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genetics**, 3:19.

- DE KOEYER, D. L., PHILLIPS, R. L., STUTHMAN, D. D. 2001. Allelic Shifts and Quantitative Trait Loci in a Recurrent Selection Population of Oat. **Croap Science**, 41:1228-1234.
- FLINT-GARCIA, S.A., THORNSBERRY, J.M., BUCKLER, E.S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review Plant of Biology**, 54: 357-374.
- FLINT-GARCIA, SA, THUILLET, A, YU, J, PRESSOIR, G, ROMERO, SM, MITCHEL, SE, DOEBLEY, J, KRESOVICH, S, GOODMAN, MM, BUCKLER, ES. 2005. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. **The Plant Journal**, 44: 1054-1064.
- GUPTA, P.K., RUSTGI, S., KULWAL, P.L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology**, 57: 461-485.
- HAO, C., WANG, L., GE, H., DONG, Y., ZHANG, X. 2011. Genetic Diversity and Linkage Disequilibrium in Chinese Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Revealed by SSR Markers. **Plosone**, 6 (2):e17279.
- LABATE, J. A., LAMKEY, K. R., LEE, M., WOODMAN, W. 2000. Hardy-Weinberg and linkage equilibrium estimates in the BSSS and BSCB1 random mated populations. **Maydica**, 45 (3) : 243-256.
- LARSSON, S. J., LIPKA, A. E., BUCKLER, E. S. 2013. Lessons from Dwarf8 on the Strengths and Weaknesses of Structured Association Mapping. **PlosGenetics**, 9(2).
- LI, Y. L., DONG Y. B., NIU S. Z. 2006. QTL Analysis of Popping Fold and the Consistency of QTLs Under Two Environments in Popcorn. **Acta Genetica Sinica**, 33(8):724–732.

- LI, Y. L., DONG, Y. B., NIU, S. Z., CUI, D. Q. 2007. QTL for popping characteristics in popcorn. **Plant Breeding**, 126: 509—514.
- LI, YL, DONG, YB, NIU, SZ, CUI, DQ, WANG, YZ, LIU, YY, WEI, MG, LI, XH. 2008a. The genetic relationship between popping expansion volume and two yield components in popcorn using unconditional and conditional QTL analysis. **Euphytica**, 162: 345-351.
- LI, YL, DONG, YB, NIU, SZ, CUI, DQ, WANG, YZ, LIU, YY, WEI, MG, LI, XH. 2008b. Identification of agronomically favorable quantitative trait loci alleles from a dent corn inbred Dan232 using advanced backcross QTL analysis and comparison with the F<sub>2:3</sub> population in popcorn. **Molecular Breeding**, 21: 1-14.
- LI, Y., DONG, Y., NIU S., CUI, D. 2009. Identification of QTL for Popping Characteristics Using a BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> Population and Comparison with Its F<sub>2:3</sub> Population in Popcorn. **Agricultural Sciences in China**, 8(2): 137-143.
- LIU, J., MUSE, S.V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, 21: 2128-2129.
- LU, H.J., BERNARDO, R., OHM, H.W. 2003. Mapping QTL for popping expansion volume in popcorn with simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 106:423–427.
- MORRELLET, P.L., TOLENO, D.M., LUNDY, K.E., CLEGG, M.T. 2005. Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgares* sp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102:2442-2447.

- PEAKALL R, SMOUSE PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. **Mol Ecol Notes**, 6: 288-295.
- PHUMICHAJ, C., CHUNWONGSE, J., JAMPATONG, S., GRUDLOYMA, P., PULAM, T., DOUNGCHAN, W., WONGKAEW, A., KONGSIRI, N. 2012. Detection and integration of gene mapping of downy mildew resistance in maize inbred lines through linkage and association. **Euphytica**, 187:369–379.
- REIS, R. V., OLIVEIRA, E. J., VIANA, A. P., PEREIRA, T. N. S., PEREIRA, M. G., SILVA, M. G. M. 2011. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46 (1) : 51-57.
- REMYINGTON, D.V.; THORNSBERRY, J. M.; MATSUOKA, Y.; WILSON, L.M.; WHITT, S.R.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.M.; BUCLER IV, E. S. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. **Proceedings of the Natural Academy Sciences**, 20:11479-11484.
- SORKHEH, K., MALYSHEVA-OTTO, L. V., WIRTHENSOHN, M. G., TARKESHESFAHANI, S., MARTINEZ-GOMEZ, P. 2008. Linkage disequilibrium, genetic association mapping and gene localization in crop plants. **Genetics and Molecular Biology**, 31: 805-814.
- STICH, B., MELCHINGER, A.E., FRISCH, M., MAURER, H.P., HECKENBERGER, M., REIF, J.C. 2005. Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, 111: 723-730.
- STICH, B., MAURER, H. P., MELCHINGER, A. E., FRISCH, M., HECKENBERGER M., VAN DER VOORT, J. R., PELEMAN, J., SORENSEN, A. P., REIF, J. C. 2006. Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers. **Molecular Breeding**, 17: 217–226.

