

PRÉ-SELEÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA PARA
RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DE ESPIGAS OCACIONADA POR
Fusarium sp.

RAFAEL NUNES DE ALMEIDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2022

PRÉ-SELEÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA PARA
RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DE ESPIGAS OCACIONADA POR
Fusarium sp.

RAFAEL NUNES DE ALMEIDA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento de
Plantas”.

Orientador: Prof. Marcelo Vivas

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

A447

Almeida, Rafael Nunes de.

Pré-seleção de linhagens de milho-pipoca para resistência à podridão de espigas ocasionada por *Fusarium* sp. / Rafael Nunes de Almeida. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

119 f. : il.

Bibliografia: 73 - 92.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.

Orientador: Marcelo Vivas.

1. melhoramento de plantas. 2. recursos genéticos. 3. *Fusarium verticillioides*. 4. resistência a doenças. 5. nitrogênio. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

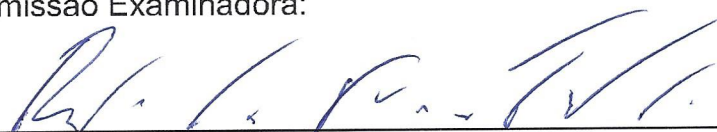
PRÉ-SELEÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO PIPOCA PARA
RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DE ESPIGAS OCASIONADA POR
Fusarium sp.

RAFAEL NUNES DE ALMEIDA

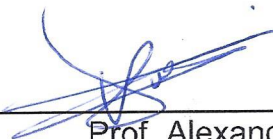
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 21 de fevereiro de 2022.


Comissão Examinadora:



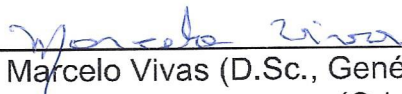
Dr. Roberto dos Santos Trindade (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas)
EMBRAPA



Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UENF



Prof. Marcelo Vivas (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos deu a graça da inteligência e que cultivava em nós a curiosidade em conhecer a grandeza de sua obra por meio da ciência.

Aos meus familiares e a minha companheira de vida, por serem meu alicerce e força de motivação para as lutas e conquistas da vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, na pessoa de todos os professores integrantes, pela oportunidade e apoio para realização do doutorado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento dos projetos de pesquisa.

Ao meu orientador, pela confiança e oportunidade de crescimento profissional, pelo respeito e pela humanidade na forma de se relacionar com a equipe de trabalho.

Aos colegas de trabalho, sem os quais este trabalho não seria possível. Agradeço o companheirismo, a sinceridade e a dedicação prestada.

A todas as minhas professoras e professores, que trabalharam no meu crescimento profissional e pessoal. Reconheço, com muito carinho, que todas as minhas conquistas são consequências do esforço de bons profissionais e excelentes seres humanos com os quais tive o privilégio de conviver.

Agradeço aos governantes brasileiros que, em anos anteriores, viabilizaram oportunidades de estudos para que pessoas como eu, filho de um zelador e de uma dona de casa, pudessem, por força de seu mérito e determinação, conquistar títulos acadêmicos e acessar melhores oportunidades de trabalho.

Agradeço em especial a todos os colegas cientistas, que trabalharam no desenvolvimento de vacinas durante os últimos anos, para que eu, meus familiares e amigos, pudéssemos agora, estarmos imunizados contra o vírus Covid 19, responsável pela morte de mais de meio milhão de brasileiros e brasileiras durante a pandemia que se estende por mais de dois anos.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. CAPÍTULOS	5
3.1 CAPÍTULO 1 – RESPOSTA DE LINHAGENS DE MILHO PIPOCA A PODRIDÃO DE ESPIGA SOB CONDIÇÕES DE INFECÇÃO NATURAL	5
3.1.1. INTRODUÇÃO	5
3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1.2.1. Cadeia produtiva do milho-pipoca no Brasil	7
3.1.2.2. Podridão de espiga ocasionada por <i>Fusarium</i> : desenvolvimento e importância econômica	8
3.1.2.3. Melhoramento para resistência a podridão de espiga em milho	10
3.1.2.4. Melhoramento de milho-pipoca na UENF	12
3.1.2.5. Dispersão de doenças no campo e análises de correlação espacial: uso da função K de Ripley	16
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.3.1. Material Vegetal	20
3.1.3.2. Ensaios de Competição	21

3.1.3.3. Avaliação da incidência e severidade de FER	24
3.1.3.4. Análise Estatística	25
3.1.3.4.1. Significância das fontes de variação	25
3.1.3.4.2. Seleção de linhagens com potencial de resistência a FER	27
3.1.3.4.3. Inferência sobre correlações espaciais na ocorrência da doença	28
3.1.3.4.4. Ferramentas e procedimentos para execução das análises	29
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1.5. CONCLUSÕES	46
3.2. PODRIDÃO DE ESPIGA EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA: RESPOSTA DIFERENCIAL EM RELAÇÃO A QUANTIDADE DE NITROGÊNIO APLICADO.....	47
3.2.1. INTRODUÇÃO	47
3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA	49
3.2.2.1. Obtenção de linhagens e desenvolvimento de híbridos em milho	49
3.2.2.2. Métodos de avaliação e seleção para resistência à podridão de espiga ocasionada por <i>Fusarium</i> em milho	52
3.2.2.3. Melhoramento para eficiência no uso de nitrogênio	53
3.2.2.4. Relação entre doenças e aplicação de nitrogênio: desafios para o melhoramento genético	55
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.2.3.1. Material Vegetal	57
3.2.3.2. Caracterização dos ensaios de competição	58
3.2.3.3. Condução dos ensaios experimentais	60
3.2.3.4. Avaliação de podridão de espiga	60
3.2.3.5. Análises Estatísticas	61
3.2.4. RESULTADO	63
3.2.5. DISCUSSÃO	69
3.2.6. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE	93
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organograma de desenvolvimento de cultivares do programa de melhoramento de cultivares do programa de melhoramento genético de milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro durante 20 anos: 2001 a 202114
- Figura 2.** Ilustração do processo de contagem de pontos por intervalos de distância a partir de pontos centrais (A) e; resultado gráfico (B) para o teste de hipótese de distribuição espacial entre pontos a partir da transformação dos valores estimados pela função K de Ripley em valores de L(s), onde: a linha contínua representa os valores reais (observados) estimados para dada intervalo de distância e, as linhas pontilhadas delimitam o envelope de confiança (área em azul claro)19
- Figura 3.** Ilustração da escala diagramática adaptada a qual foi utilizada na avaliação de podridão de espiga causada por *Fusarium verticillioides* em milho-pipoca (parte mais clara representa a porção com sintomas visíveis)24
- Figura 4.** Mapa de ocorrência de podridão de espiga ocasionada por *Fusarium* nas parcelas (cada um dos retângulos dentro de cada ensaio; retângulos com linhas cruzadas na diagonal representam parcelas perdidas), de cada ensaio de competição das safras de inverno 2019 (A) e de verão 2019/2020 (B –

Experimentos 1 a 3) e verão 2020/2021 (B – Experimentos 4 a 6) em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil	30
Figura 5. Histograma de notas (percentagem de doença) para incidência e severidade de podridão em espigas incididas por <i>Fusarium</i> (FER), durante as safras de inverno de 2019 (barras em azul) e de verão de 2019/20 e 2020/21 (barras em vermelho) em Campos dos Goytacazes, RJ	32
Figura 6. Condições climáticas em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, no período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2021. Dados do INMET (2021)	33
Figura 7. Dispersão de linhagens endogâmicas de milho-pipoca quanto à severidade de podridão de espiga em função das safras de avaliação	39
Figura 8. Dispersão entre parcelas experimentais das linhagens de milho-pipoca resistentes a podridão de espiga e, dispersão dos valores estimados para a função K de Ripley transformada pela função L(s), respectivamente, na área experimental dos ensaios de inverno (A e B) e de verão nas safras de 2019/20 (C e D) e 2020/21 (E e F)	41
Figura 9. Imagem de espigas das linhagens S ₇ de milho-pipoca selecionados como candidatos a fontes de resistência a podridão de espiga por <i>Fusarium</i> , dentre 176 linhagens do Banco de Germoplasma da UENF	43
Figura 10. Ilustração da estação experimental do Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo (A), em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil; com a organização dos ambientes (B) com aplicação de nitrogênio em quantidade integral (IN e baixa (BN), bem como organização dos blocos dentro de cada experimento (C)	58
Figura 11. Condições climáticas no período de dezembro de 2018 a março de 2019 em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)	60
Figura 12. Gradiente ambiental de incidência de podridão de espiga nas parcelas de cinco ensaios de competição entre linhagens de milho-pipoca, em ambientes contrastantes quanto à aplicação de nitrogênio: IN – ambiente com aplicação da	

quantidade integral de nitrogênio recomendado; BN – ambiente com aplicação de baixa quantidade de nitrogênio64

Figura 13. Agrupamento de médias entre genótipos de milho-pipoca de acordo com a severidade de podridão de espiga ocasionada por *Fusarium* em experimentos com aplicação da quantidade integral de N (IN) e quantidade reduzida de N (BN)66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das linhagens S ₇ avaliadas no estudo e suas respectivas populações e países de coleta	21
Tabela 2. Quadro geral de análise de variância para análise de grupos de experimentos em blocos completos casualizados com tratamentos comuns, conforme proposto por Gomes e Guimarães (1970)	26
Tabela 3. Análise de variância individual para os diferentes ensaios de competição entre linhagens S ₇ de milho-pipoca nas safras de inverno e verão em Campos dos Goytacazes, RJ	35
Tabela 4. Análise de variância para ensaios de competição entre linhagens S ₇ de milho-pipoca, considerando modelo de análise em grupos de experimentos desbalanceados em blocos ao acaso com tratamentos comuns, nas safras de inverno (2019) e verão (2019/10 e 2020/21), em Campos dos Goytacazes, RJ.....	36
Tabela 5. Análise de variância individual para ensaios de competição entre linhagens S ₇ de milho-pipoca, considerando modelo de blocos ao acaso, nas safras de inverno (2019) e verão (2019/10 e 2020/21), em Campos dos Goytacazes, RJ	37

Tabela 6. Análise de variância conjunta para ensaios de competição entre linhagens S ₇ de milho-pipoca, considerando modelo de blocos ao acaso em duas diferentes safras (inverno e verão), em Campos dos Goytacazes, RJ	38
Tabela 7. Severidade (%) de <i>Fusarium</i> nas espigas (SFER), rendimento de grãos (kg.ha ⁻¹) e capacidade de expansão (ml.g ⁻¹) para as linhagens que apresentaram severidade de podridão abaixo da média geral em ambas as safras.....	42
Tabela 8. Lista das populações de polinização aberta com seu respectivo país de origem e instituição doadora, com respectivo número (Num.) de linhagens avaliadas sob diferentes condições de aplicação de nitrogênio	57
Tabela 9. Análise de variância para grupos de experimentos em blocos completos casualizados com tratamentos comuns, para dados de severidade de podridão de espiga por <i>Fusarium</i> em linhagens de milho-pipoca, em dois ambientes: aplicação integral (IN) e aplicação reduzida (BN) da quantidade de nitrogênio recomendado; no município de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.....	65
Tabela 10. Análise de variância individual e conjunta para severidade de podridão de espiga por <i>Fusarium</i> em milho-pipoca, em ambientes (N) contrastantes quanto a quantidade de nitrogênio aplicado: quantidade integral da recomendação (IN) e baixa quantidade (BN)	65

RESUMO

ALMEIDA, Rafael Nunes de; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2022. Pré-seleção de linhagens de milho-pipoca para resistência à podridão de espigas ocasionada por *Fusarium* sp. Orientador: Prof. Marcelo Vivas. Conselheiros: Prof. Antônio Teixeira do Amaral Junior e Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

A cultura do milho-pipoca movimenta significativa fatia do mercado global de milho, o que faz desta, uma cultura importante para países exportadores como o Brasil. Doenças de espiga, a exemplo, da podridão de espiga causada por *Fusarium*, prejudicam tanto a produtividade quanto a qualidade dos grãos em milho-pipoca podendo ainda trazer riscos à saúde do consumidor. O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho *per se* de linhagens endogâmicas de milho-pipoca para resistência a *Fusarium* sob condições de infecção natural. No primeiro capítulo, buscou-se identificar linhagens com potencial de resistência a podridão de espiga. Para isso, a ocorrência de podridão foi avaliada em 176 linhagens endogâmicas de milho-pipoca. O delineamento de grupos de experimentos com tratamentos comuns dispostos em blocos ao acaso foi utilizado, totalizando cinco experimentos em safras de inverno e seis experimentos em safras de verão. Foi avaliado a incidência de espigas com sintomas de podridão e a severidade de podridão nas espigas incididas. Os dados de incidência foram utilizados para estudo de distribuição espacial da doença na área experimental. Os dados de severidade da doença foram submetidos a análise de variância. A seleção de linhagens com potencial

para resistência tomou como ponto de truncamento o valor de 25,73% de severidade acrescido do intervalo de confiança estimado para cada safra. Dezoito linhagens de 10 diferentes genealogias apresentaram severidade da doença abaixo do ponto de truncamento nas duas safras. A elevada incidência da doença na área experimental como um todo, principalmente nas safras de verão, somado à aleatoriedade na distribuição das parcelas com linhagens pré-selecionadas para resistência, garantiram precisão suficiente para identificação de linhagens suscetíveis a podridão de espiga. Dentre as 18 linhagens identificadas com potencial resistência a *Fusarium*, L69, L77, L274, L292, L503, L688, L689 e P9 apresentaram valores de capacidade de expansão acima de 27 mL g⁻¹. Essas linhagens poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de híbridos que reúnam boa capacidade de expansão, rendimento de grãos e resistência a *Fusarium*. No segundo trabalho, o objetivo foi investigar as modificações na severidade de podridão devido a alterações na quantidade de nitrogênio aplicado e identificar linhagens com potencial de resistência para duas condições distintas de aplicação de nitrogênio. Foram avaliadas 94 linhagens de milho-pipoca em ambiente com baixa aplicação de nitrogênio (61,5 kg ha⁻¹) e aplicação de quantidade integral recomendada (150 kg ha⁻¹). Em cada ambiente, adotou-se o delineamento de grupos de experimentos em blocos completos casualizados com tratamentos comuns. Foi avaliado a incidência e a severidade de podridão nas espigas. Os dados de incidência foram utilizados para monitoramento da distribuição espacial da doença nas áreas experimentais. Os dados de severidade foram submetidos a análise de variância seguido de agrupamento de médias pelo algoritmo de Scott e Knott. A quantidade de nitrogênio aplicada modificou o nível de severidade de podridão de espiga em elevado número de linhagens, havendo significativa interação genótipo x ambiente. As linhagens L80 e L294 apresentaram reduzidos valores de incidência nos dois ambientes. Cinco linhagens apresentaram potencial de resistência em baixa aplicação de nitrogênio e seis linhagens apresentaram potencial resistência sob aplicação integral de nitrogênio. Dentre as nove linhagens que apresentaram reduzida severidade de podridão no ambiente de baixo e/ou integral aplicação de nitrogênio, oito são advindas de populações de milho-pipoca provenientes da região que compreende o sul do Brasil, Uruguai e Paraguai. Os dois trabalhos de caracterização desenvolvidos mostraram que o programa de melhoramento de milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense

Darcy Ribeiro detém germoplasma com potencial para geração de cultivares resistentes a podridão de espiga ocasionada por *Fusarium*, para diferentes condições ambientais. Os resultados reafirmam a importância de investimentos sobre esse germoplasma e aponta um futuro promissor para o programa de melhoramento de milho-pipoca visando resistência à podridão de espiga.

Palavras-chave: melhoramento de plantas, recursos genéticos, *Fusarium verticillioides*, resistência a doenças, nitrogênio.

ABSTRACT

ALMEIDA, Rafael Nunes de; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2022. Pre-selection of popcorn lines for resistance to ear rot caused by *Fusarium* sp. Advisor: Marcelo Vivas. Committee members: Antônio Teixeira do Amaral Junior and Silvaldo Felipe da Silveira.

The popcorn crop moves a significant share of the global corn market, which makes it an important crop for exporting countries such as Brazil. Ear diseases, such as ear rot caused by *Fusarium*, damage both yield and grain quality in popcorn and may also pose risks to consumer health. The objective of this work was to evaluate the per se performance of inbred lines of popcorn for *Fusarium* resistance under natural infection conditions. In the first work, we sought to identify lines with potential resistance to ear rot. The occurrence of ear rot was evaluated in 176 inbred lines. The design of groups of experiments with common treatments arranged in randomized blocks was used, totaling five experiments in the winter season and six experiments in summer seasons. The incidence of ears with rot symptoms and the severity of rot in the affected ears were evaluated. Incidence data were used to study the spatial distribution of the disease in the experimental area. Disease severity data were subjected to analysis of variance. The selection of lines with potential for resistance took as a truncation point the value of 25.73% of severity plus the confidence interval estimated for each crop season. Eighteen lines from 10 different populations showed disease severity below the truncation point in both

seasons. The high incidence of the disease in the experimental area as a whole, especially in the summer seasons, added to the randomness in the distribution of plots with lines pre-selected as resistant, ensured sufficient precision to identify lines susceptible to ear rot. Among the 18 lines identified with potential resistance to *Fusarium*, L69, L77, L274, L292, L503, L688, L689 and P9 showed popping expansion values above 27 mL g⁻¹. These lines can be used for the development of hybrids that have good popping expansion, grain yield and resistance to *Fusarium*. In the second work, the objective was to investigate the changes in rot severity due to changes in the amount of nitrogen applied and to identify lines with potential resistance to two different conditions of nitrogen application. Ninety-four popcorn lines were evaluated in an environment with low nitrogen application (61.5 kg ha⁻¹) and application of the total recommended amount (150 kg ha⁻¹). In each environment, the design was adopted in groups of experiments in complete randomized blocks with common treatments. The incidence and severity of ear rot was evaluated. Incidence data were used to monitor the spatial distribution of the disease in the experimental areas. Severity data were submitted to analysis of variance followed by grouping of means by the Scott and Knott algorithm. The amount of nitrogen applied modified the ear rot severity level in a high number of lines, with a significant genotype x environment interaction. Lines L80 and L294 showed reduced incidence values in both environments. Five lines showed resistance potential under low nitrogen application and six lines showed resistance potential under full nitrogen application. Among the nine lines that showed reduced severity of rot in the environment of low and or full application of nitrogen, eight are from popcorn populations from the region that comprises southern Brazil, Uruguay and Paraguay. The two characterization works developed showed that the popcorn breeding program of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro has germplasm with the potential to generate cultivars resistant to ear rot caused by *Fusarium*, in different conditions. The results effort the importance to germplasm conservation and show a promising future to popcorn breeding to disease resistance.

Keywords: Plant breeding, maize genetic resources, *Fusarium verticillioides*, diseases resistance, nitrogen.

1. INTRODUÇÃO

O milho-pipoca é um alimento aperitivo apreciado em diversos países. Devido a popularidade da cultura, a comercialização dos grãos tem movimentado considerável porção da economia em países de base agrícola. O Brasil é o terceiro maior produtor e exportador mundial de milho-pipoca e movimentou anualmente cerca de 383 milhões de dólares em exportação nos últimos dois anos (FAO, 2021). Embora seja uma quantia considerável, o Brasil enfrenta um cenário de redução nas exportações desde 2016.

Na lista de desafios para o aumento constante da produção de milho-pipoca nos trópicos, o desenvolvimento de sementes melhoradas e plantas mais adaptadas a adversidades climáticas, bem como o aumento de incentivos financeiros aos produtores se destacam (Chapman et al., 2012; Wen et al., 2021). Além disso, em comparação com milho comum, a cultura do milho-pipoca ainda enfrenta desafios adicionais, como a maior taxa de quebra e acamamento das plantas, e elevada ocorrência de pragas e doenças.

Em regiões tropicais, a incidência de doenças fúngicas, principalmente no período pós-colheita é uma preocupação para produção de grãos (Suleiman et al., 2013). Fatores como a elevada umidade relativa do ar e a maior ocorrência de chuvas favorecem o desenvolvimento de fungos e conseqüentemente aumentam os prejuízos econômicos nas lavouras atacadas (Almeida et al., 2019).

Dentre as doenças fúngicas que ocorrem no milho de forma geral, as manchas foliares e podridões de colmo e de grãos são aquelas com maior potencial

de danos à produção de biomassa e de grãos (Hurni et al., 2015; Mueller et al., 2016). Em especial, podridões de grãos causadas por fungos do gênero *Fusarium*, têm sido um dos fatores preocupantes na produção de milho. Além de prejudicar o peso médio dos grãos, a infecção por *Fusarium* impulsionam os riscos de produção de micotoxinas, como fumonisina B1 (Morales et al., 2018). Esse tipo de micotoxina tem sido associado ao desenvolvimento de câncer em órgãos dos sistemas circulatório e digestório em animais e humanos (Yu et al., 2021).

Embora o uso de fungicidas seja uma forma de controle amplamente empregada na cultura do milho, o desenvolvimento de cultivares com resistência genética às podridões representa a estratégia mais eficaz no controle do patógeno (Wen et al., 2021). Trabalhos de melhoramento para resistência a podridão de espigas ocasionada por *Fusarium* (PEF ou ainda FER – do termo em inglês “*Fusarium ear rot*”, amplamente utilizado na literatura) têm sido frequentes na cultura do milho (Hung e Holland et al., 2012; Masterházi et al., 2012; Kuki et al., 2020; Butoto et al., 2021). No entanto, para milho-pipoca, no Brasil, apenas dois dentre os grupos de melhoramento de milho-pipoca possuem registro de trabalhos científicos que buscam desenvolver cultivares com resistência a FER: os grupos de melhoramento da Universidade Estadual do Norte Fluminense, no Rio de Janeiro (Kurosawa et al., 2017; Almeida et al., 2021), e da Universidade Estadual de Maringá, no Paraná (Gabriel et al., 2018).

Para além das demandas de maior resistência a doenças, o melhoramento de milho-pipoca também tem demandado o desenvolvimento de cultivares com maior adaptação a estresses ambientais como déficit hídrico e redução na disponibilidade de nutrientes (Santos et al., 2017; Kamphorst et al., 2021; Kurosawa et al., 2021). Nesse sentido, ensaios experimentais conduzidos a fim de selecionar genótipos com maior eficiência no uso de nutrientes têm possibilitado aos melhoristas que trabalham com resistência a doenças, investigar um pouco mais sobre a complexidade dos diversos patossistemas envolvidos na cultura do milho (Kurosawa et al., 2021).

Assim, a identificação de genótipos com fontes de alelos favoráveis para melhor adaptação das plantas a estresses bióticos, como a ocorrência de doenças, e estresses abióticos, a exemplo da maior eficiência no uso de nutrientes, tornou-se uma oportunidade nos programas de melhoramento de milho-pipoca.

Os países da América do Sul, notadamente detém coleções de germoplasma que podem ser de interesse ao melhoramento da cultura. As informações a respeito do potencial desse germoplasma na incorporação de resistência a doenças fúngicas são importantes para programas de melhoramento de milho de regiões tropicais como um todo. Essa demanda, oportuniza assim, estudos que visem caracterizar e conhecer o potencial do germoplasma de milho-pipoca sul-americano.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar linhagens de milho-pipoca em geração S₇ com potencial genético para resistência à podridão de espiga ocasionada por *Fusarium*.

2.2. Objetivos específicos

Inferir sobre o desempenho *per se* de linhagens endogâmicas de milho-pipoca para resistência à podridão de espiga ocasionada por *Fusarium* sob condições de infecção natural a campo;

Obter informações iniciais a respeito da influência da quantidade de nitrogênio aplicado na ocorrência de podridão de espiga em linhagens de milho-pipoca; e

Apontar aquelas linhagens com potencial agronômico e de resistência a podridão de espiga para serem testadas em combinação nas etapas futuras do programa de melhoramento.

3. CAPÍTULOS

3.1. CAPÍTULO 1 - RESPOSTA DE LINHAGENS DE MILHO- PIPOCA A PODRIDÃO DE ESPIGA SOB CONDIÇÕES DE INFECÇÃO NATURAL

3.1.1. INTRODUÇÃO

A produção de cereais em zonas de clima tropical enfrenta como desafio a redução dos prejuízos ocasionados pela incidência de pragas e doenças. As doenças fúngicas, principalmente, podem ser mais severas devido às condições climáticas favorecerem a produção de estruturas reprodutivas e conseqüentemente a dispersão do patógeno nas áreas de cultivo (Almeida et al., 2019).

O milho-pipoca (*Zea mays* var. *everta*) é um tipo especial de milho destinado especificamente ao consumo humano. Além das características de maior espessura do pericarpo e capacidade de expansão, diferenciam o milho- pipoca do milho comum também a maior suscetibilidade a doenças.

Além de doenças fúngicas foliares com potencial de redução da produtividade de grãos, doenças fúngicas nas espigas também representam uma preocupação não só com a produtividade, mas também com a qualidade fitossanitária dos grãos (Magan et al., 2003; Di Domenico et al., 2015; Likhayo et al., 2018). A ocorrência de fungos do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*

tem sido relatada dentre os temas de riscos à segurança alimentar relacionada à produção de grãos de milho em geral (Ekwomadu et al., 2018).

Espécies de *Fusarium*, em especial *F. verticillioides*, são as mais frequentes em grãos de milho. Esse tipo de patógeno degrada o amido presente no interior dos grãos ocasionando um tipo de podridão seca nos grãos, a chamada podridão de espiga. No caso de *F. verticillioides*, os grãos atacados apresentam um sintoma característico com estrias rosadas visíveis nos grãos, o chamado “*starbust*” (Duncan e Howard, 2010). Essas estrias são micélios desenvolvidos dentro dos grãos, conferindo aspecto de grãos mofados ou ardidos.

Além do potencial de redução na produção de grãos sadios com padrão comercial, podridões de espiga são preocupantes no processo produtivo devido ao potencial de produção de micotoxinas. No caso de *F. verticillioides*, há risco de produção de fumonisinas, as quais têm sido relacionadas como potenciais moléculas promotoras de câncer no sistema digestivo humano (Yu et al., 2021).

A principal forma de garantir a maior qualidade de grãos em milho tem sido a utilização de cultivares com níveis de resistência cada vez maiores. No entanto, em milho-pipoca, há ainda poucos estudos com podridão de espiga quando comparado com os estudos em milho comum.

A identificação de germoplasma com fonte de resistência à podridão de espiga é um importante passo para a disponibilização de cultivares. A menor taxa de grãos mofados contribui para maior qualidade fitossanitária do produto final, e representa a diminuição de riscos com a segurança alimentar, haja vista a possibilidade de redução de micotoxinas (Wen et al., 2021).

Na América do Sul, centro secundário de diversidade do milho, a ocorrência de doenças fúngicas é um dos fatores limitantes ao aumento da produtividade. Por outro lado, a elevada produção de milho-pipoca em países como Argentina e Brasil (FAO - Tridge, 2021), faz também dessa região uma zona sobre forte pressão de seleção natural para resistência a esse tipo de doença.

Sobre essa hipótese, este trabalho se propôs a inferir sobre a variabilidade genética de linhagens endogâmicas de milho-pipoca para o caráter de resistência à podridão de espiga e, indicar linhagens com potencial de contribuir para o desenvolvimento de híbridos com melhor qualidade de sementes e grãos.

3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.2.1. Cadeia produtiva do milho-pipoca no Brasil

O milho-pipoca tem gerado uma movimentação anual em torno de 2 bilhões de dólares na economia mundial (FAO, 2021). O Brasil é o terceiro maior produtor de milho-pipoca amarelo e o terceiro maior exportador (Chancellor, 2021). De acordo com dados da Câmara Argentina de Milho-pipoca, o Brasil importou 3.856,52 toneladas de milho-pipoca no ano de 2017, com quantidades decrescentes (-85,4%) nas importações nos anos de 2018 e 2019 (CAMPI, 2021).

Segundo dados da FAO, até 2020, os cinco primeiros países no ranking de exportação de milho-pipoca foram Estados Unidos, Ucrânia, Brasil, Argentina e França. O Brasil era até então responsável por 16,39% das exportações, movimentando \$383,91 milhões de dólares para a economia nacional ao ano. As exportações brasileiras ocorrem majoritariamente para o Japão, seguido de Egito e Espanha (FAO 2021). O Brasil disputa o mercado de milho-pipoca egípcio com Argentina e Ucrânia, disputa o mercado consumidor japonês com Estados Unidos e o mercado espanhol com Ucrânia e França (FAO 2021). Dentre os cinco maiores exportadores, Brasil e Argentina são os únicos que tiveram reduções nos volumes exportados nos últimos 5 anos, reduções estas na faixa de 46,99% e 66,66%, respectivamente (FAO - Tridge, 2021).

A escassez hídrica ocorrida no Brasil nos últimos anos é apontada como principal fator responsável pela redução na produtividade de milho-pipoca no país (Faria Junior et al., 2020). A redução na produtividade é resultante tanto das perdas possíveis pelo estresse hídrico ou ainda pelo não plantio de milho-pipoca na 2ª safra (safrinha) devido a inseguranças dos produtores quanto à falta de chuvas ou indisponibilidade de água para cultivos irrigados. De acordo com dados de empresas privadas atuando no mercado de milho-pipoca brasileiro, apesar da redução na produtividade nos últimos anos, os produtores têm aumentado a cada ano sua produção devido à capacidade de reduzir os estresses ambientais na cultura. A projeção de produção de 113,2 milhões de toneladas para a safra 2027/28 (Chancellor, 2021).

No Brasil, a região centro-oeste é a maior produtora de milho-pipoca, com destaque para o estado do Mato Grosso, o qual possui condições edafoclimáticas adequadas para o cultivo ao longo de todo o seu território (Faria Junior et al., 2020). Os produtores de milho-pipoca brasileiros são majoritariamente os mesmos que produtores de soja, sendo o milho-pipoca uma cultura de baixo custo e de preço competitivo no mercado como boa opção para os plantios de safrinha (Chancellor, 2021).

O preço médio do milho-pipoca no estado do Mato Grosso considerando os últimos quatro anos está em torno de R\$ 45,00 a saca de 60 kg, valor este, superior ao preço médio do milho comum (R\$ 42,00 a saca de 60 kg) no mesmo período na região (Conab, 2021). Além de maior, o preço médio do milho-pipoca é menos instável que o preço do milho comum, fator este que motiva muitos produtores de soja a plantarem o milho-pipoca na entressafra.

Todavia, em termos de produtividade de grãos, o milho comum produz pelo menos 1,5 vezes mais, fazendo com que a vantagem de preço do milho-pipoca nem sempre seja um fator motivador para seu plantio. Essa desvantagem produtiva se dá pelo fato de o milho-pipoca ser uma subespécie com plantas menos vigorosas, mais suscetíveis ao acamamento e a doenças do que as cultivares tradicionais de milho comum. Em vista de aumentar a produtividade e conseqüentemente a lucratividade da cultura, o melhoramento genético tem atuado visando desenvolver cultivares mais vigorosas, produtivas, com boa capacidade de expansão e com resistência a doenças.

3.1.2.2. Podridão de espiga ocasionada por *Fusarium*: desenvolvimento e importância econômica

Podridões em grãos podem ser causadas por diferentes gêneros de fungos: *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Ekwomadu et al., 2018). Em milho, as espécies mais frequentemente relatadas são *F. graminearum*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (Madrigal et al., 2015; Carbas et al., 2021). Todavia, a espécie predominante na podridão de espiga em milho é *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Nirenberg e O'Donnell 1998) (sinônimo *F. moniliforme*, teleomorfo *Gibberella moniliformis*), agente patogênico da doença conhecida como podridão rosada da espiga (Carbas et al., 2021). O nome se dá devido aos sintomas

característicos desde a presença de estrias rosadas nos grãos, o denominado “*star burst*” até a aparência de grãos podres (Morales et al., 2018; Carbas et al., 2021).

A distribuição do fungo é pandêmica com ocorrência mais intensa nas regiões produtoras de milho das zonas tropicais, principalmente em países da África e América do Sul (Zambrano et al., 2021). Dentre os fatores que contribuem para a ampla distribuição do patógeno está sua capacidade de reprodução a partir de esporos presentes em restos de culturas deixados no solo e ainda de utilizar plantas espontâneas como hospedeiros temporários.

Fungos do gênero *Fusarium* são em sua maioria policíclicos. A partir da germinação dos esporos, as hifas do fungo podem acessar as plantas também via raízes, provocando também a podridão de colmo (Blacutt et al., 2018; Gai et al., 2018). No entanto, no caso da podridão de espiga as vias de acesso mais comuns do patógeno aos grãos são os estigmas e ferimentos decorrentes da ação de insetos.

Durante a polinização, hifas e esporos são trazidos com o vento ou até mesmo junto com grãos de pólen. Após depositados sobre a extremidade do estigma, as hifas se desenvolvem ao longo dos estigmas e acessam os grãos pelo canal estilar. Outra forma muito comum é a deposição de esporos que são trazidos pelo vento ou por insetos sob ferimentos nos grãos, causados geralmente por insetos, pragas como lagarta-do-cartucho ou gorgulhos (Duncan e Howard, 2010, Blacutt et al., 2018; Gai et al., 2018).

Para além das características biológicas que favorecem a ação de *Fusarium* em grãos de milho, condições ambientais favoráveis nas regiões produtoras contribuem para o desenvolvimento rápido do patógeno. Temperaturas entre 17°C e 27°C, associado a elevada umidade do substrato, favorece a germinação e reprodução de esporos de *F. verticillioides* (Rossi et al., 2009). No Brasil, por exemplo, devido à maior frequência de chuvas, os plantios de milho sequeiro são mais acometidos por esse tipo de patógeno nas safras de verão. No entanto, pode haver também a elevada ocorrência de podridões também nas safras de inverno naqueles plantios irrigados, devido a manutenção da taxa de umidade.

Além das preocupações com a contaminação no campo, há também as preocupações com a infecção de grãos nas etapas pós-colheita. Uma vez havendo a presença de grãos infectados pelo patógeno, o armazenamento de grãos com

teor de umidade acima de 15% poderá favorecer a proliferação de *Fusarium* nos grãos até então sadios, durante vários meses (Atukwase et al., 2012).

O principal prejuízo decorrente da ocorrência de podridão em grãos se dá na redução da produtividade e a qualidade fitossanitária dos grãos. A redução no peso médio dos grãos pode gerar perdas de até 40% na produção (Narro et al., 2017). Além da redução da massa total de grãos produzidos, as perdas podem ser ainda maiores se considerado a produção comercialmente viável, devido a possibilidade de não adequação de lotes devido a elevada quantidade de grãos mofados. A legislação brasileira determina um limite máximo de 5 a 6% de grãos mofados (aspecto característico da podridão) nos lotes destinados a comercialização (MAPA, 2011; Anvisa, 2011).

Além dos impactos econômicos diretos, outro aspecto importante, e que tem sido alvo mais intenso de pesquisadores na última década, é o risco de contaminação por micotoxinas produzidas por fungos do complexo de podridão dos grãos (Wokorach et al., 2021).

F. verticillioides, por exemplo, tem potencial para produzir micotoxinas do tipo Fumonisina B1 e B2 (Blacutt et al., 2018; Wokorach et al., 2021). As fumonisinas têm sido associadas a câncer hepático em cavalos, câncer no pâncreas em suínos e relatadas como substâncias promotoras câncer no esôfago em seres humanos (Yu et al., 2021).

Dessa forma, os riscos emergentes da infecção de grãos de milho por fungos, posicionam os trabalhos de redução de doenças e aumento da qualidade fitossanitária de grãos como estratégias essenciais para garantia da segurança alimentar.

3.1.2.3. Melhoramento para resistência a podridão de espiga em milho

Dado que espécies de *Fusarium* estão distribuídas em todas as regiões produtoras de milho do mundo e que as condições climáticas das zonas tropicais favorecem o desenvolvimento de epidemias, os pesquisadores têm investido em ferramentas capazes de diminuir a suscetibilidade das plantas hospedeiras.

Como métodos de controle, há relatos de utilização de produtos químicos não específicos e também de potencial na utilização de produtos naturais e

predadores naturais para controle biológico (Ferrigo et al., 2020; Gxasheka et al., 2020; Guimarães et al., 2021).

Embora promissor, o potencial de redução da severidade de podridão por meio dessas formas de controle ainda é baixo comparado à redução potencial pela utilização de cultivares resistentes. Nesse sentido, o investimento em programas de melhoramento com foco no desenvolvimento de cultivares resistentes é a estratégia de controle mais eficiente para redução de podridões de espiga e consequentemente dos riscos de contaminação por micotoxinas (Mesterházy et al., 2012).

Os métodos de melhoramento na cultura do milho buscam em um primeiro momento a exploração dos ganhos em caracteres primários como o rendimento de grãos, biomassa quando o objetivo é a produção de silagem e ainda capacidade de expansão para o caso do milho-pipoca. A resistência a doenças é entendida como um caráter secundário relacionado aos ganhos em produtividade, não havendo relatos de programas desenvolvidos com objetivo central em incorporação de resistência a doenças. No entanto, devido a necessidade de incorporação de resistência à podridão por *Fusarium* na cultura, é comum encontrar trabalhos com avaliação e seleção de genótipos com potencial de resistência a esse tipo de fungo.

Quanto à natureza genética, existe um consenso de que a resistência à podridão é um caráter poligênico com herança mista, com predominância acentuada de efeitos aditivos (Wen et al., 2021). Todavia, há ainda divergência nos trabalhos científicos acerca da quantidade aproximada de genes e da magnitude dos efeitos gênicos individuais envolvidos na resistência (Lanubile et al., 2017; Schwantes et al., 2017; Holland et al., 2020).

Embora a maior parte dos trabalhos apontarem a resistência a FER como um caráter poligênico altamente influenciado por fatores ambientais, relatos de valores de herdabilidade superiores a 0,60 tem sido comum em experimentos com repetições (Robertson et al., 2006; Ding et al., 2008; Butrón et al., 2019; Gaikpa et al., 2021; Almeida et al., 2021). Ainda de acordo com Löffler et al. (2010), as estimativas de herdabilidade podem ser aumentadas com adoção de inoculação e aumento do número de experimentos e ambientes de avaliação. Horne et al. (2016) demonstraram que estratégias de seleção recorrente foram eficazes para aumentar a herdabilidade e consequentemente os ganhos genéticos em resistência à podridão de espiga de forma progressiva a cada ciclo de seleção.

Devido ao potencial de obtenção de ganhos via exploração de desvios de dominância, e a prática já consolidada de desenvolvimento de híbridos para aumento de produtividade de grãos, a avaliação da resistência a FER é comum nas etapas de testes finais de híbridos (Zila et al., 2014; Lanubile et al., 2017; Schwantes et al., 2017; Almeida et al., 2021). Löffler et al. (2010) demonstraram também que o sucesso na obtenção de híbridos superiores depende da resistência acumulada nas linhagens parentais. Nesse sentido, estratégias de seleção para resistência durante as etapas de desenvolvimento de linhagens são apontadas como essenciais para potencializar os ganhos em resistência a FER nos híbridos a serem recomendados (Stagnati et al., 2020).

Em termos de melhorias na eficiência da avaliação e seleção, nos últimos anos, diversos trabalhos demonstraram a identificação de genes candidatos com maior efeito sobre a resistência a FER, identificação de QTL's (*quantitative trait loci*) e construção de modelos para seleção genômica, com resultados que apontam para a possibilidade de aumentar os ganhos em resistência genética por ciclo de cultivo (Holland et al., 2020; Liu et al., 2020; Kuki et al., 2020; Santiago et al., 2020; Yao et al., 2020; Ge et al., 2021a; Lanubile et al., 2021).

Quanto à existência de cultivares com resistência a FER no Brasil, Da Costa et al. (2010) identificaram 13 cultivares como resistentes, as quais apresentaram valores médios de grãos ardidos abaixo de 5%.

Grupos de pesquisa em milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e da Universidade Estadual de Maringá têm trabalhado em diferentes estratégias para ganhos em resistência à podridão de espiga nos últimos anos (Kurosawa et al., 2017; Schwantes et al., 2017; Gabriel et al., 2018; Almeida et al., 2021). Os estudos realizados até o momento apontam para possibilidade de ganhos de até 21% em redução de podridão de espiga com o desenvolvimento de híbridos a partir do cruzamento de linhagens endogâmicas pré-selecionadas para resistência (Schwantes et al., 2017; Almeida et al., 2021).

3.1.2.4. Melhoramento de milho-pipoca na UENF

Em 2018, a soma dos trabalhos de caracterização agrônômica e patológica até então realizados reuniam informação de não mais do que 20% das linhagens presentes no banco de germoplasma. A fim de estruturar a linha de pesquisa de

resistência a doenças e fornecer informações sobre o potencial de linhagens *per se*, no ano de 2018 deu-se início ao projeto de caracterização agrônômica e patológica de todas as linhagens do banco de germoplasma da UENF (dados os quais, parte é apresentada nesta tese).

O melhoramento de milho-pipoca na Uenf se iniciou com a chegada de uma população resultante de um composto indígena doado pela Universidade de Brasília (UNB), trazido pelo professor Joachim Friedrich Wilhelm Von Büllow no ano de 1993. Esse composto indígena denominado então UNB-1, havia sido doado à UNB pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ).

De posse na população UNB-1, a Uenf iniciou seu programa de melhoramento cruzando este composto com a variedade de polinização aberta SAM (*South America Mushroom*) na busca por agregar capacidade de expansão aos grãos. A primeira geração proveniente desse cruzamento foi então cruzada com outra variedade fonte de resistência a mancha foliar ocasionada por *Exserohilum turcicum*. A população foi então submetida a dois ciclos de seleção massal e em seguida, retrocruzada com a variedade SAM por mais três gerações, dando origem a nova população nomeadas UNB-2 (Guimarães, 2016).

A população UNB-2 foi submetida a dois novos ciclos de seleção massal, originando a população UNB-2U. Em 2001, Pereira e Amaral Júnior conduziram a aplicação do delineamento genético de Comstock e Robinson (Delineamento I) na população UNB-2U e inferiram sobre o potencial de exploração de efeitos gênicos aditivos para aumento nos ganhos em capacidade de expansão (Pereira e Amaral Júnior, 2001).

Desde essa primeira inferência o programa de melhoramento de milho-pipoca tem desenvolvido trabalhos de avanço de gerações, obtenção de linhagens e desenvolvimento de híbridos há 20 anos (Figura 1).

A partir deste estudo inicial, deu-se início com o programa de seleção recorrente intrapopulacional na população UNB-2U. Entre os anos de 2001 a 2012, foram realizados seis ciclos de seleção recorrente, a partir da avaliação de famílias de irmãos-completos ou famílias S_1 a cada ciclo (Daros et al., 2002; Daros et al., 2004; Vilela et al., 2005; Santos et al., 2007; Freitas Júnior et al., 2009; Rangel et al., 2011; Ribeiro et al., 2012). A população gerada do sexto ciclo possibilitou o registro da primeira cultivar de milho-pipoca da universidade, a cultivar UENF 14 (Amaral Júnior et al., 2013).

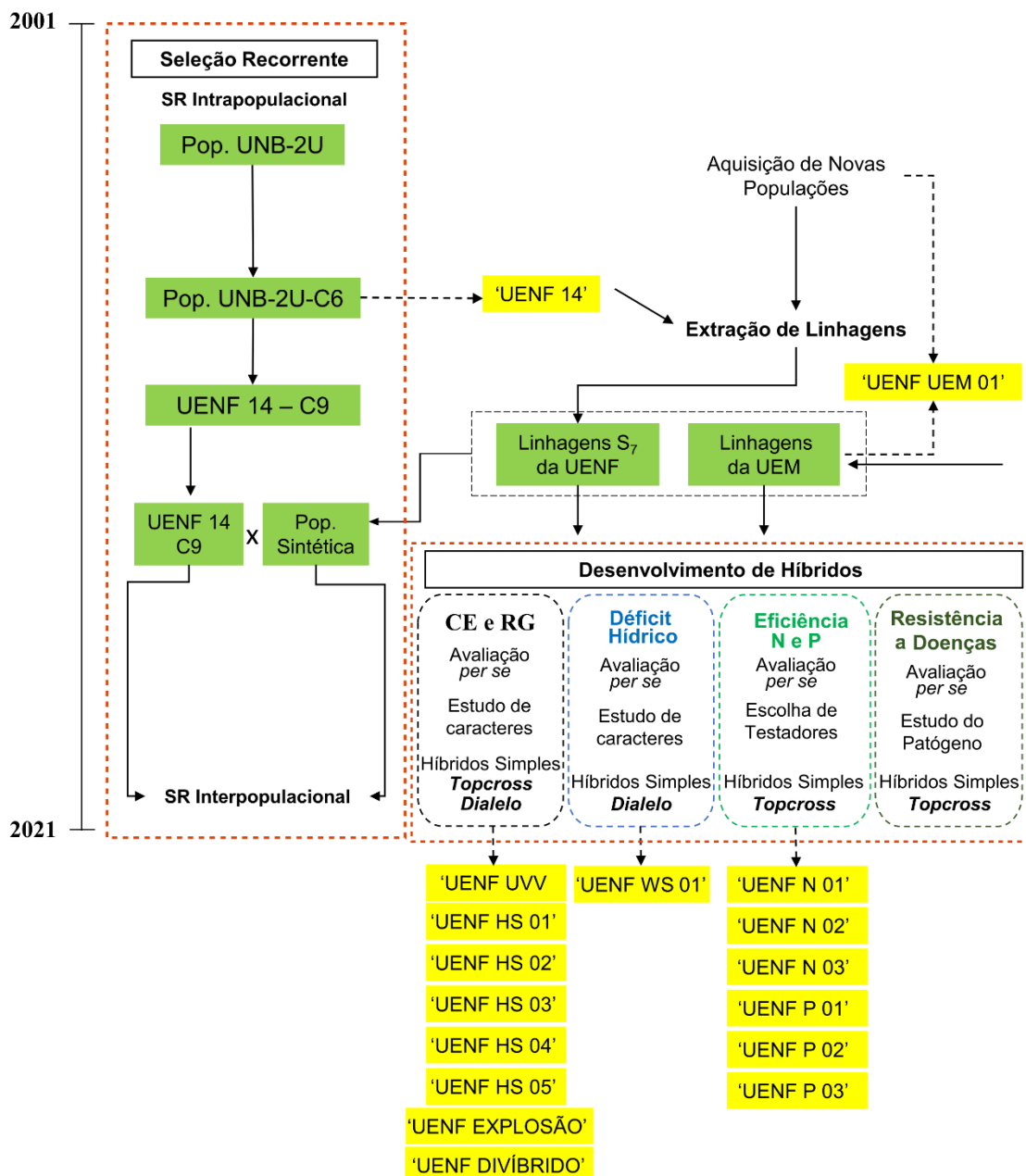


Figura 1. Organograma de desenvolvimento de cultivares do programa de melhoramento genético de milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro durante 20 anos: 2001 a 2021. Quadros amarelos representam as cultivares registradas pelo programa de melhoramento de milho-pipoca da UENF; quadros em verde representam o germoplasma utilizado na respectiva etapa.

Também durante este período, o grupo de melhoramento de milho-pipoca da UENF adquiriu novas variedades para o banco de germoplasma, variedades estas, provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil, e de países da América do Sul: Uruguai, Paraguai, Argentina, Bolívia e Chile. Essas aquisições foram

possíveis via intercâmbio de germoplasma, principalmente com a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e com o Cimmyt.

A partir de 2010, o programa iniciou o processo de extração de linhagens de milho-pipoca de todas as populações de polinização aberta presentes no banco de germoplasma. Em 2012, o programa recebeu 10 linhagens endogâmicas do banco de germoplasma da UEM, as quais foram cruzadas com germoplasma da UENF e possibilitaram gerar a cultivar UENF UEM 01 (Cabral et al., 2015).

Ao final do ano de 2017, o banco de germoplasma da UENF passou a conter então, 194 linhagens em estágio S₇, sendo essas linhagens extraídas de 25 populações de polinização aberta distintas.

Entre 2012 e 2017, foram realizados mais três ciclos de seleção recorrente intrapopulacional na população 'UENF 14' (Freitas et al., 2014; Amaral Júnior et al., 2016a; Mafra et al., 2019). No ano de 2015, iniciou-se o desenvolvimento de híbridos simples a partir de linhagens endogâmicas, o que possibilitou de 2017 a 2021, o registro de oito cultivares: 'UENF HS 01', 'UENF HS 02', 'UENF HS 03', 'UENF HS 04', 'UENF HS 05', 'UENF HS 06', 'UENF EXPLOSÃO', 'UENF DIVÍBRIDO'.