- STICH, B., MELCHINGER, AE. 2009. Comparison of mixed-model approaches for association mapping in rapeseed, potato, sugar beet, maize, and Arabidopsis. **BMC genomics**, 10: 94.
- STUBER, C. W., MOLL, K. H., GOODMAN, M. M., SCHAFFER, H. E., WEIR, D. B. 1980. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays*). **Genetics**, 95: 225-236.
- TIAN, Y, BURIK, P, ECKHOFF, SR. 2001. Effect of hybrid and physical properties of individual popcorn kernels on expansion volume. **Cereal Chemistry**, 78: 578-582.
- VYN, TJ, TOLLENAAR M. 1998. Changes in chemical and physical quality parameters of maize grain during three decades of yield improvement. **Field Crops Research**, 59: 135-140.
- VAN INGHELANDT, D., REIF, J. C., DHILLON, B. S., FLAMENT, P., MELCHINGER, A. E. 2011. Extent and genome-wide distribution of linkage disequilibrium in commercial maize germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, 123:11–20.
- YAN, J., SHAH, T., WARBURTON, M.L., BUCKLER, E.S., MCMULLEN, M.D. 2009. Genetic Characterization and Linkage Disequilibrium Estimation of a Global Maize Collection Using SNP Markers. **Plosone**, 4(12): e8451.
- YANG, X., YAN, J., SHAH, T., WARBURTON, M. L., LI, Q., LI, L., GAO, Y., CHAI, Y., FU, Z., ZHOU, Y., XU, S., BAI, G., MENG, Y., ZHENG, Y., LI, J. 2010. Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:417–431.
- YANLI LU, TRUSHAR SHAH, ZHUANFANG HAO, SUKETOSHI TABA, SHIHUANG ZHANG, SHIBIN GAO, JIAN LIU, MOJU CAO, JING WANG, A. BHANU PRAKASH, TINGZHAO RONG, YUNBI XU. 2011. Comparative SNP and Haplotype

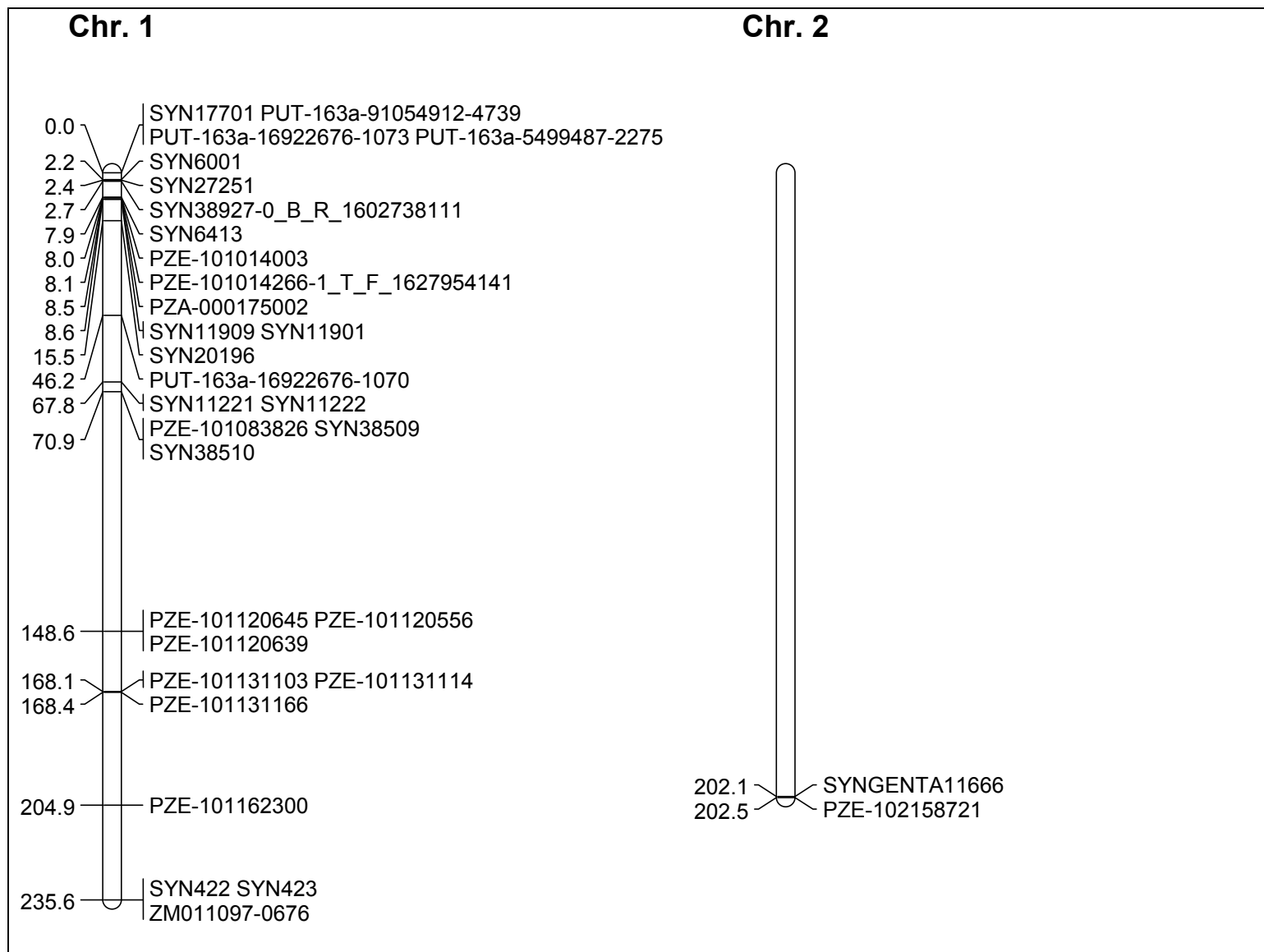
Analysis Reveals a Higher Genetic Diversity and Rapider LD Decay in Tropical than Temperate Germplasm in Maize. **Plosone**, 6(9): e24861.