A partir dos anos de 2016 e 2017, para além da linha de melhoramento para capacidade de expansão (CE) e rendimento de grãos (RG), o programa de melhoramento abriu três novas linhas de desenvolvimento de cultivares a partir de linhagens já em S₇. Essas linhas foram: melhoramento visando adaptação para déficit hídrico (Kamphorst et al., 2018a; Kamphorst et al., 2018b; Kamphorst et al., 2019; Lima et al., 2019; Kamphorst et al., 2020); a linha de melhoramento visando a eficiência no uso de nitrogênio (Santos et al., 2017; Santos et al., 2019a; Khan et al., 2020; Santos et al., 2020) e eficiência no uso de fósforo (Gerhardt et al., 2019; Conceição Silva et al., 2019) e; a linha de melhoramento visando resistência a doenças fúngicas.

As pesquisas com déficit hídrico possibilitaram o registro das cultivares UENF WS 01 e UENF WS 02 no ano de 2021. As pesquisas com eficiência no uso de nitrogênio e fósforo possibilitaram o desenvolvimento das cultivares de híbrido simples 'UENF P 01', 'UENF P 02', 'UENF P 03', e 'UENF N 01', 'UENF N02' e 'UENF N 03'.

A linha de melhoramento visando resistência a doenças tem se dedicado a estudos com doenças fúngicas, sendo três diferentes doenças foliares: mancha de

Bipolaris maydis, mancha por *Exserorilum turcicum* e, ferrugem causada por *Puccinia polysora*; e uma doença de grãos: a podridão de espiga causada por *Fusarium verticillioides*.

Os trabalhos com *B. maydis*, *E. turcicum* e *P. polysora* envolveram a avaliação oportuna de variedades de polinização aberta e de linhagens em experimentos instalados a campo (Ribeiro et al., 2016; Kurosawa et al., 2016; Santos et al., 2017; Schwantes et al., 2017; Mafra et al., 2018; Schmitt et al., 2019; Kurosawa et al., 2021).

Os trabalhos com podridão de espiga por *F. verticillioides* foram realizados também de forma oportuna em experimentos conduzidos a campo (Kurosawa et al., 2017; Schwantes et al. 2017; Schwantes et al., 2018; Dutra, 2019; Almeida et al., 2021).

A linha de pesquisa com melhoramento visando resistência a doenças ainda não gerou nenhuma cultivar específica de modo que tem realizado investigações também em ambiente controlado para maior segurança na seleção de bons parentais para a geração de híbridos resistentes. Essas investigações estão sendo desenvolvidas a partir de ensaios com inoculação artificial.

3.1.2.5. Dispersão de doenças no campo e análises de correlação espacial: uso da função K de Ripley

O desenvolvimento de pesquisas com doenças de plantas a nível de campo exige constante esforço para controle de fatores ambientais que possam afetar a precisão dos resultados. Além das condições naturais (umidade, temperatura, vento, heterogeneidade do solo) e imprevistos recorrentes sob condições de campo, o estudo de epidemias exige controle sobre a uniformidade temporal e espacial no contágio e sobre a pressão de inóculo com que as plantas serão infectadas.

Sob condições de ambiente mais controlado, a exemplo de casas de vegetação, metodologias de inoculação têm sido bem estabelecidas e apresentado boa eficiência nos estudos de doenças em milho (Clements et al., 2003; Lanubile et al., 2017). Todavia, em experimentos sob condições de campo, principalmente naqueles com elevado número de plantas a serem avaliadas, há dificuldades para controle experimental e operacional de fatores como: i) infecções naturais

adicionais à concentração previamente inoculada, as quais podem ser desuniformes; ii) efeito adicional de outros patógenos que ocorrem naturalmente no campo; iii) dificuldade de homogeneidade temporal na inoculação devido ao desenvolvimento fenológico retardado ou precoce de diferentes grupos de plantas; iv) demanda de grandes quantidades de inóculo.

A respeito desses quatro fatores, é importante considerar que embora os fatores ii e iii não sejam dificuldades exclusivas de ensaios conduzidos à campo, espera-se haver maior grau de controle destes quando de ensaios em ambiente protegido. Dificuldades semelhantes para experimentos com *Fusarium* em milho, são relatados por Silva et al. (2007).

Na busca por obter precisão experimental que seja suficiente para a identificação de plantas pelo menos candidatas a resistência ou suscetibilidade a certas doenças, os pesquisadores têm optado pelo uso de algumas ferramentas estatísticas adicionais para monitoramento da dispersão espaço-temporal da doença no campo (Rizzo et al., 1998; Beale et al., 2002; Freitas et al., 2015; Lione e Gonthier, 2016; Zhang et al., 2019). As metodologias mais sofisticadas para estudo de distribuição de doenças em plantações envolvem etapas como georreferenciamento e processamento remoto de imagens. No entanto, considerando condições experimentais, onde a distância entre as unidades experimentais é preestabelecida, algumas ferramentas menos sofisticadas têm sido adotadas, dentre elas, a estimativa da função K de Ripley tem sido usada para estudos de dispersão de doenças em culturas como o tomate (Henne et al., 2012), dispersão de *Phytophthora megakarya* em cacao (Ndoungué Djeumekop et al., 2021), podridões em palmeiras (Balanagouda et al., 2021), e *Fusarium* spp. em banana (Heck et al., 2021).

A função K de Ripley foi originalmente elaborada para estudos de dispersão de pontos quaisquer, em planos bidimensionais ou tridimensionais, podendo esses pontos serem árvores em uma floresta, indivíduos em uma cidade ou galáxias no espaço (Ripley, 1977). A única premissa que a função exige para sua estimativa é de que a distância entre os pontos seja conhecida, aspecto este, de controle dos pesquisadores a partir de seus croquis de experimentos previamente delineados. Possivelmente, devido a esse aspecto prático, a função K tem sido amplamente utilizada e difundida em estudos florestais (Dos Anjos et al., 2004; Lan et al., 2009; Caprets et al., 2012; Ge et al., 2021b).

Em termos matemáticos, a função K averigua se existe um padrão espacial na localização de pontos ou se a dispersão dos mesmos é aleatória. Dentre outras classes metodológicas, a função pode utilizar o método do vizinho mais próximo para determinar qual seria o padrão esperado na ocorrência de pontos em um universo onde a distribuição seria uniforme, ou ainda por contagem de pontos por quadrantes. Essas duas classes de cálculos são as apontadas por Ripley (1977) como as mais apropriadas para trabalhos de campo.

A função parte do princípio que, havendo uma distribuição espacial aleatória entre os pontos, pontos aglomerados são “eventos raros” dentro do universo espacial, configurando assim a relação entre número de pontos próximos e o número de ocorrência desses eventos uma distribuição de Poisson. Em outras palavras, pela teoria probabilística dessa distribuição, havendo aleatoriedade na dispersão entre determinados pontos, a proximidade é menos provável à medida em que se aumenta o número de pontos a serem agrupados, ou seja, é mais provável que haja dois pontos próximos do que dez pontos próximos, por exemplo. Desse modo, a função k a hipótese nula de que: existe uma completa aleatoriedade entre os pontos, sendo que a distribuição probabilística se iguala a distribuição de Poisson (Ripley, 1981).

Em termos práticos, o cálculo considera diferentes faixas de distância (raio) e calcula o número de pontos para esta determinada faixa. O raio entre um ponto central e o limite para contagem dos pontos aumenta então gradativamente até o limite da área amostrada ou limite preestabelecido (Figura 2.A). Para o caso de parcelas retangulares, Diggle (1983) definiu que o limite de distância central para cada ponto (maior raio a partir de um ponto central) a ser utilizado para que não haja viés na análise deverá ser a metade da distância da área total.

Após a contagem de eventos no limite de raio de cada um dos pontos, a função K já com o efeito de correção para os pontos próximos à borda são computados (Ripley 1977). Para testar a hipótese nula, é então calculado um envelope de confiança que consiste em aplicar simulações pelo teste de Monte Carlo (Mooney, 1997) considerando o número de pontos amostrados e os intervalos de distância semelhantes ao estudo para identificação dos valores de K possíveis para que a distribuição dos eventos siga a distribuição de Poisson a uma significância de 5% ou 1% a depender do critério do pesquisador. O número de simulações para definição do envelope de confiança é a critério do pesquisador, no

entanto, tem sido recorrente o uso de 1000 simulações para maior robustez na geração desse intervalo de confiança.

Os valores estimados da função K são então transformados na função L(s) que facilita a construção de gráficos para melhor visualização do resultado. A função L(s) aplicada para transformação é:

$$\widehat{L}(s) = \sqrt{\frac{\widehat{K}(s)}{\pi - s}} \quad (1)$$

A estimativa de dispersão é feita em momentos distintos para diferentes raios de distância de pontos centrais, referente às observações de interesse (Figura 2-A). Por meio de simulações que consideram o número de observações investigadas, é então definido um envelope de confiança (similar ao conhecido intervalo de confiança) para os valores limite da função L(s) a considerar que a hipótese de distribuição aleatória das observações não seja rejeitada (Figura 2-B)

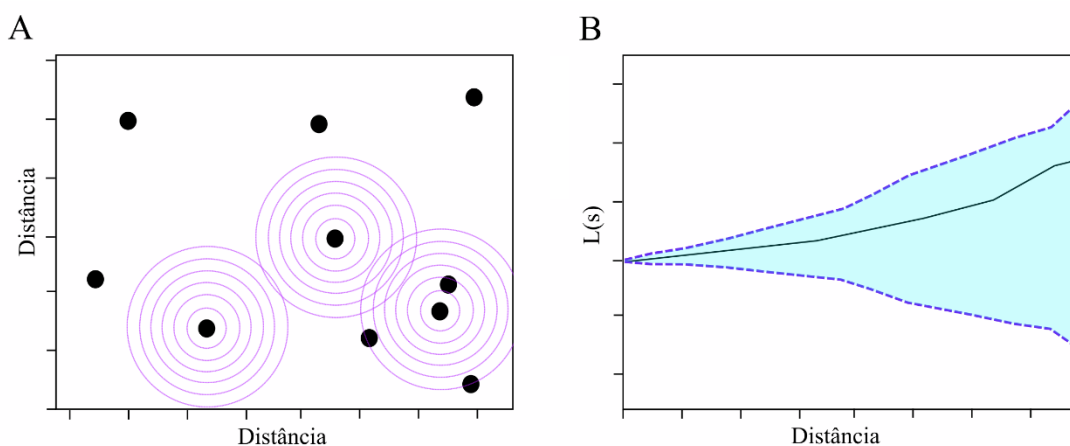


Figura 2. Ilustração do processo de contagem de pontos por intervalos de distância a partir de pontos centrais (A) e; resultado gráfico (B) para o teste de hipótese de distribuição espacial entre pontos a partir da transformação dos valores estimados pela função K de Ripley em valores de L(s), onde: a linha contínua representa os valores reais (observados) estimados para cada intervalo de distância e, as linhas pontilhadas delimitam o envelope de confiança (área em azul claro).

A partir da visualização do intervalo do envelope de confiança, a análise gráfica pode ser interpretada da seguinte forma: se a linha da função L(s) para os

valores observados se mantiver dentro do envelope de confiança, a distribuição dos pontos não segue um padrão de agrupamento ou uniformidade, ou seja, a hipótese nula não é rejeitada.

Embora ainda não usual na área de melhoramento de plantas, esse tipo de análise pode assim ser uma ferramenta auxiliar para investigação da ocorrência de doenças a campo e monitoramento do grau de precisão para seleção de genótipos resistentes ou suscetíveis. Ainda, poderá ser utilizado para monitoramento do grau de associação espacial de outros caracteres passíveis de avaliação nas etapas de seleção de plantas superiores.

É importante ressaltar que para esse tipo de estudo, há necessidade de maior cuidado na organização dos croquis experimentais para que eventuais erros de implantação e arranjo espacial dos ensaios não ocasionem imprecisão ou inviabilização das análises estatísticas referentes a esses ensaios.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Material Vegetal

Este estudo avaliou 176 linhagens endogâmicas de milho-pipoca do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF (Tabela 1).

A extração de linhagens S_7 se iniciou a partir de 2013. Nesta ocasião, plantas individuais de diferentes populações foram autofecundadas por cultivos sucessivos nas safras de inverno, até atingirem a geração S_7 de autofecundação. Nesta geração, é esperado que cerca de 99,61% dos loci estejam em homozigose, o que confere a essas plantas a característica de linhagem ou linha pura.

Ao final do processo de extração de linhagens, o programa de melhoramento de milho-pipoca da UENF obteve 192 linhagens de milho-pipoca de 21 populações diferentes, oriundas de seis países da América do Sul. Ao longo do estudo, 16 linhagens não apresentaram bom vigor germinativo ou ainda não produziram espigas suficientes para avaliação. Por conta disso, foi possível obter informações em 176 das 192 linhagens S_7 .

Tabela 1. Descrição das linhagens S₇ avaliadas no estudo e suas respectivas populações e países de coleta.

Linhagens ID	População	País	Informações Agronômicas das Populações *
L51 a L59	Beija-Flor	Brasil	UFV (1); UVF (2)
L61 a L71	Angela	Brasil	UFV (1); UVF (3)
L74 a L88	Viçosa	Brasil	UFV (1); UVF (2)
L201 a L230	IAC 125	Brasil	IAC (1)
L231 a L260	BOZM 260	Bolívia	Cimmyt (1); UEM (1)
L261 a L290	PARA 172	Paraguai	Cimmyt (2); UEM (1)
L291 a L320	URUG 298	Uruguai	Cimmyt (3); UEM (1)
L321 a L350	Barão de Viçosa	Brasil	UFV (3)
L351 a L380	PR 023	Brasil	UEM (1)
L381 a L410	SAM	Brasil	UEM (1)
L411 a L440	CHZM 13 134	Chile	Cimmyt (4)
L441 a L470	BOYA 462	Colômbia	Cimmyt (5); UEM (1)
L471 a L500	SE 013	Brasil	UEM (1)
L501 a L530	PA 170 ROXO	Paraguai	-
L531 a L560	ARZM 07 049	Argentina	Cimmyt (5); UEM (1)
L561 a L590	ARZM 05 083	Argentina	Cimmyt (7)
L591 a L620	RS 20	Brasil	UFV (1); UVF (2); UVF (3)
L621 a L650	PA 091	Brasil	UEM (1)
L651 a L680	ARZM 13 050	Argentina	Cimmyt (8); UEM (1)
L681 a L710	UENF 14	Brasil	UENF
P1	Híbrido Zélia	Brasil	UFV (1)
P2 e P3	Composto CMS-42	Brasil	UFV (4)
P4	SAM	Brasil	UEM (1)
P5, P6 e P7	Híbrido Zaeli	Brasil	UEM (2)
P8, P9 e P10	Híbrido IAC 112	Brasil	IAC (2); UFV (1); UVF (2);

* Links para informações sobre as populações: [UFV \(1\)](#); [UFV \(2\)](#); [UFV \(3\)](#); [UFV\(4\)](#); [IAC \(1\)](#); [IAC \(2\)](#); [Cimmyt\(1\)](#) ; [Cimmyt\(2\)](#) ; [Cimmyt\(3\)](#) ; [Cimmyt\(4\)](#) ; [Cimmyt\(5\)](#) ; [Cimmyt\(6\)](#) ; [Cimmyt\(7\)](#) ; [Cimmyt\(8\)](#); [UEM \(1\)](#); [UEM \(2\)](#); [UENF](#)

3.1.3.2. Ensaios de competição

A fim de avaliar a ocorrência de FER nas espigas, 11 ensaios de competição foram conduzidos em três diferentes safras, no campo experimental do Colégio Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes, região norte do estado do Rio de Janeiro (21° 42' 48" S e 41° 20' 38" O - 14 m de altitude). O primeiro conjunto de experimentos contendo as 176 linhagens de milho-pipoca se deu na safra de inverno do ano de 2019, durante os meses de maio a agosto. O segundo conjunto de ensaios com 85 linhagens foi conduzido durante a safra de verão 2019/2020. O terceiro conjunto de experimentos com 91 linhagens foi conduzido durante a safra de verão 2020/2021. Dessa forma, as 176 linhagens

foram avaliadas tanto em safra de inverno quanto em safras de verão. A distribuição das linhagens nos diferentes ensaios se deu de forma aleatória a partir de sorteio das parcelas.

As condições climáticas no campo experimental foram monitoradas pela estação meteorológica automática (Estação A607 – Campos dos Goytacazes) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada a uma distância máxima de 100 metros das áreas de instalação dos ensaios. Os dados meteorológicos foram coletados via endereço eletrônico do instituto (INMET, 2021).

O primeiro conjunto de experimentos foi tratado como ensaios de inverno e o segundo e terceiro conjuntos de experimentos somados, foram tratados como ensaios de verão. Nos ensaios de inverno, foram conduzidos cinco experimentos distintos, dispostos em áreas adjacentes. Nos ensaios de verão, foram conduzidos seis experimentos distintos (três na safra 2019/20 e três na safra 2020/21) também em áreas adjacentes.

A unidade experimental foi constituída de 16 plantas espaçadas a 0,2 metros e dispostas em fileira única de 3 metros de comprimento. O espaçamento entre fileiras foi de 0,9 metros. O espaçamento utilizado consistiu assim em uma densidade populacional de 55.555 plantas ha⁻¹.

Para cada experimento, independentemente do conjunto de ensaios, a disposição dos tratamentos se deu em blocos completos casualizados. Cada ensaio contou com um número z de tratamentos regulares (avaliados somente em um experimento dentro do conjunto) e três genótipos comuns (linhagens endogâmicas avaliadas em todos os experimentos do conjunto). Os tratamentos comuns foram alocados de forma aleatória dentro de cada experimento. Tais tratamentos comuns foram utilizados para captar a interação genótipo x experimento dentro de cada conjunto de ensaios e, posteriormente, possibilitar a comparação mais justa entre os 176 genótipos.

Na instalação dos ensaios, as áreas de plantio foram previamente preparadas com gradagem mecanizada, seguida pelo preparo de sulcos com 5 a 8 cm de profundidade. No momento do plantio, os sulcos receberam adubação com formulado N-P-K (04-14-08) em quantidade de 80 g metro linear⁻¹ (32 Kg de N, 112 Kg de P e 64 Kg de K por hectare). A semeadura foi realizada com a deposição e posterior cobertura de 2 sementes a cada 0,2 metros dentro da linha de plantio.

Todos os ensaios receberam irrigação em dias alternados, durante 1 a 2 horas. A irrigação utilizada foi do tipo aspersão, com utilização de aspersores capazes de cobrir um raio de 15 metros, os quais foram posicionados de forma que cada aspersor cobria uma área de interseção correspondente ao raio do aspersor adjacente.

Aos 20 dias após o plantio, o desbaste foi realizado a fim de garantir a permanência de uma única planta por cova, e conseqüentemente, 16 plantas na parcela. Na ocasião do desbaste, aplicou-se a primeira adubação de cobertura com deposição de 20 g de Ureia metro linear⁻¹ (75 a 80 Kg de N por hectare). Posteriormente, aos 40 dias após o plantio, a segunda porção da adubação de cobertura foi realizada com procedimento similar à primeira adubação de cobertura.

O controle de plantas espontâneas foi realizado por meio de capinas mecânicas. O controle de lagartas foi realizado via aplicação de agroquímicos próprios para a cultura. Os custos com a condução dos ensaios bem como o custo médio de fenotipagem para os ensaios conduzidos neste estudo, se encontram na Tabela 1A no Apêndice A.

A inoculação das espigas com *Fusarium* se deu por inoculação natural. Essa metodologia foi adotada devido às dificuldades em padronizar a aplicação do inóculo em um mesmo estágio fenológico dos tratamentos, dado que, o número de dias para o florescimento das diferentes linhagens, variou entre 48 e 75 dias nos diferentes ensaios. Além disso, a inoculação natural tornou-se possível dado que a área apresenta histórico de ocorrência do patógeno e é utilizada consecutivamente para plantio de milho comum e milho-pipoca, culturas hospedeiras de *Fusarium*.

Outro fator que favoreceu a ocorrência natural do patógeno foi a elevada incidência de chuvas, notadamente nas safras de verão, e ocorrência de temperaturas dentro da faixa ideal para desenvolvimento do fungo (23° C no inverno e 26° C no verão).

Ressalta-se ainda, que em nenhum momento foi aplicado nenhuma forma de controle de doenças fúngicas nos ensaios componentes deste estudo ou em ensaios de outros experimentos implantados em áreas próximas. Também, a fim de melhor visualizar a dispersão do patógeno na área experimental, foram construídos mapas espaciais da incidência de espigas com podridão, a partir do croqui experimental.

3.1.3.3. Avaliação da incidência e severidade de FER

As espigas foram colhidas aos 120 dias após o plantio, com umidade média entre 12% e 15% nos grãos. Cada unidade experimental foi colhida individualmente e identificada de acordo com sua respectiva linha de plantio.

A severidade de podridão nas espigas foi avaliada pela incidência de grãos com sintomas visíveis de ocorrência de *Fusarium* (estrias rosadas no grão). A avaliação foi conduzida de forma visual por um único avaliador, utilizando como parâmetro, uma adaptação à escala diagramática proposta pelo Cimmyt (1994). Na adaptação realizada, as notas de severidade média da espiga se deram considerando o intervalo de 0 a 100% de severidade com intervalos de 5% nas notas (Figura3).

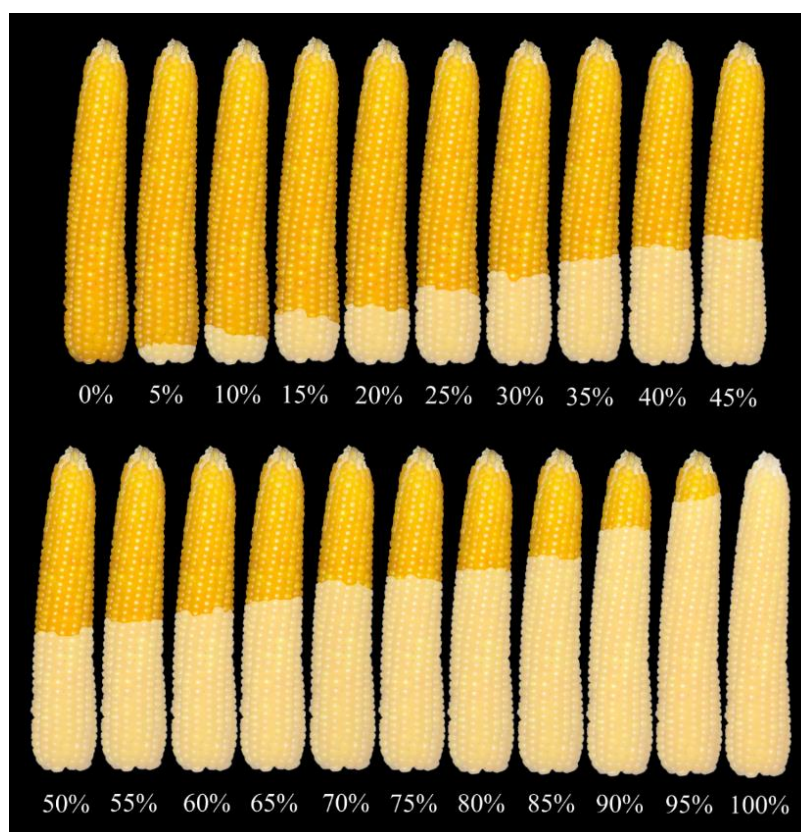


Figura 3. Ilustração da escala diagramática adaptada a qual foi utilizada na avaliação de podridão de espiga causada por *Fusarium verticillioides* em milho-pipoca (parte mais clara representa a porção com sintomas visíveis).

Todas as espigas de cada unidade experimental foram avaliadas. A incidência de espigas com FER foi estimada pela relação direta entre o número de espigas sintomáticas pelo total de espigas colhidas na parcela, sendo esta relação expressa em percentagem. Ao total, a severidade de podridão foi avaliada em 11.742 espigas ao longo das três safras. A fim de diminuir ainda mais a variação de critérios de notas atribuídas às espigas, além do uso da escala diagramática, todas as avaliações foram conduzidas por um único avaliador.

3.1.3.4. Análise Estatística

3.1.3.4.1. Significância das fontes de variação

Os dados de cada um dos experimentos nas respectivas safras foram inicialmente tabulados, tratados e submetidos aos testes de verificação dos pressupostos de normalidade de resíduos de Shapiro Wilk ($p > 0,05$) e homogeneidade de variâncias pelo teste de O'Neill & Mathews ($p > 0,05$). Atendidos os pressupostos, prosseguiu-se com análise de variância pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade, a fim de identificar a existência de variabilidade significativa entre os tratamentos.

De posse dos componentes de variância residual de cada experimento dentro de cada um dos conjuntos de ensaios (inverno e verão), uma análise de grupos de experimentos desbalanceados foi conduzida, seguindo a metodologia proposta por Gomes et al. (1958) para análise conjunta de experimentos em blocos completos casualizados, e adaptada por Gomes (1970). O quadro de composição das fontes de variação bem como as estimativas dos componentes das esperanças do quadrado médio é apresentado na Tabela 2.

Observado a existência de diferenças significativas para a fonte de variação experimentos dentro de cada conjunto de ensaios, foi calculado o efeito médio de experimento a partir da média dos tratamentos testemunhas, e conseqüentemente foi gerado o fator de correção para os efeitos de experimento dentro de safras.

Tabela 2. Quadro geral de análise de variância para análise de grupos de experimentos em blocos completos casualizados com tratamentos comuns, conforme proposto por Gomes e Guimarães (1970).

FV	GL	SQ	EQM
Bloco / E	$\sum r_i - e$	Método usual	$\sigma^2 + cz\sigma_b^2$
Experimentos (E)	$e - 1$	Método usual	$\sigma^2 + cz\sigma_b^2 + rc\Phi_e^2$
Tratamentos comuns x E	$(c - 1)(e - 1)$	Método usual	$\sigma^2 + rz\Phi_{ce}^2$
Tratamentos (ajustados)	$\sum z_i + c - 1$	Por diferença	$\sigma^2 + re\Phi_{cz}^2$
Resíduo	Por diferença	$\sum SQR_i$	σ^2
Total	$\sum r_i(z_i + c) - 1$	Método usual	

FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; EQM = esperança do quadrado médio; e é o número de experimentos; r_i o número de blocos (repetições) do i -ésimo experimento; c é o número de tratamentos comuns; e z_i é o número de tratamentos regulares no i -ésimo experimento. SQR_i é a soma que quadrados do resíduo da análise individual do i -ésimo experimento

A estimativa do fator de correção (FC) foi obtida pela expressão:

$$FC = \overline{Xc_i} - \overline{Xc} \quad (2)$$

Onde:

Xc_i é a média geral dos tratamentos comuns no i -ésimo experimento; e Xc é a média geral dos tratamentos comuns em todos os experimentos analisados no conjunto.

Obtidos os fatores de correção, os valores observados para os tratamentos regulares em cada um dos experimentos foram então corrigidos, sendo calculados pela expressão:

$$Vc = Vo + FC \quad (3)$$

Onde:

Vc é o valor corrigido; Vo o valor inicialmente observado; e FC o fator de correção estimado.

De posse dos valores corrigidos para os tratamentos regulares e da média entre as respectivas repetições dos diferentes experimentos para cada tratamento comum, os dados de cada um dos conjuntos de ensaios (inverno e verão) foram

considerados como um único experimento com arranjo experimental em blocos casualizados com 176 tratamentos e 3 repetições.

Em seguida, prosseguiu-se à análise de variância individual e conjunta entre as diferentes safras (inverno e verão) a fim de verificar a significância dos efeitos de genótipo e da interação genótipo x safra quanto a resposta a podridão de espiga ocasionada por *Fusarium*. A análise conjunta foi possível devido a existência de homogeneidade de variâncias residuais entre as safras, valores estes testados pelo teste Hartley a 5% de probabilidade.

3.1.3.4.2. Seleção de linhagens com potencial de resistência a FER

As linhagens que obtiveram médias de severidade de FER abaixo dos pontos de truncamento pré-definidos em ambas as safras foram selecionadas como fonte de resistência. A definição do valor inicial para estimativa do ponto de truncamento (valor que determina o limite superior de severidade da doença nas linhagens a serem selecionadas) é descrita a seguir.

O valor máximo de grãos mofados (classe que inclui os grãos contaminados por fungos) aceito para comercialização no Brasil é de 5%, para os grãos classificados como tipo 3 (Anvisa, 2011). Assim sendo, entende-se que este valor pode ser considerado como limite máximo de tolerância para grãos infectados por *Fusarium* em híbridos comerciais a serem produzidos a partir do cruzamento de linhagens de milho-pipoca. Além disso, foi considerado os possíveis ganhos em resistência a serem obtidos com o desenvolvimento de híbridos, evento esperado devido à significância dos efeitos de desvio de dominância para este caráter.

Até o presente momento, dois trabalhos avaliaram o potencial de linhagens de milho-pipoca para podridão a FER em cruzamentos híbridos; no trabalho de Schwantes et al (2017) o valor mínimo de capacidade específica de combinação (sendo os valores menores os mais desejados para os caracteres de ocorrência de doenças) obtido foi de -5,82% na severidade de FER, enquanto que, Almeida et al. (2021) obtiveram valores de capacidade específica de até -20,73% nos híbridos.

Partindo destes trabalhos, considerou-se para base de cálculo do ponto de truncamento o valor de 25,73%, referente ao somatório entre o máximo aceito na legislação e o valor máximo de redução da doença alcançado nos trabalhos existentes até o momento. Considerando este valor como média de referência,

calculou-se então o intervalo de confiança a 95% de probabilidade ($\alpha = 0,05$) para cada uma das safras, sendo os desvios considerados a partir dos resíduos finais obtidos na análise de variância conjunta das safras (após correção dos valores).

A estimativa do intervalo de confiança para cada safra foi obtida pela fórmula:

$$\mu \leq \bar{X} + t_{\alpha} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

Onde:

μ é a média populacional verdadeira ou valor de referência populacional; \bar{X} é o valor da média amostral, aqui considerada como o valor do ponto de truncamento preestabelecido (25,73); t_{α} é o valor preestabelecido na distribuição t de Student para o valor de probabilidade α e n-1 observações; s é o desvio padrão amostral; e n é o número de observações realizadas em cada safra.

A partir da forma de estimativa supracitada, estabeleceu-se então o ponto de truncamento de 26,77% para a safra de inverno e 26,84% para a safra de verão. Obedecido o intervalo de confiança calculado, esses valores assim não se diferem do valor do ponto de truncamento preestabelecido.

3.1.3.4.3. Inferência sobre correlações espaciais na ocorrência da doença

Uma vez que a inoculação do patógeno se deu de forma natural, tomou-se o cuidado de investigar a correlação espacial na incidência da doença. A presença de correlações espaciais ou pontos com agregados de parcelas de maior ou menor ocorrência da doença poderia causar uma seleção enviesada. A possibilidade de viés na seleção poderia se dar tanto pelo escape de parcelas (não contato com inóculo) ou ainda pela pressão de inóculo com elevada desigualdade entre as parcelas, o que configuraria também uma heterogeneidade dos efeitos residuais no experimento.

A partir dos valores de incidência de FER na parcela e do croqui experimental, foram construídos mapas de incidência da doença. O objetivo desses mapas foi identificar visualmente a existência de padrões ou agrupamento de parcelas em relação a incidência de doenças. Além dos mapas, após a seleção das linhagens de interesse para exploração de resistência a FER, a correlação espacial

entre as parcelas das linhagens selecionadas foi testada pela estimativa da função K de Ripley. A dimensão utilizada para a contagem de pontos correspondeu à metade da distância de cada área analisada e o envelope de confiança foi obtido a partir de 1000 simulações pelo método de Monte Carlo.

3.1.3.4.4. Ferramentas e procedimentos para execução das análises

Todos os testes estatísticos bem como os gráficos de dispersão e frequência foram conduzidos com auxílio programa R, a partir das funções existentes no pacote base e também no pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2021). Para a análise de grupos de experimentos com número de tratamentos desbalanceados, conforme proposto por Gomes (1970) não foram encontrados pacotes ou funções contendo a programação para esse tipo de análise. Devido a isso, toda a análise de variância foi programada (construção de *script*) a partir de funções básicas existentes também dos pacotes supracitados do programa R. O *script* com as linhas de comando da referida programação é descrito no Apêndice B.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os mapas da incidência de espigas com podridão mostraram a dispersão espacial da doença nos diferentes ensaios (Figura 4). A análise visual dessa dispersão mostrou que embora a infecção das plantas pelo patógeno tenha se dado de forma não controlada, a doença ocorreu em todos os ensaios sem possibilidade de identificação de setores com predominância de parcelas pouco incididas. Em todos os ensaios, a maior parte das parcelas apresentou valores de incidência de espigas com FER acima de 70%.

Essa elevada incidência do patógeno reflete a pressão de inóculo na área de estudo, fator este que possibilitou maior segurança na comparação dos genótipos quanto ao potencial de resistência.

Estudos têm demonstrado que a avaliação de severidade a doenças mediante infecção natural tem sido suficiente para discriminar genótipos naquelas

ocasiões em que há elevada pressão de inóculo nas áreas de cultivo (Silva et al., 2007; Almeida et al., 2021).

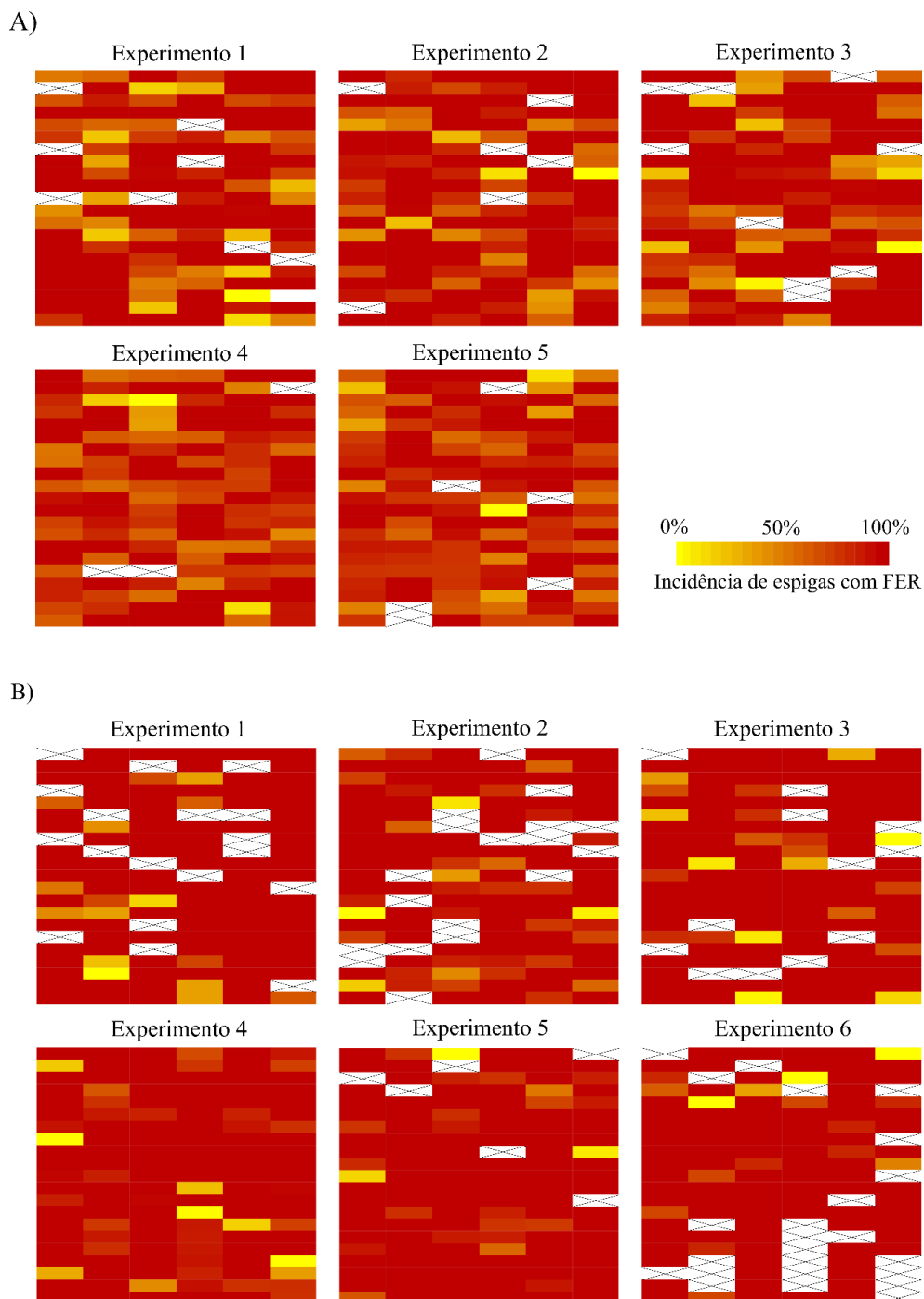


Figura 4. Mapa de ocorrência de podridão de espiga ocasionada por *Fusarium* nas parcelas (cada um dos retângulos dentro de cada ensaio; retângulos com linhas cruzadas na diagonal, representam parcelas perdidas), de cada ensaio de competição das safras de inverno 2019 (A) e verão de 2019/20 (B – Experimentos 1 a 3) e verão 2020/2021 (B – Experimentos 4 a 6) em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

Em etapas iniciais, os programas de melhoramento demandam avaliação de grande número de genótipos e ambientes. A demanda de elevada quantidade de solução para inóculo e a maior discrepância nos estágios fenológicos dos diferentes genótipos, dificultam a prática de inoculação artificial nessas etapas (Silva et al., 2007). Nesses casos, a existência de áreas com elevada pressão de inóculo do patógeno alvo do estudo, contribui para maior eficiência da seleção nessas primeiras etapas. Além disso, a inoculação a nível de campo não representa uma garantia de equilíbrio na pressão de inóculo sobre cada genótipo se a doença ocorrer naturalmente com distribuição desuniforme na área.

Todavia, é válido ressaltar que o objetivo central da análise espacial utilizada neste estudo não teve por objetivo defender a não necessidade de inoculação artificial em estudos de resistência a nível de campo, dado que a eficiência seletiva é comprovadamente maior quando sob inoculação artificial (Löffler et al., 2010). A adoção dos mapas de incidência da doença no espaço se deu com objetivo único de verificar se as condições experimentais possibilitariam descartar genótipos suscetíveis a podridão de espiga com uma margem menor de erro suficientemente confiável.

Em termos de intensidade de doença, tanto a incidência quanto a severidade foram maiores na safra de verão (Figura 5). Nas safras de inverno, houve maior frequência de parcelas com severidade abaixo de 50%, enquanto que no verão as maiores frequências de severidade de FER foi para os valores acima de 50%. Esse diferencial de frequências resultou em uma média de severidade duas vezes maior nas safras de verão.

Essa diferença nas médias gerais e frequências para incidência e severidade do patógeno podem ser decorrentes das condições climáticas em cada uma destas safras e conseqüentemente pela pressão diferencial de inóculo (quantidade de esporos) disponíveis em cada momento.

Durante as safras de verão, houve precipitação superior em no mínimo 434 mm de chuva quando comparado a safra de inverno. A temperatura diária média foi no mínimo 2,5°C menor. Em relação a umidade relativa do ar e velocidade do vento, não houveram diferenças discrepantes entre as safras (Figura 6). A faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento de *Fusarium* é de 17 °C a 27 °C, com valores ótimos de umidade relativa acima de 80% (Rossi et al., 2009).

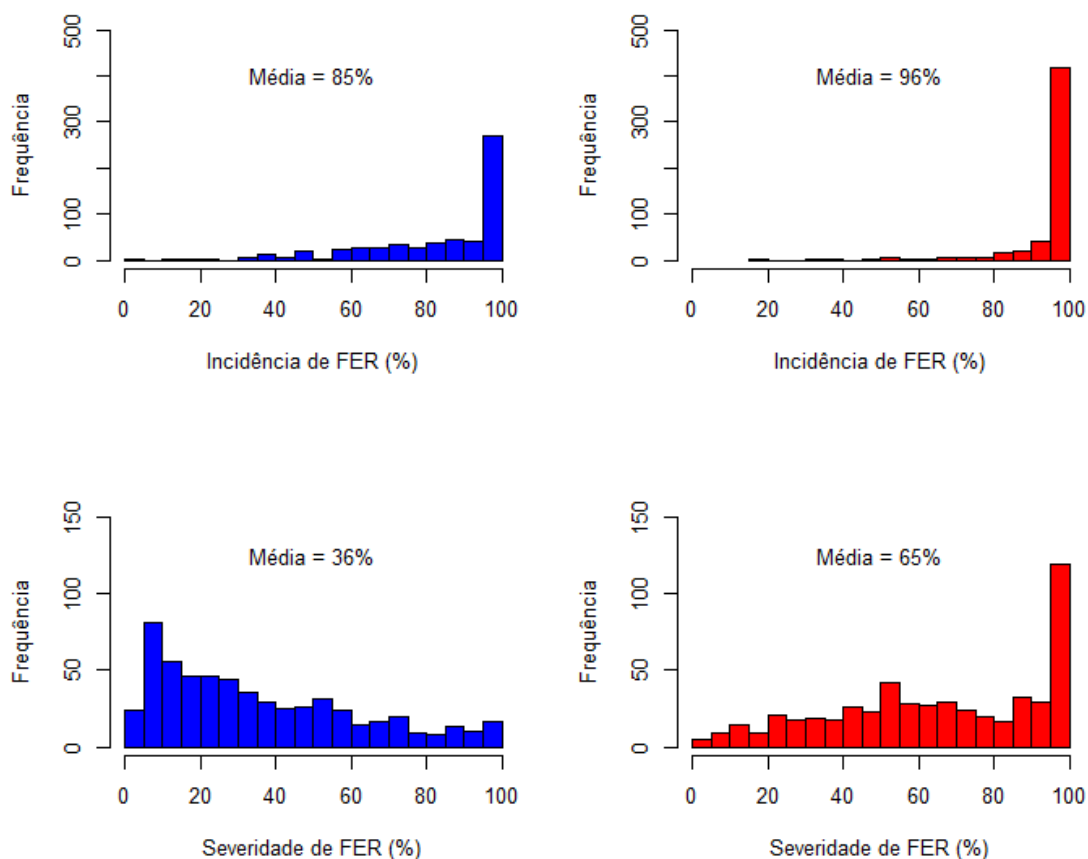


Figura 5. Histograma de notas (percentagem de doença) para incidência e severidade de podridão em espigas incididas por *Fusarium* (FER), durante as safras de inverno 2019 (barras em azul) e de verão 2019/20 e 2020/21 (barras em vermelho) em Campos dos Goytacazes, RJ.

A umidade relativa se manteve elevada contribuindo para o desenvolvimento do patógeno, sendo válido também registrar que os ensaios receberam irrigação em intervalos de no máximo dois dias o que contribuiu para manutenção da umidade a nível de microambiente.

Todavia, o maior volume de chuvas no verão pode ter favorecido o desenvolvimento do patógeno. Isso porque, ainda que as plantas tenham sido irrigadas periodicamente, a taxa de perda de água para atmosfera em períodos ensolarados é muito maior que em períodos chuvosos mais extensos, por isso as diferenças devido à precipitação devem ser consideradas.

A Figura 6-A demonstra claramente que ao longo dos ensaios de inverno, houve um período de estiagem entre os meses de junho e agosto.

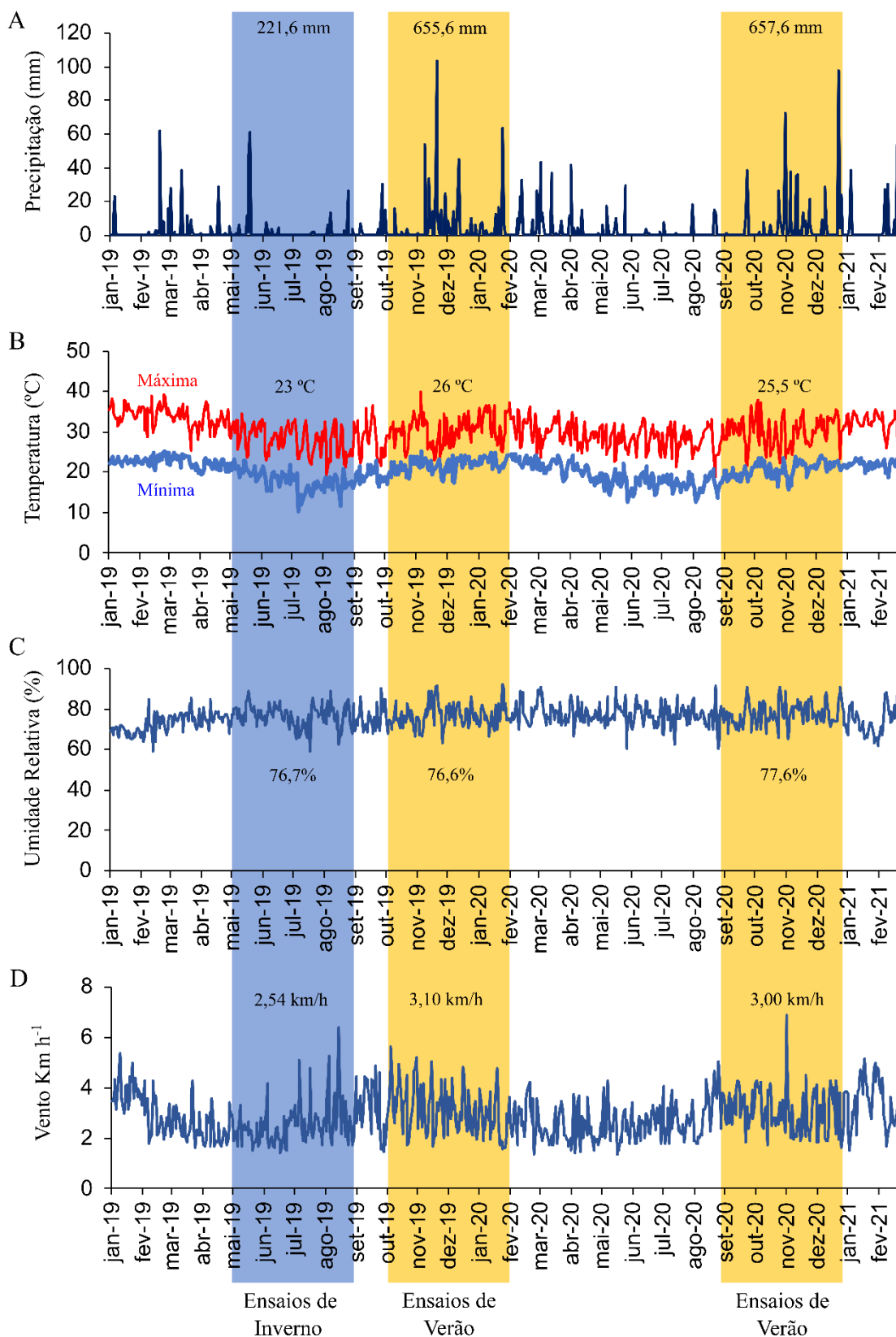


Figura 6. Condições climáticas em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, no período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2021. Dados do INMET (2021).

Este período refere-se às fases entre 30 a 90 dias após emergência das plântulas, que engloba todos os estádios reprodutivos das plantas, fase essa, onde se dá a infecção dos grãos por *Fusarium* (Duncan e Howard, 2010).

De forma contrária, nos ensaios de verão, houve maior frequência de chuvas a partir dos 30 dias de plantio. Assim, a elevada frequência de chuvas do estágio V6 até a colheita, associado às temperaturas mais elevadas (Figura 6.B) podem ter contribuído para o desenvolvimento do patógeno, resultando em maior média geral de severidade ao longo do experimento.

Esses dados demonstram assim, que para as condições de Campos dos Goytacazes, estudos para resistência a FER sob infecção natural do patógeno devem ser realizados preferencialmente nos períodos mais quentes e chuvosos. Isso porque, no inverno, os períodos mais extensos de estiagem podem contribuir para menor taxa de infecção dos grãos nas espigas, mesmo em genótipos suscetíveis. Ao que os resultados deste estudo dão parecer, a distribuição nas frequências das notas de severidade (SFER) é mais intensamente afetada pelas condições climáticas em cada safra em comparação com a IFER.