YU, J. M., BUCKLER, E. S. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. **Current Opinion in Biotechnology**, 17: 155-160.

YU, J., PRESSOIR, G., BRIGGS, W. H., BI, I. V., YAMASAKI, M., DOEBLEY, J. F., MCMULLEN, M. D., GAUT, B. S., NIELSEN, D. M., HOLLAND, J. B., KRESOVICH, S., BUCKLER, E. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, 38: 203-208.

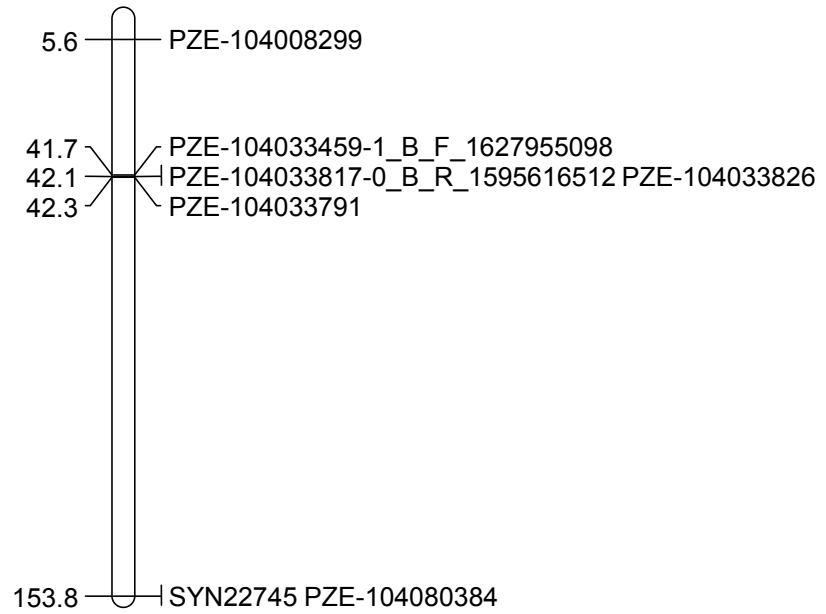
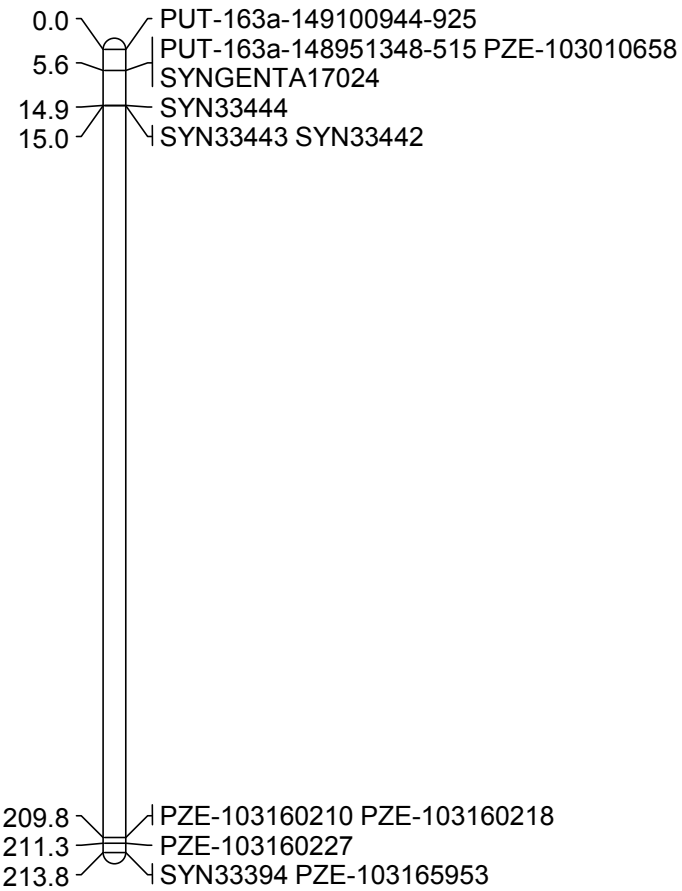


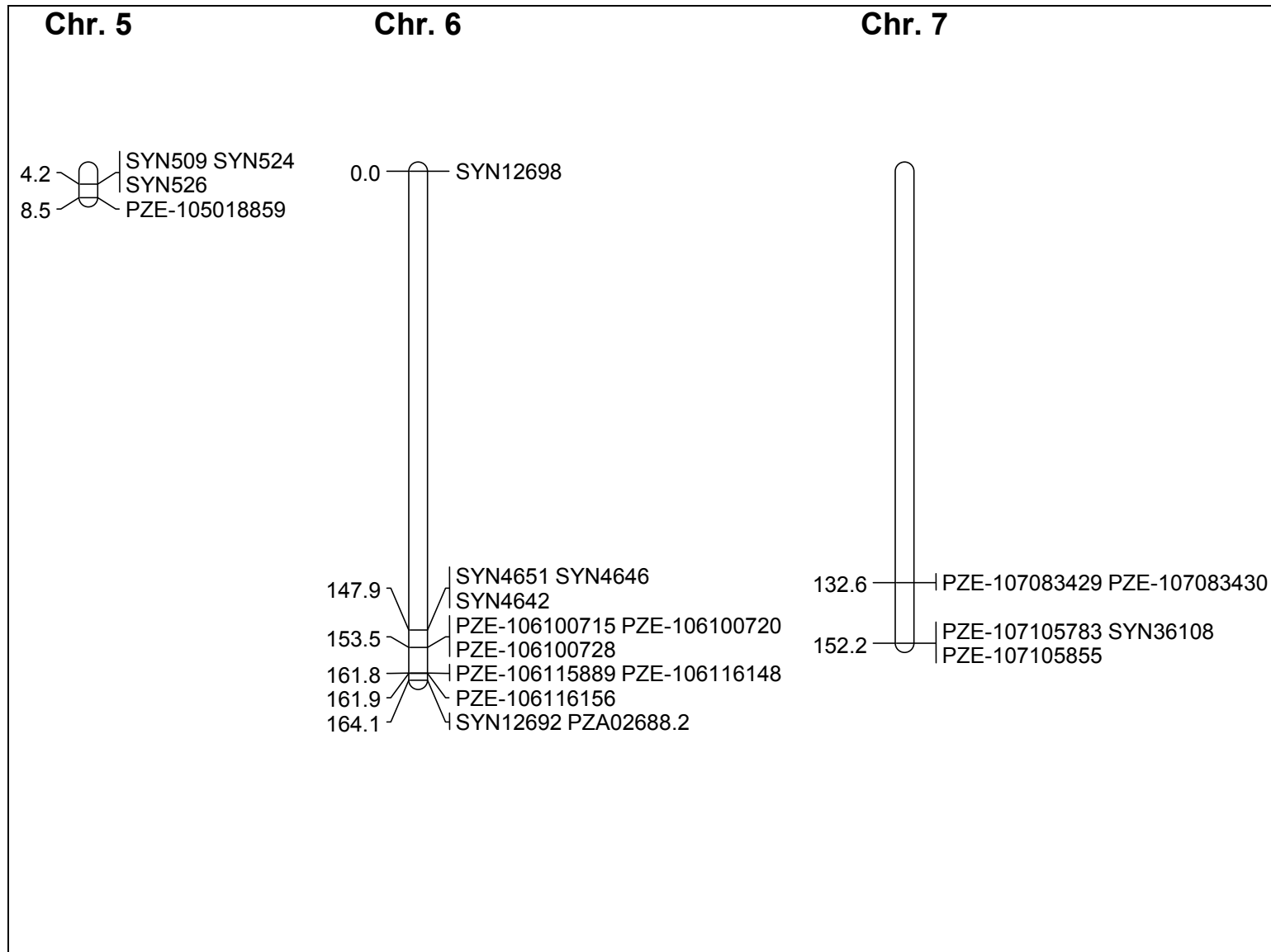
FIGURA



**Chr. 3**

**Chr. 4**





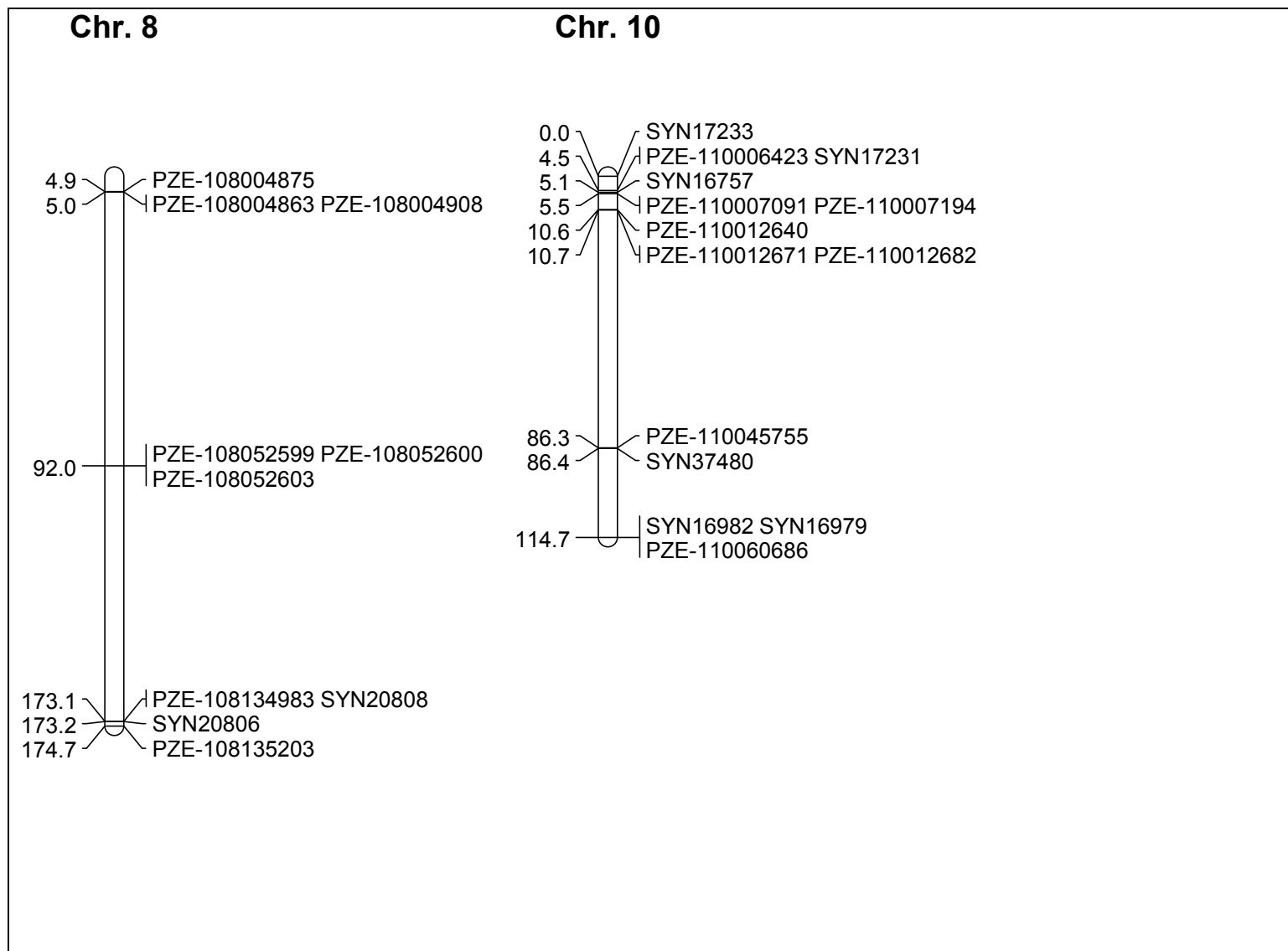


Figura 1 – Distribuição dos 96 SNPs nos 10 cromossomos do milho.

## TABELAS

Tabela 1 – Relação de primers SSR flanqueadores de QTLs para caracteres de qualidade de milho-pipoca, usados na seleção dos 96 SNPs usados nesse trabalho.

Primer 1	Primer 2	Caráter	Referência
umc1703	umc1661	PEV (Popping expansion volume)	Babu et al. (2006)
bnlg1325	umc1030	PEV	Babu et al. (2006)
umc1327	phi115	PEV	Babu et al. (2006)
umc2163	umc1336	PEV	Babu et al. (2006)
bnlg2086		FV (Flake volume)	Babu et al. (2006)
umc1705	umc1155	FV	Babu et al. (2006)
bnlg1012	umc1357	FV	Babu et al. (2006)
umc1336	bnlg1526	FV	Babu et al. (2006)
bnlg2086	umc1703	UPK (Unpopped kernel number)	Babu et al. (2006)
umc1148	bnlg1754	UPK	Babu et al. (2006)
phi096	umc1299	UPK	Babu et al. (2006)
phi085		UPK	Babu et al. (2006)
bnlg1012	umc1357	UPK	Babu et al. (2006)
umc1269	umc1948	PV (Popping volume)	Li et al. (2007)
umc2083	umc1281	PV	Li et al. (2007)
bnlg1643	umc1885	PV	Li et al. (2007)
phi299852	umc2165	PV	Li et al. (2007)
bnlg1070	bnlg339	PV	Li et al. (2007)
umc2147	bnlg2082	PV	Li et al. (2007)
phi427913	bnlg1429	FS (Flake size)	Li et al. (2007)
umc2214	phi101049	FS	Li et al. (2007)
bnlg1346	bnlg2305	FS	Li et al. (2007)
bnlg339	umc1112	FS	Li et al. (2007)
umc1269	umc1948	PR (Popping rate)	Li et al. (2007)
umc2083	umc1281	PR	Li et al. (2007)
bnlg1643	umc1885	PR	Li et al. (2007)
phi299852	umc2165	PR	Li et al. (2007)
umc1360	bnlg1863	PR	Li et al. (2007)