Ainda que havendo condições mais favoráveis ao progresso da doença nos grãos durante as safras de verão, também nas safras de inverno houve significância nos efeitos de genótipo (Tabela 3).

Essas diferenças evidenciam a superioridade dos efeitos genotípicos sobre os efeitos residuais como consequência não somente do adequado controle experimental, expresso até mesmo na não significância dos efeitos de blocos, mas também, pela elevada variabilidade genética no germoplasma avaliado.

Os maiores valores de C.V. foram obtidos na safra de inverno, o que reflete a maior variação média entre as repetições neste período. Essa desuniformidade pode ser resultante da possível menor pressão de inóculo na área durante o inverno, conforme discutido anteriormente.

Quanto a significância dos efeitos genotípicos, dado que a existência de variabilidade é fundamental para seleção de genótipos superiores, é desejável que sejam significativos em experimentos dessa natureza. Essa elevada variabilidade genética no germoplasma já era um resultado esperado, devido a riqueza na origem geográfica das linhagens estudadas (Tabela 1). Dado isso, o estudo evidenciou a possibilidade de seleção para resistência a FER dentre germoplasmas provenientes da América do Sul. Essa informação é relevante para os programas

de melhoramento que possuem esse tipo de germoplasma em sua base genética, e ainda para aqueles programas que desejam introduzir germoplasma em sua base genética, na busca por explorar alelos de resistência a FER.

Tabela 3. Análise de variância individual para os diferentes ensaios de competição entre linhagens S₇ de milho-pipoca nas safras de inverno e verão em Campos dos Goytacazes, RJ.

ENSAIOS DE INVERNO						
IFER						
Experimentos						
F. V.	1	2	3	4	5	
Bloco	59,1	66,6	17,6	308,1	3,94	
Genótipo	1100,1**	991,3**	698,3**	1063,1**	800,1**	
Resíduo	59,2	104,2	78,86	104,8	73,32	
C.V. (%)	8,97	11,71	10,04	12,59	10,21	
SFER						
Experimentos						
F. V.	1	2	3	4	5	
Bloco	142,7	196,8	104,1	407,7	290,1	
Genótipo	1084,3 **	2442,6 **	1438,7 **	1524,0 **	1550,9 **	
Resíduo	150,1	145,9	198,1	144,2	107,4	
C.V. (%)	40,13	31,70	33,90	32,10	31,11	
ENSAIOS DE VERÃO						
IFER						
Experimentos						
Safr 2019/20			Safr 2020/21			
F. V.	1	2	3	4	5	6
Bloco	12,54	32,1	6,89	10,8	10,3	9,93
Genótipo	1030,6**	18,9*	345,9**	557,5**	424,4**	437,6**
Resíduo	20,5	10,0	36,53	23,9	16,5	12,4
C.V. (%)	4,94	3,20	6,34	5,30	4,24	3,68
SFER						
Experimentos						
Safr 2019/20			Safr 2020/21			
F. V.	1	2	3	4	5	6
Bloco	83,2	117,2	445,1	47,7	248,1	57,6
Genótipo	2540,5**	1789,6**	1474,1**	2427,8**	2031,7**	2381,7**
Resíduo	109,15	182,2	257,18	159,1	182,4	99,0
C.V. (%)	17,8	21,15	23,73	23,53	20,15	14,8

^{ns}; *, ** não significativo e significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. Graus de liberdade (GL) da fonte de variação (FV) genótipo (t): 38, 35, 35, 37 e 38 para os cinco ensaios de competição da safra de inverno, respectivamente, e; 34, 28, 35, 26, 38 e 24, para os seis ensaios da safra de verão, respectivamente. O GL para fonte Bloco (r) é 2 para todos os ensaios. O GL para o resíduo pode ser obtido pela expressão (r-1).(t-1) em cada ensaio.

Quando analisados os ensaios de forma conjunta, observou-se a significância dos efeitos de ensaio em ambas as safras (Tabela 4).

A significância na fonte de variação ensaio evidenciou assim a importância na escolha do delineamento experimental para a precisão das avaliações. Se considerado, por exemplo, avaliar todas as linhagens em um experimento único, os efeitos ambientais aqui detectados pela fonte de variação Ensaio (E) poderiam inflacionar os efeitos residuais, dado as dimensões da área experimental demandada.

Tabela 4. Análise de variância para ensaios de competição entre linhagens S₇ de milho-pipoca, considerando modelo de análise em grupos de experimentos desbalanceados em blocos ao acaso com tratamentos comuns, nas safras de inverno (2019) e verão (2019/10 e 2020/21), em Campos dos Goytacazes, RJ.

F. V.	Inverno			Verão		
	GL	IFER _{QM}	SFER _{QM}	GL	IFER _{QM}	SFER _{QM}
Ensaio (E)	4	880,6 **	2090,7 **	5	591,1 **	2924,5 **
Bloco/E	10	91,1	228,2	12	13,7	166,5
Genótipo _{Ajust.}	175	957,1 **	1802,2 **	175	479,7 **	2187,1 **
Testemunha x E	8	397,9 **	542,8 **	10	485,0 **	281,6 **
Resíduo	366	83,72	148,4	370	20,5	168,9
Média	-	85,26	36,05	-	94,55	63,26
C.V. (%)	-	10,73	33,79	-	4,77	20,55

ns ** não significativo e significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Embora não haja dificuldades na instalação desse tipo de delineamento, identificou-se que há limitações em termos de ferramentas computacionais para análise de variância em grupos de experimentos para as situações de desbalanceamento. Nesse sentido, espera-se que os *scripts* construídos para essas análises, fiquem disponíveis à comunidade científica em geral e possa assim facilitar as análises a partir da adoção desse tipo de delineamento, principalmente nas etapas iniciais dos programas de melhoramento.

A significância das diferenças entre ensaios também evidenciou que as testemunhas utilizadas foram suficientes em captar os efeitos ambientais e conseqüentemente, estimar os efeitos médios de cada ensaio. A partir desses

efeitos, os valores de cada parcela foram ajustados possibilitando a análise conjunta dos ensaios dentro de cada safra considerando o modelo em blocos casualizados (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância individual para ensaios de competição entre linhagens S₇ de milho-pipoca, considerando modelo de blocos ao acaso, nas safras de inverno (2019) e verão (2019/10 e 2020/21), em Campos dos Goytacazes, RJ.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM			
		Inverno		Verão	
		IFER	SFER	IFER	SFER
BLOCOS	2	44,52	175,52	32,03	21,54
LINHAGEM	175	872,21 **	1917,39 **	427,73 **	2170,27 **
RESÍDUO	350	88,25	147,81	19,10	168,91
MÉDIA	-	86,43	36,68	96,25	64,79
CV (%)	-	10,59	33,15	4,54	20,06

ns; ** não significativo e significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Ainda que tenha havido redução de 16 unidades no grau de liberdade do resíduo (GL) a partir da adoção do modelo em blocos casualizados, os componentes de variância residual apresentaram decréscimo, reflexo também na leve redução dos valores de CV. Isso demonstra que a correção dos efeitos de ensaio captados pelas linhagens testemunha foram suficientes para melhorar a precisão da análise.

A partir do balanceamento no número de tratamentos entre as safras, proporcionados pelo ajuste dos efeitos de ensaio dentro de cada safra, foi possível conduzir análise conjunta das safras (Tabela 6).

A resposta das linhagens à podridão de espiga, tanto em termo de incidência quanto de severidade foram diferentes entre as linhagens e também entre as épocas. A interação genótipo e safra significativa revelou que a resposta das linhagens é modificada em função da safra, a ponto de modificar o ranking dos genótipos quanto à IFER e SFER. Essa interação é um fator dificultador para a seleção de genótipos superiores.

Tabela 6. Análise de variância conjunta para ensaios de competição entre linhagens S₇ de milho-pipoca, considerando modelo de blocos ao acaso em duas diferentes safras (inverno e verão), em Campos dos Goytacazes, RJ.

	GL	QM	
		IFER	SFER
Bloco/S	4	38,27	98,52
Safra (S)	1	23611,08 **	214154,39**
Genótipo (G)	175	816,99 **	2280,63 **
G x S	175	281,22 **	893,72 **
Resíduo	700	50,67	158,36
Média		91,22	50,86
CV (%)		7,80	24,74

ns; ** não significativo e significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Embora já discutido sobre a provável maior pressão de inóculo nas safras de verão e conseqüentemente maior nível de confiança para seleção de genótipos suscetíveis, optou-se por utilizar os dados de severidade das duas safras para seleção. Isso porque, assumiu-se como verdadeira a hipótese de que, ainda que tenha havido interação genótipo ambiente na avaliação geral do painel de linhagens, aquelas que possuem resistência genética a FER serão classificadas no grupo de menor severidade da doença, em ambas as épocas.

Em relação a utilização apenas dos dados de severidade para a seleção, se deu pelo entendimento de que, não sendo esperado a existência de plantas imunes, dado o caráter quantitativo da resistência a FER, a resistência se expressa pela capacidade do genótipo em atrasar o progresso da doença. Assim, a característica que possibilitou inferir sobre a taxa de progresso da doença nas espigas, foi a severidade (Figura 7).

A seleção das linhagens com potencial de produção de híbridos com níveis satisfatórios de resistência a FER foram feitas com base nos pontos de truncamento específicos para cada safra, conforme descrito na metodologia. Nas safras de verão, 21 linhagens apresentaram médias abaixo do ponto de truncamento (pontos em cor laranja e vermelho). Na safra de inverno, 71 linhagens apresentaram médias igual ou inferiores ao ponto de truncamento (pontos em cor laranja e azul).

Dentre as 176 linhagens avaliadas, apenas 18 (10,2%) apresentaram severidade de FER abaixo do ponto de truncamento para as duas safras (pontos em cor laranja).

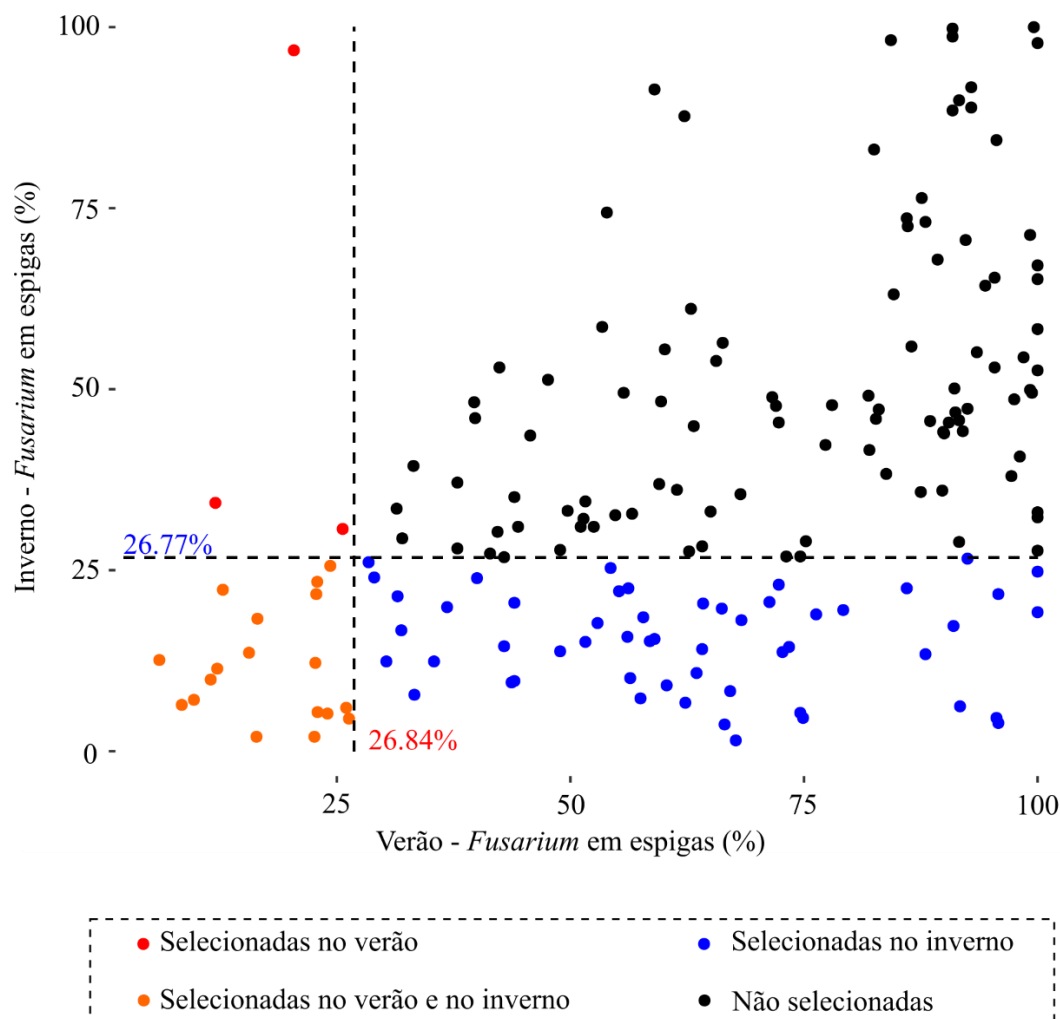


Figura 7. Dispersão de linhagens endogâmicas de milho-pipoca quanto à severidade de podridão de espiga em função das safras de avaliação. Pontos vermelhos indicam as linhagens selecionadas como possíveis fontes de resistência no verão. Pontos azuis indicam as linhagens selecionadas como possíveis fontes de resistência no inverno. Pontos em laranja indicam linhagens selecionadas como possíveis fontes de resistência tanto na safra de verão quanto na safra de inverno. Pontos em preto indicam linhagens não-selecionadas como fontes de resistência em nenhuma das safras.

As linhagens P2, P8 e L232 apresentaram valores abaixo do ponto de truncamento para o verão, porém apresentaram valores superiores em severidade no inverno. Esse resultado se opõe à resposta média das linhagens, uma vez que, no geral, a tendência foi de aumento na severidade de podridão de espiga nas safras de verão. Além de exemplificar a interação genótipo x ambiente complexa

entre safras, essas linhagens poderão ser alvo de estudos fisiológicos sobre fatores ambientais capazes de quebrar o potencial de resistência a podridão em genótipos de milho.

A partir do croqui experimental em cada safra, foram considerados os pontos de localização das parcelas correspondentes a cada uma das 18 linhagens previamente selecionadas com base na menor severidade da doença. A análise de dispersão dessas parcelas mostrou que no geral, a distribuição das parcelas com genótipos resistentes se deu de forma aleatória (Figura 8).

Todavia, para a safra de inverno, embora para as classes de distância no geral tenha havido um padrão de dispersão aleatório, a análise apontou que se considerado um raio de distância de 5 metros a 8 metros, o padrão de dispersão espacial de parcelas com baixa incidência pôde ser considerada como agrupada (Figura 8-B). Esse resultado indica que a presença de uma parcela resistente pode ter funcionado com barreira de proteção para infecção de parcelas vizinhas. Esse efeito possivelmente foi viabilizado pela provável menor pressão de inóculo durante o período de inverno.

Apesar dessa consideração a um raio de até 8 metros nos ensaios de inverno, para a distância média geral de todos os ensaios, o padrão de dispersão das parcelas de baixa severidade pode ser considerado aleatório.

Esse resultado reafirma a suficiência das condições ambientais neste estudo, para que seja conduzida uma seleção prévia para resistência a podridão de espiga por *Fusarium*, o que não isenta a necessidade de estudos de confirmação dessa possível resistência em ambientes mais controlados.

Quanto aos aspectos morfológicos, dentre as linhagens selecionadas, duas apresentaram grãos no formato arroz (pontagudo) ou intermediário e 16 apresentaram formato pérola, conforme já descrito também por Vasconcelos (2021).

O formato de grão pérola com pericarpo amarelo-alaranjado é o mais comumente encontrado no mercado, sendo este o ideótipo almejado no primeiro momento para comercialização de grãos.

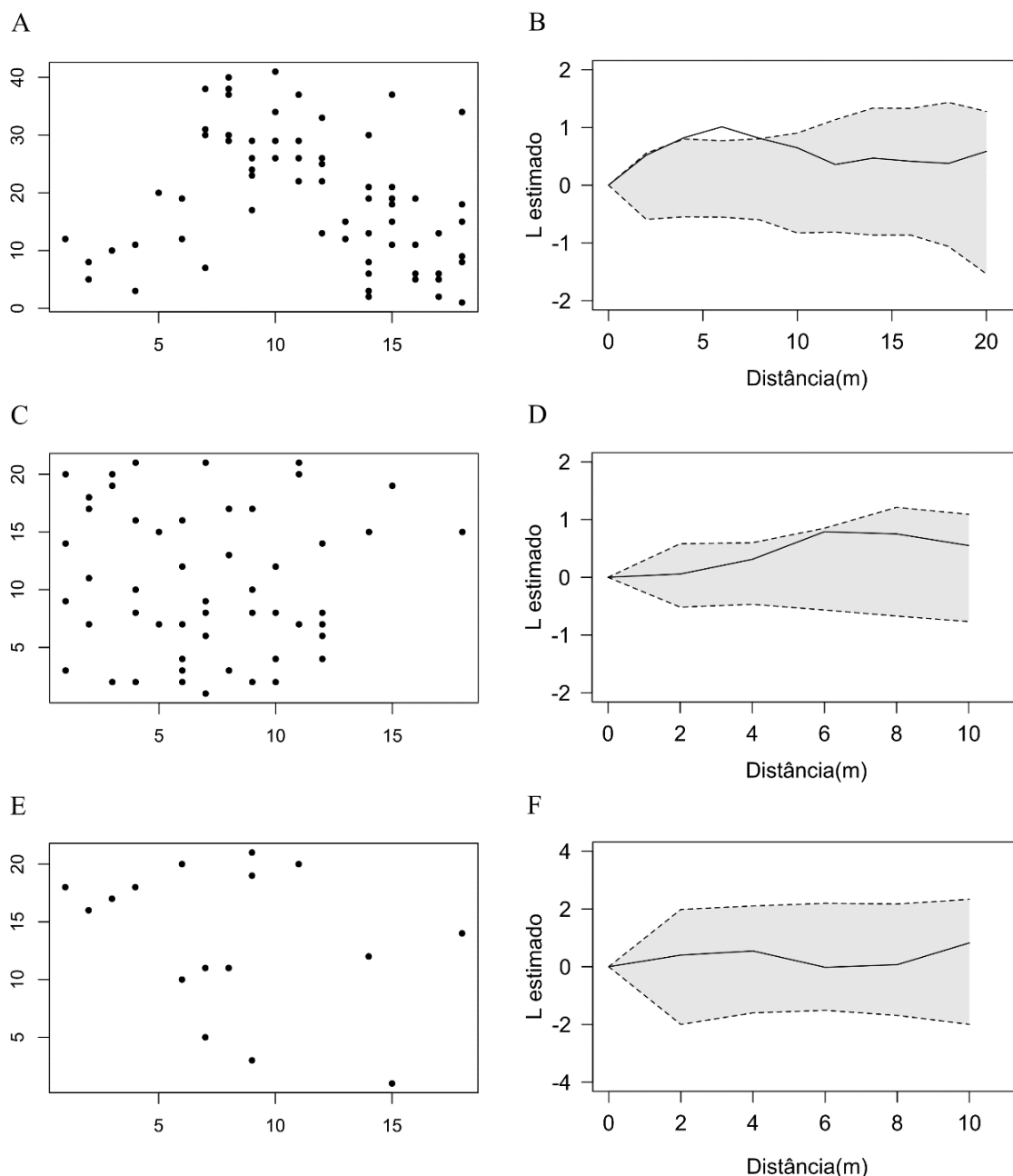


Figura 8. Dispersão entre parcelas experimentais das linhagens de milho-pipoca resistentes a podridão de espiga e, dispersão dos valores estimados para a função K de Ripley transformada pela função $L(s)$, respectivamente, na área de experimental dos ensaios de inverno (A e B) e de verão nas safras de 2019/20 (C e D) e 2020/21 (E e F). Linha pontilhada representa o limite do envelope de confiança a 95% de probabilidade. A linha contínua dentro do limite do envelope de confiança indica que os pontos amostrais seguem distribuição aleatória; acima do limite superior do envelope de confiança indica que os pontos amostrais seguem distribuição espacial agrupada e; abaixo do limite inferior do envelope de confiança, indica que os pontos amostrais seguem distribuição amostral uniforme.

Quanto à coloração de pericarpo, duas linhagens apresentaram grãos brancos, duas com grãos roxos e as demais com grãos de coloração amarela (Tabela 7).

Tabela 7. Severidade (%) de *Fusarium* nas espigas (SFER), rendimento de grãos (kg.ha⁻¹) e capacidade de expansão (ml.g⁻¹) para as linhagens que apresentaram severidade de podridão abaixo da média geral em ambas as safras.

Linhagem	Inverno			Verão			Grão	Grão
	SFER	RG	CE	SFER	RG	CE	Cor	Tipo
L65	5,21	932,68	20,1	24,02	1033,75	17,7	Branco	Pérola
L69	5,45	2272,63	28,8	26,29	1597,04	26,0	Branco	Pérola
L77	9,94	874,33	29,2	11,47	175,23	-	Amarelo	Pérola
L80	13,59	645,67	22,3	15,58	756,16	17,8	Amarelo	Pérola
L265	23,40	1702,39	18,4	22,88	1715,42	10,7	Amarelo	Pérola
L274	7,07	654,76	28,4	9,70	177,16	23,3	Amarelo	Pérola
L292	6,02	2249,14	29,7	26,02	2431,78	26,1	Amarelo	Pérola
L293	22,31	875,63	23,0	12,85	73,27	-	Amarelo	Pérola
L476	23,34	946,40	23,7	22,81	851,42	16,7	Amarelo	Pérola
L480	5,62	1656,01	20,2	16,38	1392,76	13,4	Amarelo	Arroz
L481	18,34	1162,62	20,2	16,47	733,22	17,2	Amarelo	Pérola
L503	11,41	1776,98	27,5	12,24	1142,86	20,0	Amarelo	Pérola
L508	6,44	1624,59	15,4	8,35	1616,47	12,2	Roxo*	Pérola
L656	11,85	314,57	22,1	6,00	388,13	19,8	Amarelo	Pérola
L688	5,26	1238,30	32,9	22,59	1059,37	28,7	Amarelo	Pérola
L689	5,40	1223,71	20,1	24,14	1539,44	28,3	Amarelo	Pérola
P4	25,61	2201,59	17,8	24,33	3080,22	13,3	Amarelo	Intermed
P9	12,20	1576,44	29,2	22,72	1861,24	20,7	Amarelo	Pérola

* Coloração predominante, porém há espigas com grãos de outra cor (possível contaminação).

A coloração branca de linhagens advindas da população Angela pode ser um problema para o desenvolvimento de híbridos caso seja objetivo a obtenção de híbridos uniformes em termos de coloração do pericarpo. Isso porque, no caso da população Angela, parece haver efeito de xênia na coloração do pericarpo, de modo que os grãos F1 já apresentam mudança de coloração (Figura 9 – L65 e L69). No entanto, é válido ressaltar que aspectos como coloração e formato são previstos em grãos de variedades comerciais (Anvisa 2011).