phi001	umc1676	PEV	Li et al. (2008)
umc2083	umc1281	PEV	Li et al. (2008)
bnlg1643	umc1885	PEV	Li et al. (2008)
phi299852	umc2165	PEV	Li et al. (2008)
umc2147	bnlg2082	PEV	Li et al. (2008)
umc1269	umc1948	PEV/GWP (Grain weight per plant)	Li et al. (2008)
phi001	umc1676	PEV/GWP	Li et al. (2008)
bnlg1057	umc2237	PEV/GWP	Li et al. (2008)
bnlg1643	umc1885	PEV/GWP	Li et al. (2008)
umc1841	bnlg2077	PEV/GWP	Li et al. (2008)
umc1462	bnlg345	PEV/GWP	Li et al. (2008)
phi299852	umc2165	PEV/GWP	Li et al. (2008)
umc2147	bnlg2082	PEV/GWP	Li et al. (2008)
umc1269	umc1948	PEV/100GW (100 grain weight)	Li et al. (2008)
bnlg1057	umc2237	PEV/100GW	Li et al. (2008)
bnlg1643	umc1885	PEV/100GW	Li et al. (2008)
bnlg1154	umc1462	PEV/100GW	Li et al. (2008)
phi299852	umc2165	PEV/100GW	Li et al. (2008)
bnlg339	umc1112	PEV/100GW	Li et al. (2008)
umc2147	bnlg2082	PEV/100GW	Li et al. (2008)
<hr/>			
phi097	umc1269	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc1269	umc1948	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
phi427913	bnlg1429	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc2227	bnlg1811	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc2083	umc1281	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
bnlg1643	umc1885	Popping (Spring and Summer)	Li et al. (2006)
umc2372	bnlg1329	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
bnlg2077	umc1042	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
umc2101		Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc1288	umc1964	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
phi079	bnlg1621	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc1478	bnlg565	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc1462	bnlg345	Popping (Summer)	Li et al. (2006)

phi299852	umc2165	Popping (Spring and Summer)	Li et al. (2006)
umc2147	bnlg2082	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
umc1360	bnlg1863	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
umc2371	bnlg1911	Popping (Spring and Summer)	Li et al. (2006)
umc1319	umc1576	Popping (Summer)	Li et al. (2006)
umc2069	umc2017	Popping (Spring)	Li et al. (2006)
P208	P51	Popping	Lu et al. (2003)
P5	P63	Popping	Lu et al. (2003)
P79		Popping	Lu et al. (2003)
P412	P406	Popping	Lu et al. (2003)
umc2275	umc1273	PV (BC2F2)	Li et al. (2009)
umc1389	phi109188	PV (BC2F2)	Li et al. (2009)
bnlg339	umc1112	PV (BC2F2)	Li et al. (2009)
umc1069	phi233376	PV (BC2F2)	Li et al. (2009)
umc1269	umc1948	PV (F2:3)	Li et al. (2009)
umc2083	umc1281	PV (F2:3)	Li et al. (2009)
bnlg1643	umc1885	PV (F2:3)	Li et al. (2009)
phi299852	umc2165	PV (F2:3)	Li et al. (2009)
bnlg1070	bnlg339	PV (F2:3)	Li et al. (2009)
umc2147	bnlg2082	PV (F2:3)	Li et al. (2009)
umc2275	umc1273	FS (BC2F2)	Li et al. (2009)
umc1389	phi109188	FS (BC2F2)	Li et al. (2009)
bnlg339	umc1112	FS (BC2F2)	Li et al. (2009)
umc1069	phi233376	FS (BC2F2)	Li et al. (2009)
phi427913	bnlg1429	FS (F2:3)	Li et al. (2009)
umc2214	phi101049	FS (F2:3)	Li et al. (2009)
bnlg1346	bnlg2305	FS (F2:3)	Li et al. (2009)
bnlg339	umc1112	FS (F2:3)	Li et al. (2009)
bnlg1811	umc2227	PR (BC2F2)	Li et al. (2009)
bnlg1643	umc1885	PR (BC2F2)	Li et al. (2009)
umc1269	umc1948	PR (F2:3)	Li et al. (2009)
umc2083	umc1281	PR (F2:3)	Li et al. (2009)
bnlg1643	umc1885	PR (F2:3)	Li et al. (2009)

phi299852 umc2165 PR (F2:3)

Li et al. (2009)

umc1360 bnlg1863 PR (F2:3)

Li et al. (2009)

---

Tabela 2 – Nome e localização dos 96 SNPs.

Nome	Chr	Posição (pb)
SYN17701	1	0
PUT-163a-91054912-4739	1	0
PUT-163a-16922676-1073	1	0
PUT-163a-5499487-2275	1	0
SYN6001	1	2195336
SYN27251	1	2419628
SYN38927-0_B_R_1602738111	1	2678506
SYN6413	1	7928849
PZE-101014003	1	7960963
PZE-101014266-1_T_F_1627954141	1	8063131
PZA-000175002	1	8510028
SYN11909	1	8551265
SYN11901	1	8552681
SYN20196	1	15463587
PUT-163a-16922676-1070	1	46190493
SYN11221	1	67782203
SYN11222	1	67782625
PZE-101083826	1	70861844
SYN38509	1	70935989
SYN38510	1	70936051
PZE-101120645	1	148557413
PZE-101120556	1	148569293
PZE-101120639	1	148624031
PZE-101131103	1	168108534
PZE-101131114	1	168109171
PZE-101131166	1	168410770
PZE-101162300	1	204925010
SYN422	1	235577952
SYN423	1	235582860

ZM011097-0676	1	235583110
SYNGENTA11666	2	202065493
PZE-102158721	2	202463538
PUT-163a-149100944-925	3	0
PUT-163a-148951348-515	3	5625502
PZE-103010658	3	5627810
SYNGENTA17024	3	5628209
SYN33444	3	14905814
SYN33443	3	14970725
SYN33442	3	14970963
PZE-103160210	3	209765288
PZE-103160218	3	209768115
PZE-103160227	3	211329295
SYN33394	3	213797806
PZE-103165953	3	213803339
PZE-104008299	4	5590650
PZE-104033459-1_B_F_1627955098	4	41665636
PZE-104033817-0_B_R_1595616512	4	42080862
PZE-104033826	4	42099597
PZE-104033791	4	42257485
SYN22745	4	153810613
PZE-104080384	4	153811246
SYN509	5	4208711
SYN524	5	4243432
SYN526	5	4243859
PZE-105018859	5	8508604
SYN12698	6	0
SYN4651	6	147877032
SYN4646	6	147881349
SYN4642	6	147881469
PZE-106100715	6	153459565
PZE-106100720	6	153460303
PZE-106100728	6	153465954

PZE-106115889	6	161773550
PZE-106116148	6	161844331
PZE-106116156	6	161857312
SYN12692	6	164077692
PZA02688.2	6	164081101
PZE-107083429	7	132642052
PZE-107083430	7	132642736
PZE-107105783	7	152206820
SYN36108	7	152209064
PZE-107105855	7	152229434
PZE-108004875	8	4922699
PZE-108004863	8	4967185
PZE-108004908	8	4978076
PZE-108052599	8	92025866
PZE-108052600	8	92025896
PZE-108052603	8	92027656
PZE-108134983	8	173107791
SYN20808	8	173129867
SYN20806	8	173149473
PZE-108135203	8	174703116
SYN17233	10	0
PZE-110006423	10	4513038
SYN17231	10	4515678
SYN16757	10	5115974
PZE-110007091	10	5481293
PZE-110007194	10	5533153
PZE-110012640	10	10633751
PZE-110012671	10	10720138
PZE-110012682	10	10730523
PZE-110045755	10	86328595
SYN37480	10	86416997
SYN16982	10	114654076
SYN16979	10	114654996

Tabela 3 – População, volume de expansão (EV; ml/g), peso de 100 grãos (KW; g), esfericidade (SP), densidade dos grãos (GD; g/ml); SNPs polimórficos, SNPs em equilíbrio de Hardy-Weinberg e diversidade gênica (heterozigosidade esperada; He)

População	EV	KW	SP	GD	SNPs Pol.	SNPs HWE	He
Viçosa c0	27.1	20.7	0.76	1.32	70	42	0.2453
Viçosa c1	30.6	18.4	0.79	1.30	72	26	0.3136
Viçosa c4	30.8	18.8	0.75	1.31	46	8	0.4144
Viçosa c2 fic	31.1	18.8	0.74	1.28	52	11	0.3892
Viçosa S4	26.7	19.8	0.74	1.29	63	23	0.3306
BF c1	25.9	19.4	0.73	1.33	73	29	0.3110

Tabela 4 – Índice de fixação

População	Viçosa c0	Viçosa c1	Viçosa c4	Viçosa c2 fic	Viçosa S4
Viçosa c1	0.062				
Viçosa c4	0.139	0.035			
Viçosa c2 fic	0.126	0.023	0.017		
Viçosa S4	0.138	0.042	0.026	0.026	
BF c1	0.123	0.039	0.031	0.030	0.007

Tabela 5 – Alteração mínima, média e máxima nas frequências alélicas em relação à Viçosa c0 e porcentagem de alteração maior que 30%

População	Min.	Med.	Max.	%
Viçosa c1	0.0020	0.1570	0.6934	74.3
Viçosa c4	0.0074	0.2329	0.9792	88.6
Viçosa c2 fic	0.0139	0.2306	0.7737	91.4
Viçosa S4	0.0002	0.2406	0.9244	100.0

Tabela 6 – Medidas de LD médio por grupos de ligação e geral (g).