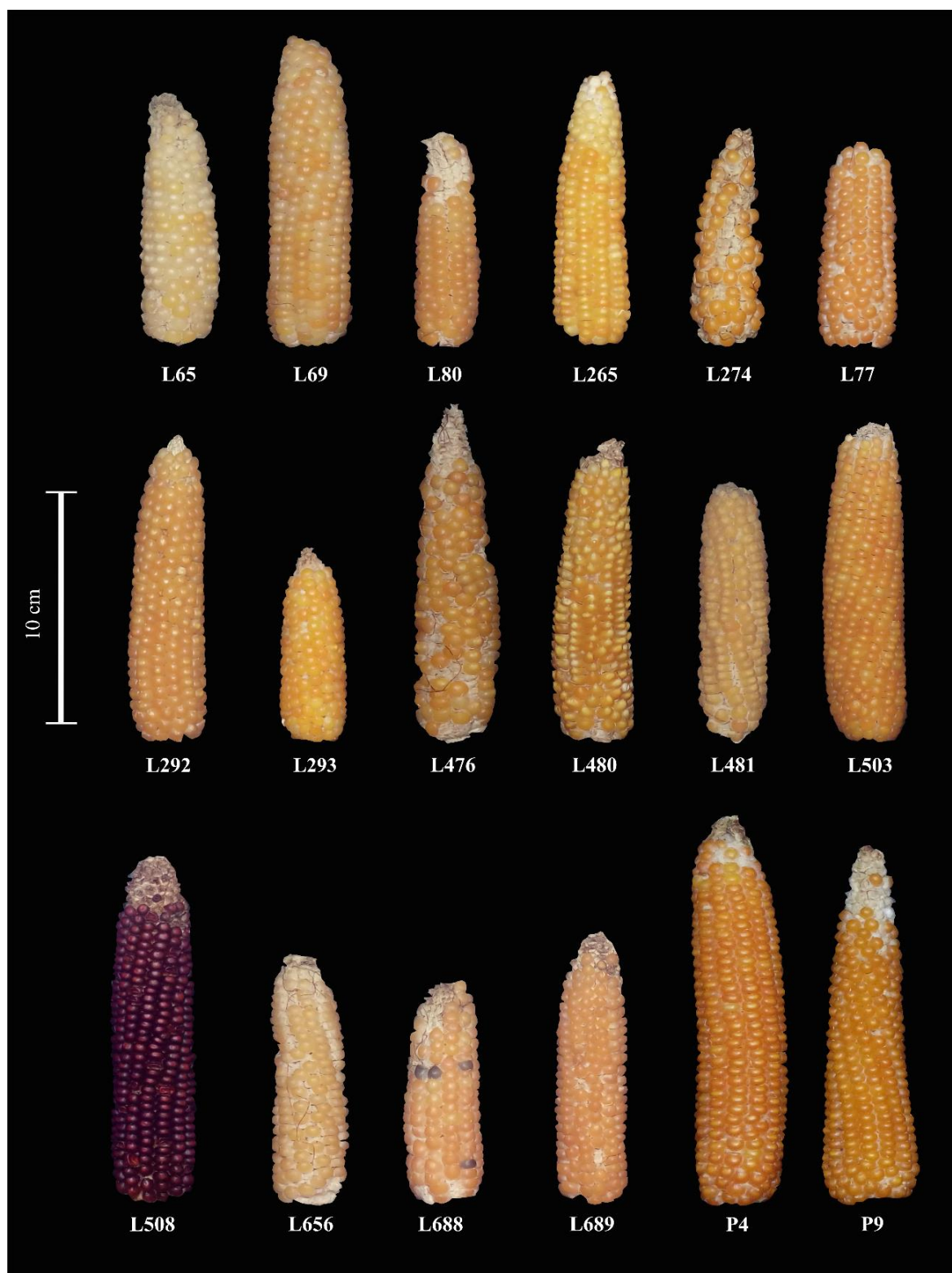


Figura 9. Imagem de espigas das linhagens S₇ de milho-pipoca selecionados como candidatos a fontes de resistência a podridão de espiga por *Fusarium*, dentre 176 linhagens do Banco de Germoplasma da UENF.

Há ainda trabalhos apontando o potencial do uso de grãos com coloração e formato distintos do padrão comum para comercialização em embalagens não-transparentes como é o caso dos grãos destinados à micro-ondas. Apesar de relatos nesse sentido, estudos sobre aceitação e preferência de diferentes tipos de grãos são ainda necessários.

A recomendação de linhagens para a produção direta de híbridos de milho-pipoca deve levar em consideração ainda a capacidade de expansão (CE) dos genótipos, dado que a resistência a doença é um caráter secundário a ser explorado. A preocupação com os valores médios de CE se deve ao fato de que os ganhos com desvios de dominância na produção de híbridos tendem a ser relativamente baixos. Assim, a escolha de linhagens com reduzida CE pode resultar em valores não satisfatórios (abaixo de 30 mL g⁻¹) nos híbridos produzidos.

Observou-se que dentre aquelas linhagens selecionadas, L69, L77, L274, L292, L503, L688, L689 e P9 apresentaram valores de CE acima de 27 mL g⁻¹ em pelo menos uma das safras. Estas linhagens podem assim serem utilizadas em blocos de cruzamentos para obtenção de híbridos superiores em CE e resistência a FER, sendo válido observar para além desses caracteres, o rendimento de grãos desses híbridos.

Para composição desses blocos de cruzamentos é importante considerar também a produtividade de sementes de cada uma dessas linhagens. Esse aspecto é importante ser observado dado a necessidade de genitores femininos capazes de produzir sementes híbridas em quantidade e qualidade, que viabilizem a comercialização de sementes a preços mais acessíveis aos produtores de grãos e mais lucrativos às companhias produtoras de sementes.

Dentre este último grupo destacado, apenas L688 e L689 advêm da mesma genealogia. A existência de pelo menos 7 linhagens de genealogias aparentemente distintas favorece assim a possibilidade de obtenção de ganhos a partir da exploração de efeitos gênicos não-aditivos, principalmente visando ganhos em rendimento de grãos.

Ainda, em relação à linhagem L688, é importante registrar a dificuldade de avaliação visual das espigas devido ao aspecto fosco nos grãos (Figura 8 – L688). Além disso, essa linhagem e outras da população 'UENF 14' apresentam grãos com coloração púrpura distribuídos aleatoriamente nas espigas. Essa característica ocorre nas gerações F₁ com segregação em F₂.

Devido à dificuldade na avaliação de sintomas de *Fusarium* nos grãos, recomenda-se mais estudos para melhor investigar a possibilidade de ausência de fungos nas sementes desse genótipo.

Para além do potencial de cada uma das 18 linhagens selecionadas para a composição de blocos de cruzamentos, nas etapas de obtenção de híbridos, as mesmas podem servir como material genético para estudo de herança e controle gênico envolvido na expressão da resistência a FER futuramente.

Ainda a respeito dos valores de severidade observados nas linhagens em geral, é importante considerar que em linhas endogâmicas, a variância genética observada entre as linhagens, é resultado direto da variância genética aditiva, devido à fixação dos alelos nos *loci* que governam determinado caráter (Falconer e Mackay, 1989). Esse processo de inflação da variância aditiva é explicado por diferentes teorias como descreve Buskirk e Willi (2006).

Assim, ao considerar a ausência de efeitos genéticos de dominância na variância genética entre linhas, dado a amplitude dos valores de severidade de podridão de espiga observado, de 5% a 100%, fica evidente o indício, tanto da natureza poligênica quanto o potencial da exploração de efeitos genéticos aditivos para obtenção de ganhos em resistência a essa doença.

Isto porque, se a resistência a podridão de espiga fosse um caráter governado por muitos genes e predominância de efeitos gênicos não-aditivos, seria esperado haver um decréscimo significativo na resistência à doença e, conseqüentemente, elevação nos níveis de severidade da doença, dado a fixação dos alelos e conseqüente inflação da parcela de contribuição dos efeitos aditivos.

Em outras palavras, os resultados aqui encontrados, sustentam a hipótese de que, no caso do desenvolvimento de híbridos, o sucesso na obtenção de genótipos resistentes à podridão de espiga por *Fusarium* depende diretamente da seleção para resistência durante o processo de desenvolvimento das linhagens.

A partir desta hipótese, considera-se que, para além da necessidade dos testes de potencial das linhagens quando em combinação, deverá haver atenção dos melhoristas para o processo de desenvolvimento de linhagens no que se refere a podridão de espiga. O investimento no melhoramento de populações visando garantir uma maior frequência de alelos de resistência, pela utilização de métodos como seleção recorrente ou pela formação de populações sintéticas a partir de

linhagens resistentes, poderá garantir aos melhoristas maior sucesso no desenvolvimento de híbridos superiores em resistência a *Fusarium*.

3.1.5. CONCLUSÕES

A maior homogeneidade na dispersão da doença e a maior intensidade de sintomas de podridão de espiga ocorreram nas safras de verão, período este, mais chuvoso.

Dentre as 176 linhagens de milho-pipoca do banco de germoplasma da UENF, 18 são candidatas a fontes de alelos de resistência a podridão de espiga, podendo serem utilizadas no desenvolvimento de híbridos ou para introdução de alelos de resistência em novas populações.

Dentre as linhagens candidatas a resistência, oito apresentaram valores de capacidade de expansão interessantes para o desenvolvimento de híbridos com maior volume de pipoca.

3.2. PODRIDÃO DE ESPIGA EM LINHAGENS DE MILHO- PIPOCA: RESPOSTA DIFERENCIAL EM RELAÇÃO A QUANTIDADE DE NITROGÊNIO APLICADO

3.2.1. INTRODUÇÃO

O mercado de milho-pipoca movimenta cerca de 24 bilhões de dólares por ano a nível global, considerando a comercialização de sementes, grãos e pipoca na forma de guloseima ou petisco (FAO - Tridge, 2021). Similar ao milho comum, as mudanças climáticas também têm afetado negativamente a produção de milho-pipoca em todo o mundo (CAMPI, 2021). Os impactos negativos são mais intensos nas regiões tropicais, onde estão localizados, por exemplo, Brasil e Argentina, maiores produtores e exportadores de milho-pipoca da América do Sul.

Os impactos das mudanças climáticas nos sistemas agrícolas têm levantado preocupações a respeito da resiliência dos sistemas agrícolas, e conseqüentemente, sobre a segurança alimentar em médio e longo prazo (Thayer et al., 2020). Nesse contexto, a ciência tem buscado desenvolver tecnologias com objetivo de promover a manutenção da funcionalidade dos sistemas de produção tanto para condições climáticas presentes, quanto para aquelas condições previstas para o futuro (Howden et al., 2007).

A fim de contribuir com o desenvolvimento dessas tecnologias, o melhoramento de plantas trabalha para o desenvolvimento de genótipos adaptados às mais diversas condições ambientais (Ceccarelli et al., 2010). Programas de

melhoramento de milho têm trabalhado com objetivo de desenvolver cultivares que reúnem alelos favoráveis para resistência a pragas e doenças (López-Castillo et al., 2018; Schwantes et al., 2017); eficiência no uso da água (Tolk et al., 2016; Leite et al., 2021; Santos et al., 2021). eficiência no uso de nutrientes para solos com baixo teor de nutrientes (Parentoni et al., 2010; Santos et al., 2017); tolerância a estresse térmico (Alam et al., 2017), estresse salino (Luo et al., 2017), dentre outros estresses.

Existem diversos estudos, conforme citados anteriormente, sobre cada um desses fatores de estresse avaliados de forma isolada, no entanto, Dodig et al. (2019) alerta que devido à complexidade de atuação de fatores condicionadores de estresse no ambiente, é necessário conhecer como se dá a interação desses múltiplos fatores quando atuando de forma simultânea. Essas informações são essenciais para que os programas de melhoramento construam as melhores estratégias de seleção no processo de desenvolvimento de suas cultivares.

Na cultura do milho, cultivares mais eficientes no uso do nitrogênio (nutriente de maior demanda na cultura) e mais resistentes a doenças representam uma demanda imediata para o aumento da resiliência e sustentabilidade dos sistemas de produção (Gil et al., 2019). Essas características contribuem para redução dos custos de produção e para redução dos impactos negativos no ambiente devido ao excesso de aplicação de fertilizantes minerais (Stear et al., 2001; Mastrodomenico et al., 2018).

O milho é afetado por diversas doenças, com destaque para doenças de pós-colheita. A podridão de espiga causada por fungos do gênero *Fusarium* (*Fusarium ear rot* - FER), predominantemente pela espécie *Fusarium verticillioides* (Sacc.), Nirenberg (teleomorfo *Gibberella moniliformis* Wineland), possui elevado potencial de danos nos grãos. O fungo causa um tipo de podridão seca nos grãos a qual compromete a qualidade do produto final, neste caso, o grão (Czembor et al., 2019). Além do aspecto visual que torna a comercialização dos grãos inviável, existem os riscos de produção de micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos para animais e humanos (Duncan e Howard, 2010; Yu et al., 2021).

Nesse contexto, a identificação de genótipos com alelos favoráveis para resistência a FER em condições de cultivo com diferentes quantidades de nitrogênio aplicado no solo, é uma investigação interessante para o melhoramento de milho-pipoca, principalmente nas regiões tropicais. O presente estudo se propôs

avaliar o desempenho *per se* de linhagens de milho-pipoca extraídas de populações sul americanas, quanto a resistência à podridão de espiga por *Fusarium* em experimentos de campo com diferente quantidade de nitrogênio aplicado.

3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA

3.2.2.1. Obtenção de linhagens e desenvolvimento de híbridos em milho

Para compreender a necessidade de conhecer o potencial *per se* das linhagens para o desenvolvimento de híbridos superiores, é importante lembrar um pouco da história do desenvolvimento de linhagens em plantas alógamas.

Desde a década de 1910, com os estudos e teorias sobre a constituição genética de indivíduos e populações, as pesquisas científicas voltadas ao melhoramento de plantas passaram a teorizar e investigar o potencial uso de linhagens para o desenvolvimento de indivíduos altamente heterozigóticos.

Johannsen (1911) em seu artigo "*The genotype conception of heredity*", resumindo seus estudos com tamanhos de grãos em linhas de feijão, teorizou que, sendo possível autofecundar todos os indivíduos de uma população com loci em heterozigose ou não, após a fixação dos alelos na geração por ele denominada de "linhas puras", toda a variação observada na população inicial, estaria representada pela variação entre o conjunto de linhas. A obtenção desse tipo de indivíduo, com variantes de genes (alelos) fixados, favoreceria assim a obtenção de máxima heterozigose na formação de indivíduos F₁.

Essa ideia corroborava com as teorias de Shull (1908), onde em seu artigo intitulado "*Composition of a field of maize*", explicou sobre a composição genotípica de uma população de milho, a qual sendo uma espécie alógama, teria como composição indivíduos heteróticos que nada mais seriam do que o resultado de múltiplos cruzamentos. Ainda, Shull observou que a fixação de alelos a partir de autofecundações, gerava indivíduos com baixo vigor para a espécie do milho, concebendo assim, a ideia de depressão por endogamia. Devido a esse fator, Shull também enunciou que com o conhecimento acumulado até então "o conhecimento sobre as características de duas linhas endogâmicas não possibilitaria estimar o

vigor a ser observado nos indivíduos frutos do intercruzamento entre essas linhas”. Essa ideia foi assim, a base para o desenvolvimento do conceito de heterose.

Uma vez que a possibilidade de obtenção de indivíduos homocigóticos em milho foi apresentada por Shull, programas de melhoramento de plantas começaram a investigar a possibilidade de ganhos genéticos a partir de indivíduos F_1 , como resultado do cruzamento entre “linhas puras” provenientes de populações contrastantes (Duvick, 2001; Lima e Borém, 2018).

A necessidade de cruzar linhagens de diferentes populações se deu pelo fato de que, pelas próprias teorias de Johannsen e Shull, a seleção e também cruzamento de indivíduos de uma mesma população, independentemente do nível de endogamia desses indivíduos, não seria suficiente para gerar uma classe fenotípica diferente daquelas já observadas na população inicial (Shull, 1908; Johannsen, 1911).

A partir desse entendimento, melhoristas de plantas passaram a investigar o potencial heterótico entre diferentes populações, possibilitando assim a identificação de grupos heteróticos, sendo esta etapa, essencial para o sucesso de programas de melhoramento voltados ao desenvolvimento de indivíduos heterocigóticos (híbridos) para uso como cultivares (Carena e Hallauer, 2001).

No período inicial de desenvolvimento de híbridos, os programas de melhoramento enfrentaram dificuldades devido ao fato já alertado por Shull: a perda de vigor das linhagens. O fato de os parentais responsáveis pela geração de sementes híbridas possuírem baixo vigor, gerou maiores custos na produção de sementes e conseqüentemente proporcionou a geração de híbridos simples cujo preço das sementes não era vantajoso frente aos ganhos em produtividade (Duvick, 2001). Esse fator gerou um desafio aos melhoristas que passaram a investigar melhor os diferentes métodos de obtenção de linhagens, investigação esta que trouxe novas descobertas que permanecem no meio científico (Ye e Smith, 2008; Jumbo et al., 2011).

Uma vez conhecido que o nível de homocigose aumenta a partir do cruzamento entre indivíduos aparentados, diferentes métodos podem ser utilizados para obter linhagens com diferentes níveis de endogamia, tais como: cruzamento entre meios-irmãos, irmãos-completos, retrocruzamentos, autofecundações ou mesmo pelo uso de biotecnologia para geração de indivíduos duplo-haploides (Jumbo et al., 2011; Carena et al., 2010).

A escolha da melhor metodologia, bem como o nível de endogamia desejado nos parentais para obtenção de híbridos depende tanto do recurso disponível para investimento nos programas de melhoramento (Morris et al., 2003), dos efeitos genéticos aos quais se pretende explorar no desenvolvimento de cultivares (Lankey et al., 1995), quanto no nível de tecnologia aplicada nos cultivos da região para o qual as cultivares finais serão destinadas (Smale e Olwande, 2014).

Desde a década de 1920, quando os primeiros híbridos começaram a ser produzidos por programas de melhoramento norte-americanos, o processo de obtenção de linhagens bem como o entendimento de fatores genéticos envolvidos na composição de populações avançou bastante. Esses avanços possibilitaram o desenvolvimento de parentais com vigor suficiente para produção e venda de sementes com lucros satisfatórios (Duvick, 2001; Carena, 2009).

Lima e Borém (2018) relatam que o problema inicial com a depressão por endogamia forçou os melhoristas a optarem pela produção de híbridos duplos, triplos e híbridos intervarietais, os quais, embora em menor nível de heterozigose do que os híbridos simples, apresentaram maior plasticidade a diferentes ambientes. Além disso, o constante processo de reciclagem de linhagens a partir de cultivares já lançadas, culminou na obtenção de linhagens com mais elevado vigor e mais viáveis para a produção de híbridos simples, o que impulsionou a produção mundial de milho (Duvick, 2001).

Além dos avanços em rentabilidade e viabilidade na produção de híbridos, as investigações sobre a influência de efeitos genéticos (efeitos aditivos, não-aditivos e epistáticos) na variância genotípica, a exemplo e como base nos avanços da genética animal, bem como as implicações de cada estratégia de melhoramento nesses fatores também avançaram (Falconer e Mackay, 1989; Carena et al., 2010).

Além disso, a possibilidade de avaliação de maior número de cultivares em elevado número de ambientes, bem como os avanços tecnológicos computacionais e de acesso a marcas moleculares, têm possibilitado, diferentemente do que relatou Shull na década de 1900, a construção de modelos de predição da resposta de híbridos a partir da performance de linhagens endogâmicas que irão compor os blocos de cruzamento (Riedelsheimer et al., 2012; Guo et al., 2013; Crossa et al., 2017; Zhang et al., 2021).

Ainda que com os avanços tecnológicos na obtenção de linhagens, as observações iniciais feitas por Shull e Johannsen permanecem: a linhagem não pode oferecer nada além daquilo que já foi observado em sua população de origem. Deste modo, o conhecimento sobre o potencial das populações é essencial para o sucesso no desenvolvimento de híbridos. Não obstante, o pré-melhoramento de populações bem como a composição de populações a partir de cultivares elite é essencial para o sucesso e avanço na obtenção de ganhos via exploração de heterose em milho (Ye e Smith, 2008).

3.2.2.2. Métodos de avaliação e seleção para resistência à podridão de espiga ocasionada por *Fusarium* em milho

A seleção de genótipos superiores em resistência tem sido realizada a partir de ensaios de competição conduzidos em condições de campo ou em ambiente controlado (casas de vegetação). Embora seja comum a avaliação, tanto da incidência de espigas com podridão, quanto da severidade de podridão em cada espiga individual, esta última é a variável resposta comumente empregada para seleção visando resistência. A severidade de podridão nas espigas tem sido avaliada de forma visual, a partir da utilização da escala diagramática proposta pelo Cimmyt (1994). No entanto, é comum também a adaptação dessa escala, utilizando-se valores de 0 a 100% em intervalos de 5% de grãos sintomáticos na espiga (Robertson-Hoyt et al., 2006; Almeida et al., 2021).

A adoção de inoculação artificial é conhecidamente vantajosa, e deve ter preferência dado a maior precisão e seleção de genótipos resistentes que essa prática oferece (Löffler et al., 2010; Butoto et al., 2021). A inoculação das plantas se dá aos 7 dias após a emissão do estigma de pelo menos 50% das plantas, e tem sido realizada tanto via injeção direta da suspensão de esporos nos estigmas (em concentrações que variam de 1 a 5×10^6 esporos por ml), pela introdução (e fixação até a colheita) de um palito de madeira na porção mediana da espiga, sendo este palito previamente esterilizado e depois embebido em solução de esporos (Clements et al., 2003).

Apesar das vantagens do maior controle de inoculação, Silva et al. (2007) defendem que há dificuldades em inocular *Fusarium* em ensaios de campo onde o objetivo é avaliar grande número de genótipos, principalmente quando há elevada

variabilidade para a idade de florescimento das plantas. Outros trabalhos ainda, demonstraram que em regiões onde existe histórico da doença, a avaliação sob inoculação natural foi eficiente para descarte de genótipos suscetíveis (Silva et al., 2007; Small et al., 2012; Kurosawa et al., 2017; Almeida et al., 2021). Embora a infecção natural do patógeno possa ser eficiente para o descarte de genótipos suscetíveis em alguns casos, a inoculação artificial deve ser adotada sempre que possível, pois representa maior garantia de sucesso no processo de seleção.

A seleção é feita comumente com base na média de severidade dos genótipos, podendo haver ou não a aplicação de testes estatísticos para identificação de grupos de médias estatisticamente similares. Em muitos trabalhos, é comum encontrar apenas uma abordagem descritiva em torno das médias de severidade de FER nas espigas.

Além da incidência e severidade do patógeno por meio da identificação de sintomas nos grãos, notadamente, a maior parte dos estudos da última década têm focado de forma mais intensa na caracterização e quantificação de micotoxinas nos grãos (Lanubile et al., 2017; Johnson et al., 2018; Guo et al., 2020). O processo de quantificação de micotoxinas é ainda laborioso e necessita maior gasto financeiro por parte dos programas de melhoramento.

Embora haja trabalhos que indicam haver correlação entre a severidade da doença e o acúmulo de micotoxinas (Butoto et al., 2021), existem ainda divergências na literatura, sendo necessários estudos mais aprofundados para esclarecer estes aspectos.

Dentre as principais dificuldades a serem superadas em termos de aprimoramento da etapa de avaliação de FER, está a utilização de ferramentas que garantam maior precisão na quantificação do percentual de grãos, e ainda, a identificação de possíveis caracteres passíveis de serem utilizados na seleção indireta para resistência.

3.2.2.3 Melhoramento para eficiência no uso de nitrogênio

O nitrogênio é um dos macronutrientes, reconhecidamente, de maior importância para o desenvolvimento vegetal sendo que a prática de fertilização com nitrogênio é apontada como responsável por alavancar a produção mundial de grãos a partir da década de 1950 (Smil, 1999).

Por outro lado, a aplicação excessiva de fertilizantes nitrogenados no solo favorece a acidificação dos mesmos, pela neutralização de partículas de cálcio e magnésio, e liberação de maior quantidade de alumínio (Al^{+3}) na solução do solo, constituindo assim um cenário de toxidez do solo (Bowman et al., 2008).

Ainda, o excesso na deposição de nitrogênio no solo, pode favorecer a formação de espécies reativas deste elemento, as quais constituem de sérios problemas ambientais e, conseqüentemente, para a saúde humana (Liu et al., 2013).

Em vista da necessidade de ser capaz de alimentar cerca de 10 bilhões de pessoas até 2050, a humanidade se vê desafiada a encontrar o equilíbrio entre adotar práticas agrícolas capazes de impulsionar a produção e ao mesmo tempo, evitar que tais práticas impactam negativamente sobre a sustentabilidade dos sistemas de produção (Kanter et al., 2020).

Em cultivos de milho, a quantidade de nitrogênio a ser aplicada depende da quantidade do nutriente disponível no solo e da produtividade almejada. Estudos sobre doses ótimas têm apresentado variações entre 0 e 270 kg de N por hectare a cada ciclo (Ayub et al., 2002; Araújo et al., 2004; Amaral Filho et al., 2005; Dhital e Raun 2016).

Como principal efeito ao milho, Amaral Filho et al. (2005) demonstraram que o aumento na quantidade de nitrogênio aplicado resulta em ganhos lineares no teor de clorofila, número de grãos por espiga, peso médio de grãos, produtividade e teor de proteína nos grãos.