População	D	D'	r <sup>2</sup>	Dg	D'g	r <sup>2</sup> g
Viçosa c0	0.0127	0.4302	0.0310	0.0102	0.4805	0.0187
Viçosa c1	0.0181	0.5899	0.1119	0.0152	0.6095	0.0852
Viçosa c4	0.0398	0.7559	0.1036	0.0398	0.7559	0.1036
Viçosa c2 fic	0.0605	0.8911	0.1905	0.0605	0.8911	0.1905
Viçosa S4	0.0072	0.6506	0.0605	0.0075	0.7289	0.0745
BF c1	0.0467	0.7304	0.1302	0.0485	0.7617	0.1411

Tabela 7 – SNPs com associação significativa a 5% para capacidade de expansão.

População	Chr	Posição (pb)	SNP	P-valor
Viçosa c0	1	148557413	PZE-101120645	0.0446
	2	202463538	PZE-102158721	0.0288
	3	211329295	PZE-103160227	0.0402
	4	153810613	SYN22745	0.0045
	5	4243432	SYN524	0.0253
Viçosa S4	3	209768115	PZE-103160218	0.0257
	5	4243859	SYN526	0.0256
	8	92027656	PZE-108052603	0.0257
	8	173129867	SYN20808	0.0257
	10	5115974	SYN16757	0.0257
BF c1	2	202065493	SYNGENTA11666	0.0031
	3	213803339	PZE-103165953	0.0447
	7	132642736	PZE-107083430	0.0467

Tabela 8 – SNPs com associação significativa a 5% para esfericidade.

População	Chr	Posição (pb)	SNP	P-valor
Viçosa c0	3	14970963	SYN33442	0.0280
Viçosa c1	1	15463587	SYN20196	0.0170
	1	46190493	PUT-163a- 16922676-1070	0.0184
	1	235577952	SYN422	0.0120
	3	14905814	SYN33444	0.0341
	3	213797806	SYN33394	0.0222
	4	153810613	SYN22745	0.0125
Viçosa c4	8	92025866	PZE-108052599	0.0353
Viçosa S4	1	15463587	SYN20196	0.0250
	1	148557413	PZE-101120645	0.0000
	1	148569293	PZE-101120556	0.0318
	2	202463538	PZE-102158721	0.0180
	3	209768115	PZE-103160218	0.0005
	3	213797806	SYN33394	0.0078
	4	5590650	PZE-104008299	0.0078
	5	4243859	SYN526	0.0200
	6	164081101	PZA02688.2	0.0025
	7	132642736	PZE-107083430	0.0018
	8	92027656	PZE-108052603	0.0005
	8	173107791	PZE-108134983	0.0083
	8	173129867	SYN20808	0.0005
	8	173149473	SYN20806	0.0006
	BF c1	10	0	SYN17233
10		5115974	SYN16757	0.0005
1		2419628	SYN27251	0.0241

Tabela 9 – SNPs com associação significativa a 5% para peso de 100 grãos.

População	Chr	Posição (pb)	SNP	P-valor
Viçosa c0	1	8063131	PZE-101014266- 1_T_F_1627954141	0.0382
	1	46190493	PUT-163a- 16922676-1070	0.0305
	8	92025896	PZE-108052600	0.0148
Viçosa c2 fic	3	5627810	PZE-103010658	0.0321
Viçosa S4	1	2195336	SYN6001	0.0285
	1	8510028	PZA-000175002	0.0244
BF c1	1	15463587	SYN20196	0.0080
	10	4513038	PZE-110006423	0.0238

Tabela 10 – SNPs com associação significativa a 5% para densidade de grãos.

População	Chr	Posição (pb)	SNP	P-valor
Viçosa c0	4	42257485	PZE-104033791	0.0255
	4	153811246	PZE-104080384	0.0335
Viçosa c1	1	0	PUT-163a- 5499487-2275	0.0017
	1	235577952	SYN422	0.0272
	2	202065493	SYNGENTA11666	0.0122
	3	0	PUT-163a- 149100944-925	0.0017
	3	14905814	SYN33444	0.0023
	7	152209064	SYN36108	0.0040
Viçosa c4	1	235577952	SYN422	0.0209
Viçosa c2 fic	1	0	PUT-163a- 5499487-2275	0.0457
	3	5627810	PZE-103010658	0.0249
	4	153810613	SYN22745	0.0084
	1	7928849	SYN6413	0.0379
Viçosa S4	3	213797806	SYN33394	0.0489
	4	5590650	PZE-104008299	0.0489
	10	4513038	PZE-110006423	0.0264
	1	46190493	PUT-163a- 16922676-1070	0.0283
BF c1	10	4513038	PZE-110006423	0.0176