Embora a utilização de nitrogênio mineral seja uma prática reconhecidamente eficiente para o aumento da produtividade das culturas, a adoção de estratégias para maior eficiência e racionalidade no uso desse nutriente deve ser priorizada, principalmente nos países em desenvolvimento (Eickhout et al., 2006).

A utilização de práticas como plantio direto e aporte de cobertura vegetal por práticas de adubação verde têm contribuído para a redução na demanda de fertilizantes minerais nitrogenados. Todavia, a falta de adequação da aplicação de fertilizantes com a quantidade de nitrogênio disponibilizado pela decomposição dos resíduos pode gerar ainda maiores sobrecargas de nitrogênio no ambiente, causando impactos negativos (Poffenbarger et al., 2018).

A utilização e desenvolvimento de plantas com maior eficiência no uso de nutrientes é apontada como caminho promissor para redução na demanda de insumos e conseqüentemente do impacto do uso excessivo desses minerais na agricultura (Sassenrath et al., 2012; Lu et al., 2019).

A eficiência no uso de nitrogênio pode ser compreendida como a quantidade de grãos produzidos por unidade de nitrogênio aplicado no solo (Asibi et al., 2019). O desenvolvimento de cultivares mais resistentes a doenças e adaptadas a cultivos em solos pobres em nutrientes tem sido objetivo de trabalho do melhoramento de plantas (Dodig et al., 2019).

Uma característica desejável para aumentar a eficiência no uso de nitrogênio tanto em plantas C3 quanto C4, é a capacidade de quebrar de forma mais lenta as moléculas associadas a fotossíntese e assim promover maior alocação de nitrogênio nas folhas e translocação destas para os grãos (Mu e Chen, 2021).

3.2.2.4. Relação entre doenças e aplicação de nitrogênio: desafios para o melhoramento genético

Devido ao seu importante papel na síntese de aminoácidos e conseqüentemente na formação de proteínas, o nitrogênio possui papel fundamental na agilidade de resposta das plantas a doenças e pragas (Schultz et al., 2013). Estudos com *Arabidopsis thaliana* demonstram que a regulação na relação carbono/nitrogênio (C/N) é essencial para ativação de genes relacionados a respostas de defesa da planta (Maekawa et al., 2012).

O excesso na absorção de nitrogênio pode também gerar a produção de compostos que funcionam como atrativos para insetos, com risco de aumentar a taxa de herbivoria nas plantas (Aljbory e Chen, 2018). Alguns estudos apontaram que a incidência e severidade de doenças fúngicas tendem a aumentar em condições de maior disponibilidade de nitrogênio (Reid et al. 2001; Sun et al. 2020).

Estudos apontam que diferentes moléculas nitrogenadas disponibilizadas por fertilizantes inorgânicos, atuam sobre mecanismos diferentes de resistência a doenças. Enquanto moléculas de amônio, por exemplo, tendem a desfavorecer componentes estruturais e bioquímicos de defesa primária nas plantas, moléculas de nitrato atuam como reguladoras de hormônios vegetais importantes na

expressão de genes de resistência a patógenos específicos (Devadas et al. 2002; Yaeno, Iba 2008; Maekawa et al. 2012).

Entre o dilema da necessidade de cada nutriente e o perigo de sua absorção em excesso, as plantas são desafiadas a regular sua taxa de absorção desses nutrientes para assim garantir seu ótimo desenvolvimento. Como adaptação, algumas espécies de plantas desenvolveram a capacidade de armazenar nitrogênio em moléculas de aminoácidos não-proteicos, as quais não são atrativas para insetos, resultando assim, em uma resposta de resistência a insetos (Huang et al., 2011).

O desenvolvimento de cultivares de milho mais eficientes na utilização de nitrogênio e mais resistentes a doenças, principalmente em cultivos em solos pobres em nitrogênio, representa um ganho imediato em sustentabilidade nos sistemas de produção (Gil et al. 2019). Isso porque o nitrogênio, elemento mineral requerido em maior quantidade durante o ciclo de produção do milho, é geralmente disponibilizado via aplicação de adubos minerais provenientes de fontes não renováveis (Asibi et al. 2019; Gil et al. 2019). Assim, a maior eficiência das plantas no uso do nitrogênio representa potencial redução tanto nos custos de produção, quanto nos eventuais impactos negativos que a disponibilização desse mineral pode causar ao meio ambiente (Mastrodomenico et al. 2018).

Há evidências científicas de que a quantidade e natureza do nitrogênio disponibilizado para as plantas podem afetar de forma contrastante os mecanismos de defesa das plantas contra doenças fúngicas (Mur et al. 2013; Sun et al. 2020). Esse resultado, somado às divergências encontradas em literatura sobre os efeitos do nitrogênio sobre podridão de espigas evidenciam a complexidade do patossistema *Fusarium* - milho (Reid et al. 2001; Kim, Woloshuk 2008; Souza et al. 2016).

Especificamente para podridão de espiga por *Fusarium*, alguns genes da família LOX têm sido apontados como candidatos a genes de maior efeito na resistência (Lanubile et al. 2017). Mur et al. (2013) indicaram que moléculas de óxido nítrico (NO), formadas a partir de moléculas nitrogenadas como as disponibilizadas via fertilizantes químicos, atuam diretamente na regulação de hormônios ligados a expressão de genes da família LOX.

Os estudos sobre a relação entre quantidade de nitrogênio aplicado e resposta de resistência à podridão de espiga, assim como para diversas outras

doenças, estão ainda em fase inicial. Todavia, os resultados e teorias preliminares apontam um futuro promissor nessa área de investigação.

Com base nesse pressuposto, um estudo preliminar em linhagens de milho-pipoca foi conduzido com objetivo de obter informações que contribuam para o avanço do conhecimento dos efeitos do nitrogênio no patossistema milho-*Fusarium*. A metodologia utilizada nesse estudo é descrita a seguir.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material Vegetal

Foram conduzidos 10 experimentos de campo para caracterizar 94 linhagens de milho-pipoca provenientes de populações sul americanas (Tabela 8), em dois ambientes distintos quanto a quantidade de nitrogênio aplicado.

Tabela 8. Lista das populações de polinização aberta com seu respectivo país de origem e instituição doadora, com o respectivo número (Num.) de linhagens avaliadas sob diferentes condições de aplicação de nitrogênio.

População	Num.	País	Instituição	Digital Object Identifier (DOI)
ARZM 05.083	3	Argentina	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/H19ST
ARZM 07.049	1	Argentina	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/GQJGJ
ARZM 13.050	5	Argentina	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/H1C4V
Barão de Viçosa	9	Brasil	UFV	-
BOYA 462	1	Colômbia	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/GBF2F
BOZM 260	5	Bolívia	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/GPAF*
CMS-42	1	Brasil	UFV	-
CHZM 13134	1	Chile	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/GTMQG
IAC 125	10	Brasil	IAC	-
PA 091	4	Brasil	UEM	-
PA 170 Roxo	6	Brasil	UEM	-
Para 172	6	Paraguai	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/GCFPQ
PR 023	9	Brasil	UEM	-
RS 20	3	Brasil	UEM	-
SAM	8	Brasil	IAC	-
SE 013	8	Brasil	UEM	-
URUG 298	7	Uruguai	CIMMYT	https://doi.org/10.18730/GJQSS
Viçosa-Viçosa	2	Brasil	UFV	-
Zelia	1	Brasil	UEM	-

CIMMYT – Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo, México; UFM – Universidade Federal de Viçosa, Brasil; IAC – Instituto Agrônomo de Campinas, Brasil; UEM – Universidade Estadual de Maringá – Paraná, Brasil.

Dentre essas populações, a população PARA 172, também registrada no banco de germoplasma do Cimmyt como Avati Pichingá, é considerada uma população com fontes de resistência a podridão de espiga (Cimmyt, 2012).

O trabalho de Kurosawa et al. (2017) mostrou que a população IAC 125 também demonstrou um elevado nível de resistência à podridão de espiga.

3.2.3.2 Caracterização dos ensaios de competição

Os ensaios de competição foram implantados na estação experimental do Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo (Figura 10-A), localizado em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Latitude 21° 42' 48" S, Longitude 41° 20' 38" O, 14 m de altitude).

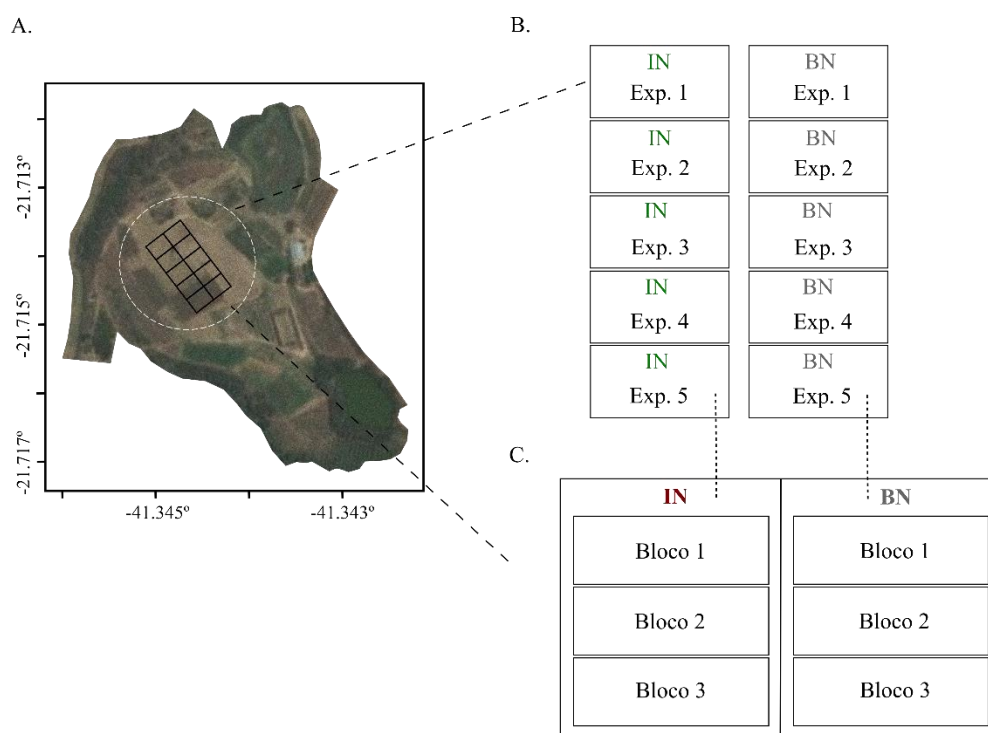


Figura 10. Ilustração da estação experimental do Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo (A), em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil; com a organização dos ambientes (B) com aplicação de nitrogênio em quantidade integral (IN) e baixo (BN), bem como organização dos blocos dentro de cada experimento (C).

As linhagens foram avaliadas em dois ambientes diferentes quanto a quantidade de nitrogênio (N) aplicado. A diferenciação dos ambientes se deu da seguinte forma: na adubação de fundação ou plantio, os dois ambientes receberam 32 kg de N ha⁻¹, 112 kg de fósforo (P₂O₅) ha⁻¹ e 56 kg de potássio (K₂O) ha⁻¹; no entanto, para adubação de cobertura, o ambiente denominado como nitrogênio integral (IN) recebeu a quantidade de 118 Kg de N ha⁻¹, compondo assim o ambiente com aplicação da quantidade integral de N recomendado (150 kg ha⁻¹).

Já o outro ambiente, denominado de baixo nitrogênio (BN), recebeu apenas 29 kg ha⁻¹ de N compondo assim um total de 61 kg ha⁻¹ de N, 25% da recomendação. A quantidade de N aplicado nos ambientes BN foram definidos de modo que houvesse garantia de produção de espigas que viabilizem a avaliação, considerando resultados de estudos anteriores e a natureza genética do germoplasma de estudo (linhagens com elevada depressão endogâmica).

As adubações de cobertura foram realizadas em duas etapas, nos estádios em que as plantas apresentavam quatro (V4) e seis (V6) folhas completamente expandidas, respectivamente. Para a adubação de cobertura foi utilizado ureia (46% nitrogênio).

Devido ao elevado número de linhagens avaliadas, a fim de obter maior precisão na captação dos erros experimentais, os ensaios foram dispostos em grupo de experimentos com tratamentos comuns (Gomes e Guimarães, 1958).

Nesse delineamento, para cada nível de N aplicado (ambiente), foram instalados cinco experimentos em áreas adjacentes (Figura 10-B). Cada experimento recebeu 18 tratamentos regulares e quatro tratamentos comuns, os quais foram dispostos em blocos casualizados com três repetições (Figura 10-C).

As linhagens L75 e L80 (pop. Viçosa), P2 (pop. CMS 42) e P7 (pop. Zaeli), foram utilizadas como tratamentos comuns. Assim, essas linhagens ocorreram em todos os cinco ensaios de cada ambiente.

As parcelas experimentais foram compostas por uma linha de plantio com 16 plantas. O espaçamento adotado nos ensaios foi de 0,2 m entre plantas e 0,9 m entre linhas correspondente a densidade aproximada de 55.555 plantas ha⁻¹.

Durante os ensaios a temperatura diária média foi de 28,5°C com variação de 22 a 33°C. A umidade relativa do ar variou de 55% e 92%. O total de chuva acumulado no período foi de 358,4 mm (Figura 11).

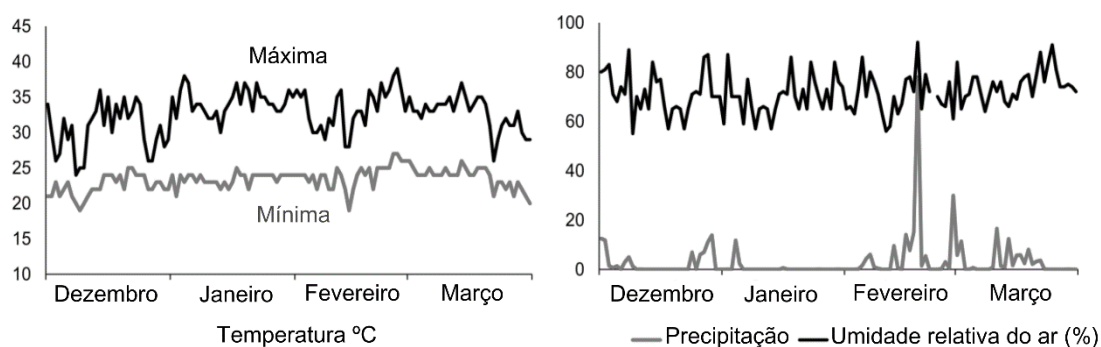


Figura 11. Condições climáticas diárias no período de dezembro de 2018 a março de 2019 em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Fonte: dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

3.2.3.3 Condução dos ensaios experimentais

Além da adubação descrita anteriormente, as plantas receberam irrigação por aspersão durante todo o ciclo, em dias alternados, com turno de rega de 2h por dia. Durante os primeiros 45 dias de cultivo, foram realizadas duas pulverizações de inseticida para o controle de lagartas (inseticida sistêmico a base de thiazol – Engeo Pleno™ S). Após esse período, nenhum outro produto químico foi aplicado na área. Para o controle de plantas espontâneas foram realizadas capinas nas entrelinhas de plantio aos 20 e 40 dias após plantio, respectivamente.

O contato das plantas com inóculos *Fusarium verticillioides* ocorreu de forma natural uma vez que as áreas onde os ensaios foram instalados possuem histórico de ocorrência do patógeno (Kurosawa et al., 2017; Almeida et al., 2021). A estação experimental onde os ensaios foram conduzidos não conduz aplicação de fungicidas em nenhum dos ensaios de competição nela instalados, o que contribui para a manutenção de fontes de inóculo na área.

3.2.3.4 Avaliação de podridão de espiga

Aos 120 dias após o plantio, as espigas foram colhidas manualmente. Em cada unidade experimental foi contabilizado o número de espigas visivelmente infectadas por *Fusarium* e a severidade de podridão (SvFER), avaliada nas espigas infectadas.

A incidência de espigas podres (InFER) foi expressa pelo percentual de espigas acometidas por FER em relação ao total de espigas colhidas na parcela. As avaliações de SFER foram realizadas com auxílio de escala diagramática adaptada à escala proposta pelo Cimmyt (1994). Nesta adaptação foram atribuídos a cada espiga, valores entre 0 e 100 intercaladas em 5, correspondente ao percentual de grãos visivelmente infectados por *Fusarium* na espiga (Figura 2). Assim, foram avaliadas 1742 espigas em BN e 1703 espigas em IN, totalizando 3445 observações.

3.2.3.5 Análises Estatísticas

A fim de identificar possíveis efeitos espaciais na incidência, mapas com gradiente ambiental de incidência da doença foram construídos para identificar a não existência de pontos de agregação.

Os dados de severidade para cada um dos experimentos em cada ambiente, foram submetidos a análise de homogeneidade de variâncias e normalidade de resíduos de O'Neill e Mathews e Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade, respectivamente.

Em seguida, os dados de SvFER de cada ensaio foram submetidos a análise de variância (teste F) individual considerando o modelo em blocos casualizados:

$$Y_{ij} = \mu + B_j + G_i + \varepsilon_{ij} \quad (5)$$

Em que:

Y_{ij} é o valor observado na parcela que recebeu o efeito do i -ésimo genótipo e da j -ésima repetição; μ é a constante geral; B_j é o efeito do j -ésimo bloco; G_i é o efeito do i -ésimo genótipo, e; ε_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} , com NID $(0, \sigma^2)$.

Em seguida, os experimentos foram analisados de forma agrupada dentro de cada ambiente, sendo os dados submetidos a análise de variância considerando o modelo de análise conjunta de experimentos em blocos completos casualizados com tratamentos comuns (Gomes e Guimarães, 1958):

$$Y_{ijk} = \mu + B/E_{k(j)} + G_{i(adjust)} + E_j + CE + \varepsilon_{ijk} \quad (6)$$

Em que:

Y_{ijk} é o valor observado na parcela que recebeu o efeito o i -ésimo genótipo e do k -ésimo bloco no j -ésimo experimento; μ é a constante geral; $B/E_{k(j)}$ é o efeito do k -ésimo bloco no j -ésimo experimento; G_i é o efeito do i -ésimo genótipo, considerando o ajuste de acordo com a natureza do tratamento (regular ou testemunha); E_j é o efeito do j -ésimo experimento; CE é o efeito da interação entre os tratamentos comuns e os experimentos, e; ε_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} , com NID $(0, \sigma^2)$.

Quando detectado o efeito significativo nos efeitos de experimentos, os valores foram ajustados pela adição de um fator de correção ($Y_{ijk} + FC_j$) estimado a partir da expressão:

$$FC_j = \bar{X} + \bar{X}_j \quad (7)$$

Em que:

FC_j é o valor estimado do fator de correção para as parcelas alocadas no j -ésimo experimento; \bar{X} é a média geral dos genótipos comuns em todos os ensaios e; \bar{X}_j é a média geral dos genótipos comuns no j -ésimo experimento.

Após o ajuste, conduziu-se a análise de variância individual e conjunta dos diferentes ambientes (níveis de N aplicado) seguindo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + B/A_{k(j)} + G_i + A_j + GA_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (8)$$

Onde:

Y_{ijk} é o valor observado na parcela correspondente ao i -ésimo genótipo alocada no j -ésimo ambiente no k -ésimo bloco; μ é a constante geral; $B/A_{k(j)}$ é o efeito do k -ésimo bloco no j -ésimo ambiente; G_i é o efeito do i -ésimo genótipo; A_j é o efeito do j -ésimo ambiente; GA_{ij} é o efeito da interação entre o i -ésimo genótipo com o j -ésimo ambiente e; ε_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} , com NID $(0, \sigma^2)$.

Confirmada a existência de diferenças significativas entre genótipos, as médias foram agrupadas pelo algoritmo de Scott Knott (1974). As análises foram

realizadas com auxílio do programa estatístico R, a partir das funções disponíveis no pacote básico (*stats*) e no pacote estatístico 'ExpDes.pt' (Ferreira et al. 2021). A Análise de Grupos de Experimentos em Blocos Completos Casualizados com Tratamentos Comuns foi conduzida a partir do *script* apresentado no Apêndice B.

3.2.4 RESULTADO

Observou-se elevada incidência do patógeno em toda a área experimental (Figura 12). Esse fator possivelmente foi favorecido pelas condições de elevada temperatura associado à manutenção da umidade relativa do ar durante o período de instalação dos experimentos.

Apesar dos ensaios terem sido conduzidos em condições de infecção natural do patógeno, houve elevada incidência da doença na área e também homogeneidade de variâncias residuais, fato este confirmado pelo teste de O'Neill e Mathews, mostrando que as condições experimentais foram suficientes para avaliar o mérito dos genótipos sem o risco de conclusões viesadas.

Para severidade de FER (SvFER), os efeitos de genótipo e ambiente foram significativos ($p < 0,01$) tanto em IN quanto BN (Tabela 9).

Contudo, a interação entre tratamentos comuns e ambientes foi significativa apenas em BN. A significância na interação entre ensaios demonstrou a importância da captação dos efeitos de ensaio a partir de maior número de tratamentos testemunhas e não somente por um único tratamento.

A diferença de média entre os ambientes BN e IN foram de 1,50% para incidência de FER (InFER) e de 6,03% para SvFER. Os coeficientes de variação para InFER foram 5,25% e 4,35% em BN e IN, respectivamente. Para SvFER, o coeficiente de variação foi de 17,30% em BN e 15,31% em IN.

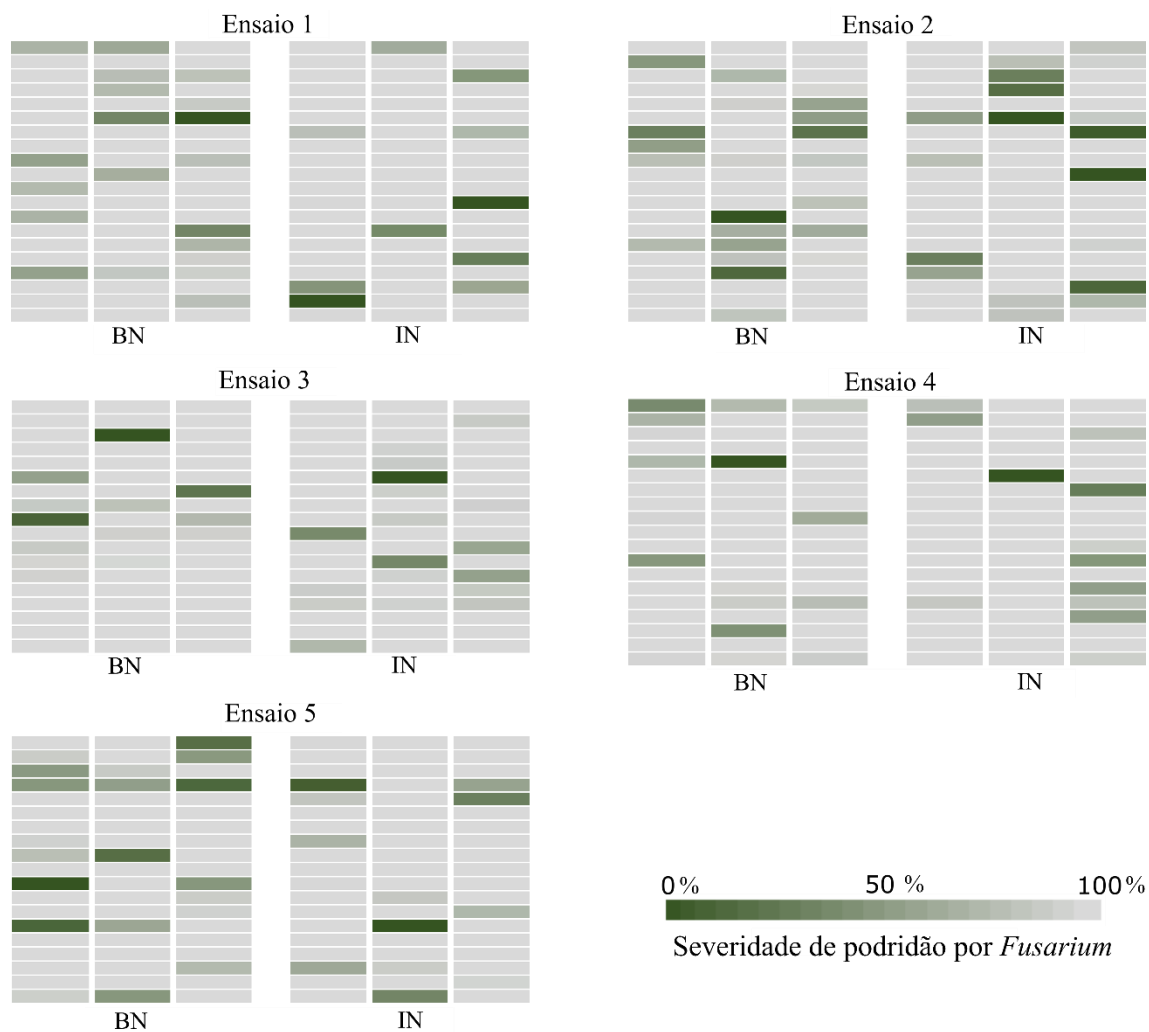


Figura 12. Gradiente ambiental de incidência de podridão de espiga nas parcelas de cinco ensaios de competição entre linhagens de milho-pipoca, em ambientes contrastantes quanto à aplicação de nitrogênio: IN – ambiente com aplicação da quantidade integral de nitrogênio recomendado; BN – ambiente com aplicação de baixa quantidade de nitrogênio. Cada quadrante menor representa uma unidade experimental (linha com 15 plantas) e, cada coluna de quadrantes em cada ambiente de cada ensaio, representa uma repetição (bloco).

Nas análises de variância individual e conjunta dos ambientes (nível de N) os efeitos de genótipo foram significativos (Tabela 10).

Esse resultado confirma a existência de variabilidade genética para incidência e severidade de FER no germoplasma avaliado. No entanto, a existência de interação G x A significativa na análise conjunta demonstrou que as linhagens respondem de forma diferenciada com a modificação da quantidade de nitrogênio aplicado.

Tabela 9. Análise de variância para grupos de experimentos em blocos completos casualizados com tratamentos comuns, para dados de severidade de podridão de espiga por *Fusarium* em linhagens de milho-pipoca, em dois ambientes: aplicação integral (IN) e aplicação reduzida (BN) da quantidade de nitrogênio recomendado; no município de Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

	Bloco/E	Ensaio (E)	Trat(ajust.)	Test.x E	Erro	Média
G.L.	4	10	93	12	210	
Quadrado Médio (QM)						
IN	172,30	398,12 **	1518,03**	198,38**	120,51	71,75%
BN	127,44	611,06 **	1645,06 **	156,27 **	129,23	65,72%

** significativo a 1% de probabilidade de acordo com teste F.

Tabela 10. Análise de variância individual e conjunta para severidade de podridão de espiga por *Fusarium* em milho-pipoca, em ambientes (N) contrastantes quanto a quantidade de nitrogênio aplicado: quantidade integral da recomendação (IN) e baixa quantidade (BN).

Análise Individual					
	Bloco	Gen. (G)			Erro
G.L.	2	93			186
IN (QM)	223,82	1219,93 **			121,26
BN (QM)	137,37	1402,43 **			130,36
Análise Conjunta					
	Bloco/N	Amb. (N)	Gen. (G)	G x N	Erro
G.L.	4	1	93	93	372
QM	181,82	5177,02 **	2067,40 **	554,97 **	125,81

QM = quadrado médio; Gen. = Genótipo; Amb.= Ambiente; ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

O teste de agrupamento de médias reuniu as linhagens L80, L215, L274, L294 e L330 no grupo de menor SvFER em IN, grupo este com valores de severidade abaixo de 32%. No ambiente BN, o grupo de menor SvFER, com valores abaixo de 30%, reuniu as linhagens L80, L294, L395, L476 e L510 (Figura 13).

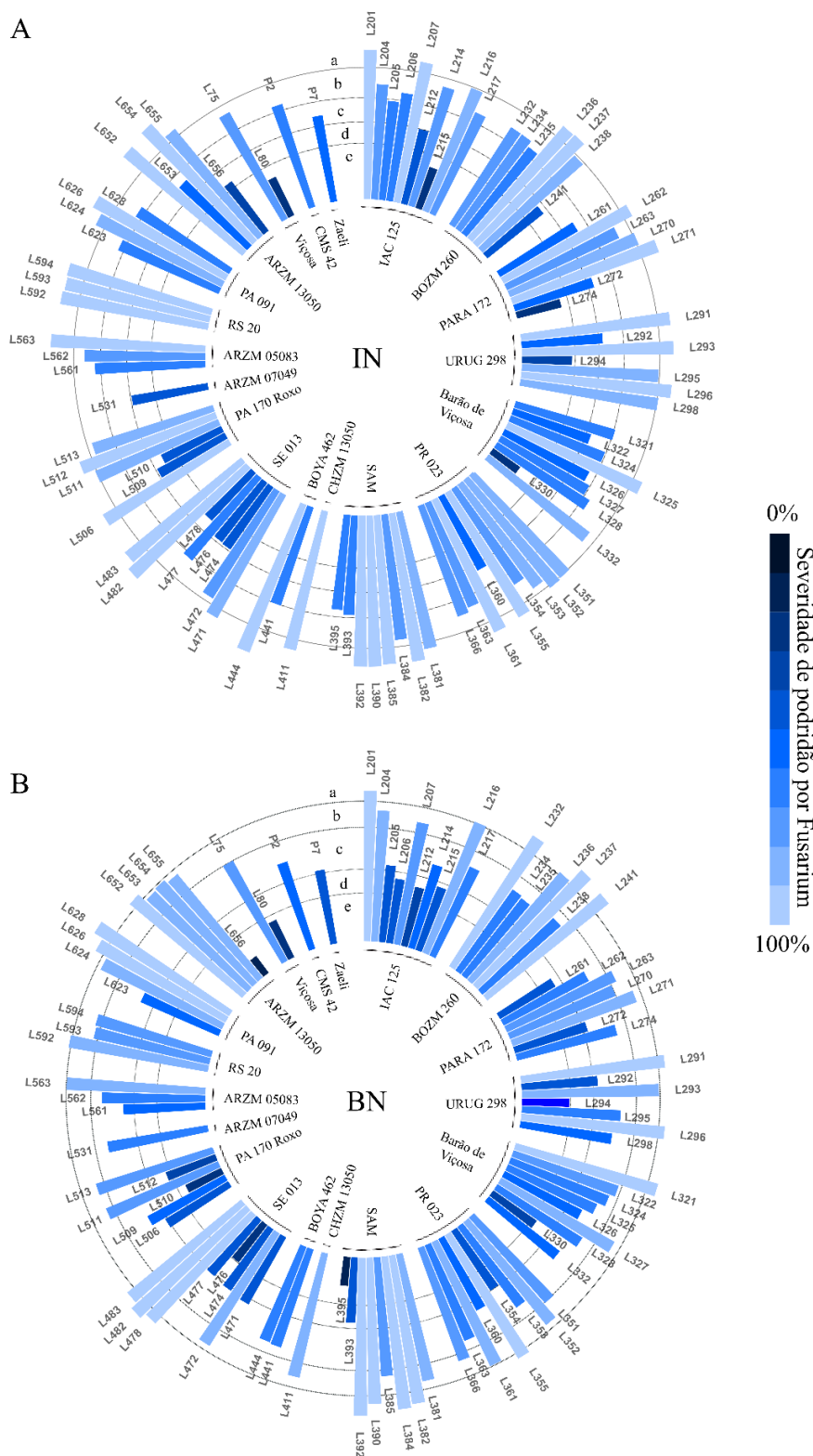


Figura 13. Agrupamento de médias entre genótipos de milho-pipoca de acordo com a severidade de podridão de espiga por *Fusarium* em experimentos com aplicação da quantidade integral de N (IN) e quantidade reduzida de N (BN).

Linhas circulares entre as barras indicam os limites para determinação dos grupos de médias de acordo com o algoritmo de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A redução da quantidade de nitrogênio promoveu aumento de 15,1%, 36,4% e 12,8% de severidade de podridão nas linhagens L215, L274 e L330, respectivamente, o que exclui essas linhagens do grupo de menor severidade. Essa diferença na classificação das linhagens evidencia o efeito da interação genótipo x quantidade de nitrogênio aplicado.

As linhagens da população IAC 125 apresentaram médias para SvFER de 69,7% em IN e de 63,2% em BN. A linhagem L215 se destacou com menor severidade em IN e BN. Já no BN, além da L215, se destacaram as linhagens L206 e L212. As linhagens da população BOZM 260 apresentaram média de 75,9% de SvFER em IN e 82,3% em BN. A linhagem L241 apresentou menor média em IN e as linhagens L234, L235 e L238 apresentaram menores médias em BN.

Para a população PARA 172, o grupo de linhagens avaliadas apresentou média de 70,5% de severidade em IN e 63,7% em BN. As menores severidades foram observadas para L274 em IN e L261 em BN.

No grupo de linhagens da população URUG 298 apresentou média de 77,6% e 66,8% de SvFER em IN e BN, respectivamente. A linhagem L294 se destacou em ambos os ambientes. Em termos de diferença entre médias nos ambientes, destaca-se a linhagem L298 que mostrou uma redução de 29,4% na severidade da doença com a redução da quantidade de N aplicado.

Para as linhagens provenientes da população Barão de Viçosa obteve-se média de 63,1% e 64,8% em IN e BN, respectivamente, onde o genótipo L330 se destacou com menor média nos dois ambientes. No grupo de linhagens da população PR 023, a severidade média foi de 78,9% em IN e de 70,4% em BN. O genótipo L360 mostrou menor SvFER nos dois ambientes e, a L354 apresentou menor média exclusivamente em BN.

Para a população SAM, as linhagens apresentaram média de 83,9% de severidade em IN e 75,2% em LN. Nos dois ambientes, os destaques em menor nível de resistência foram os genótipos L393 e L395, de modo que para este último, a redução da aplicação de nitrogênio gerou um decréscimo de 24% na SvFER.

Para as linhagens daquelas populações com até três genótipos representantes: CHZM 13 050, BOYA 462, ARZM 07 049, ARZM 05 083, RS 20, Viçosa, CMS 42 e Zaeli; somente na população Viçosa, houve linhagem classificada no grupo de menor média de severidade dentre todo o painel de linhagens, a linhagem L80. Essa linhagem se manteve com menor SvFER nos dois

ambientes. O potencial da L80 para resistência à podridão foi descrito anteriormente por Kurosawa et al. (2017) em um estudo inicial com 27 linhagens e 10 populações sob condições de aplicação de quantidade integral de nitrogênio.

O grupo de linhagens da população SE 013 apresentaram média de 62,1% e 58,1% (menores médias gerais dentre os grupos) em IN e BN, respectivamente. Em IN, L474, L476 e L478 tiveram as menores médias e, em BN, somente L476 se destacou com menor média.

As linhagens da população PA 170 Roxo tiveram média de 73,1% de SvFER em IN e 52,4% em BN. L509 e L510 foram os destaques com menores médias em IN. Já em BN, apenas L510 foi classificada no grupo com menor média dentro da genealogia. Na linhagem L512 foi observada a maior redução de SvFER em função da redução de N aplicado, dentre todas as linhagens, com diferença de média de 58,1%.

Nas linhagens da população PA 091, a média de severidade foi de 80,7% e 83,1% em IN e BN, respectivamente. As linhagens L623 e L628 apresentaram os valores mais baixos de severidade em IN, ainda que esses valores tenham sido acima de 90%. Em BN, apenas a linhagem L623 se destacou com menor valor de média.

Finalmente, para as linhagens da população ARZM 13 050, as médias de severidade foram de 76,4% em IN e 72,8% em BN. Nessa genealogia, nos dois ambientes, apenas L656 apresentou menores valores de média.

Considerando a média geral de SvFER para cada ambiente (74,1% em IN e 68,2% em LN), observou-se que os grupos de linhagens das populações IAC 125, PARA 172, Barão de Viçosa, SE 013 e PA 170 Roxo foram aqueles que apresentaram valores médios abaixo da média geral nos dois ambientes. Ainda, o grupo de linhagens da população URUG 298 apresentou valores médios menores que a média geral em BN, somente.

Dentre os 94 genótipos avaliados, a redução na quantidade de nitrogênio aplicado resultou em aumento de SvFER em 23 linhagens e redução de SvFER em 71 linhagens.

3.2.5 DISCUSSÃO

Conforme esperado, as diferenças na quantidade de N aplicado resultaram em diferentes respostas das linhagens à SvFER. Alguns estudos já demonstraram como as diferenças na aplicação de nitrogênio foram capazes de influenciar o desempenho de genótipos de milho para caracteres agronômicos, como produtividade de grãos, capacidade de expansão e severidade de doenças foliares (Ferro et al., 2007; Santos et al., 2017; Kurosawa et al., 2021).

Algumas pesquisas têm buscado investigar os mecanismos envolvidos nessa diferenciação de resposta a doenças em geral, como resultado da quantidade de N aplicado (Mur et al., 2016; Souza et al., 2016; Sun et al., 2020). Embora existam estudos com milho comum nesse sentido, em uma busca nos periódicos publicados em meio digital, não foram encontrados trabalhos com investigação sobre o patossistema *Fusarium* x milho-pipoca e os efeitos da aplicação de N.

Kang e Gorman (1989), já afirmavam que os efeitos da interação genótipo x ambiente seriam um desafio para o melhoramento de plantas. Ainda hoje, esse desafio posto, exige dos melhoristas, o conhecimento e aplicação de técnicas de seleção cada vez mais precisas na escolha de genótipos mais adaptados para múltiplas condições. Os resultados deste estudo mostraram que, devido a significativa interação entre genótipo x nível de N na ocorrência de FER, houve diferença na composição dos grupos de linhagens com maior potencial de resistência nos ambientes. Em cada ambiente, foi possível agrupar 5 linhagens com maior resistência de modo que apenas L80 e L294 apresentaram menor SvFER nas duas condições de aplicação de N.

Embora as linhagens ainda não sejam a cultivar a ser registrada para comercialização, a escolha de linhagens parentais com elevada resistência a FER é uma estratégia vantajosa para o desenvolvimento de híbridos resistentes (Stagnati et al., 2020; Almeida et al., 2021).

Para maior parte das genealogias, não houveram linhagens com médias agrupadas no grupo de menor severidade. No entanto, isso não dá condições para afirmar se essas genealogias são ou não de interesse para exploração de alelos de resistência uma vez que o número de linhagens de cada uma dessas genealogias

bem como o método de obtenção das mesmas não garante que esse pequeno grupo de linhagens seja representativo de suas populações de origem.

É importante considerar também que devido a possíveis efeitos gênicos não aditivos envolvidos na expressão da resistência, podem haver linhagens que mesmo não apresentando médias inferiores para podridão, quando em combinação podem produzir híbridos com menores severidades da doença. Isso reforça a importância dos estudos desse germoplasma quando em combinação para assim complementar a informação acerca do potencial de contribuição para alelos de resistência.

Por outro lado, pelo menos uma dentre as linhagens das genealogias IAC 125, PARA 172, URUG 298, Barão de Viçosa, SE 013, PA 170 Roxo e Viçosa, apresentaram valores de SvFER abaixo de 30% em pelo menos uma das condições de aplicação de nitrogênio. Isso é suficiente para entender que essas genealogias são prováveis fontes de alelos de resistência a FER.

As populações IAC 125, Barão de Viçosa e Viçosa fora desenvolvidas no Brasil e são resultados de trabalhos de melhoramento. A população IAC 125 foi obtida de um híbrido triplo intervarietal (híbrido simples x variedade) pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. Esse híbrido foi lançado em 2006, ocasião em que foi recomendado para as principais regiões produtoras de milho-pipoca do sul do Brasil (IAC, 2006).

A população Barão de Viçosa, chamada também de UFVM 2, foi desenvolvida a partir de germoplasma norte americano adaptado para regiões de cultivo no Centro-Oeste do Brasil, onde foi plantado por vários anos (UFV, 2001).

A respeito das populações SE 013 e PA 170 Roxo, não foram encontradas informações precisas sobre o processo de desenvolvimento da sua base genética, mas as informações de passaporte no banco de germoplasma reportam que essas populações são oriundas das regiões sul do Brasil, próximo à fronteira com o Paraguai.

Ainda, de acordo com os dados de passaporte do Cimmyt, a população PARA 172 é um germoplasma do Paraguai, coletado em pequenas propriedades rurais, e descrito como potencial fonte de resistência para podridão de espiga (CIMMYT, 2012). Assim, os resultados corroboram com essa informação, dado que a linhagem L274, extraída dessa população, apresentou menor nível de SvFER nas duas condições de aplicação de N.

Apesar do conhecimento sobre a importância da seleção para resistência a FER durante o processo de obtenção de linhagens, estudos sobre a capacidade combinatória dessas linhagens que apresentaram baixa severidade de podridão serão importantes a fim de entender o grau de associação entre a resposta a doenças nas linhagens e a resposta dos híbridos nas diferentes condições de aplicação de N.

Quando o objetivo do programa de melhoramento for desenvolver cultivares mais resistentes para ambientes com baixa disponibilidade de N, recomenda-se que durante o desenvolvimento de linhagens, a seleção para resistência a doenças seja realizada também sob reduzida aplicação de N.

Além do empenho em aumentar a resistência a doenças nas cultivares, os melhoristas de milho-pipoca deverão se atentar principalmente com a capacidade de expansão e a produtividade dos grãos, principais caracteres de interesse da cultura. Nesse sentido, para o painel de linhagens avaliado, as linhagens da população IAC 125 podem ser uma boa opção para desenvolvimento de híbridos, uma vez que, já foram também indicadas como parentais potenciais no trabalho de Santos et al. (2017).

3.2.6 CONCLUSÕES

A quantidade de nitrogênio aplicado afeta a severidade de podridão de espiga por *Fusarium* em linhagens endogâmicas de milho-pipoca. A maior parte das linhagens com potencial de resistência foram extraídas de populações do Sul do Brasil e do Paraguai.

As linhagens L80, L215, L274, L294 e L330 podem ser exploradas como fontes de alelos favoráveis para resistência a FER em condições de aplicação integral da quantidade recomendada de nitrogênio (150 kg N ha^{-1}).

As linhagens L80, L294, L395, L476, L510 e L656 podem ser exploradas como fontes de alelos favoráveis para resistência a FER em condições de reduzida aplicação da quantidade de nitrogênio, ou baixa disponibilidade de nitrogênio no solo (61 kg N ha^{-1}).

As linhagens L80 e L294 poderão ser exploradas como fonte de resistência à podridão de espiga para condições de baixa ou integral aplicação de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2011) Resolução de Diretoria Colegiada Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011: Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Ministério da Saúde, Brasil.
- Alam, M.A, Seetharam, K., Zaidi, P., Dinesh, A., Vinayan, M.T., Nath, K. (2017) Dissecting heat stress tolerance in tropical maize (*Zea mays* L). *Field Crops Research*, 204:110-119.
- Aljbory, Z., Chen, M.S. (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 25(1):2-23.
- Almeida, F., Rodrigues, M.L., Coelho, C. (2019) The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology*, 10:214.
- Almeida, R.N., Vivas, M.V., Santos Junior, D.R., Saluci, J.C.G., Carlos, M.C., Santos, J.S., Amaral Júnior, A.T., Scapim, C.A. (2021) Combining abilities analysis for ear rot resistance in popcorn hybrids development. *Revista Ceres*, 68(1): 61-70. <https://doi.org/10.1590/0034737X2021-68010008>
- Amaral Filho, J.P.R.D., Fornasieri Filho, D., Farinelli, R., Barbosa, J.C. (2005). Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29: 467-473.
- Amaral Junior, A.T.D., Freitas, I.L.D.J., Guimarães, A.G., Maldonado, C., Arriagada, O., Mora, F. (2016a) Bayesian analysis of quantitative traits in popcorn (*Zea*

- mays L.) through four cycles of recurrent selection. *Plant Production Science*, 19(4):574-578. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2016.1222870>
- Amaral Júnior, A.T.D., Gonçalves, L.S.A., Freitas Júnior, S.D.P., Candido, L.S., Vittorazzi, C., Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Silva, T.R.C., Pereira, M.G., Scapim, C.A., Viana, A.P., Carvalho, G. F. D. (2013) UENF 14: a new popcorn cultivar. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13:218-220.
- Araújo, L.A.N.D., Ferreira, M.E., Cruz, M.C.P.D. (2004) Adubação nitrogenada na cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:771-777.
- Asibi, A.E., Chai, Q., A Coulter, J. (2019) Mechanisms of nitrogen use in maize. *Agronomy*, 9(12):775. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy9120775>
- Atukwase, A., Kaaya, A.N., Muyanja, C. (2012) Dynamics of Fusarium and fumonisins in maize during storage—a case of the traditional storage structures commonly used in Uganda. *Food Control*, 26(1): 200-205. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.016>.
- Ayub, M., Nadeem, M.A., Sharar, M.S., Mahmood, N. (2002) Response of maize (*Zea mays* L.) fodder to different levels of nitrogen and phosphorus. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1(4):352-354.
- Balanagouda, P., Sridhara, S., Shil, S., Hegde, V., Naik, M. K., Narayanaswamy, H., Balasundram, S. K. (2021) Assessment of the Spatial Distribution and Risk Associated with Fruit Rot Disease in Areca catechu L. *Journal of Fungi*, 7(10):797. <https://doi.org/10.3390/jof7100-797>.
- Beale, J.W., Windels, C.E., Kinkel, L.L. (2002) Spatial distribution of *Aphanomyces cochlioides* and root rot in sugar beet fields. *Plant disease*, 86(5): 547-551.
- Blacutt, A.A., Gold, S.E., Voss, K.A., Gao, M., Glenn, A.E. (2018) *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology*, 108(3): 312-326. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW>.
- Bowman, W. D., Cleveland, C. C., Halada, L., Hreško, J., Baron, J. S. (2008) Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. *Nature Geoscience*, 1(11): 767-770.

- Buskirk, J. V., Willi, Y. (2006) The change in quantitative genetic variation with inbreeding. *Evolution*, 60(12): 2428-2434.
- Butoto, E.N., Marino, T.P., Holland, J.B. (2021) Effects of artificial inoculation on trait correlations with resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Science*, 61(4): 2522-2533. <https://doi.org/10.1002/csc2.20551>
- Butrón, A., Santiago, R., Cao, A., Samayoa, L.F., Malvar, R.A. (2019) QTLs for resistance to fusarium ear rot in a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) maize population. *Plant disease*, 103(5): 897-904. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1669-RE>.
- Cabral, P.D.S., Amaral Júnior, A.T., Pio Viana, A., Duarte Vieira, H., Jesus Freitas, I.L., Vittorazzi, C., Vivas, M. (2015) Combining ability between tropical and temperate popcorn lines for seed quality and agronomic traits. *Australian Journal of Crop Science*, 9(4): 256-263.
- Cámara Argentina de Maíz Pisingallo - CAMPI. (2021) Statistics – Argentine Pisingallo Exports. http://popchamber.com.ar/?page_id=140&lang=en.
- Capretz, R.L., Batista, J.L.F., Sotomayor, J.F.M., Cunha, C.R.D., Nicoletti, M. F., Rodrigues, R.R. (2012) Padrão espacial de quatro formações florestais do estado de São Paulo, através da função K de Ripley. *Ciência Florestal*, 22: 551-565.
- Carbas, B., Simões, D., Soares, A., Freitas, A., Ferreira, B., Carvalho, A.R., Silva, A.S., Pinto, T., Diogo, E., Andrade, E., Brites, C. (2021) Occurrence of *Fusarium* spp. in Maize Grain Harvested in Portugal and Accumulation of Related Mycotoxins during Storage. *Foods*, 10(2): 375. <https://doi.org/10.3390/foods10020375>.
- Carena, M.J. (2009) *Handbook of plant breeding: Cereals*. 3. ed. Alemanha: Springer Science & Business Media, 430p. doi: 10.1007/978-0-387-72297-9
- Carena, M.J.; Hallauer, A.R. (2001) Expression of heterosis in Leaming and Midland Corn Belt dent populations. *Journal of the Iowa Academy of Science: JIAS*, 108(3): 73-78.
- Carena, Marcelo J.; Hallauer, Arnel R.; Miranda Filho, J.B. (2010) *Handbook of Plant Breeding: Quantitative genetics in maize breeding*. 3. ed. Nova York,

Estados Unidos: Springer-Verlag New York, 664p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0766-0>

Ceccarelli S., Grando S., Maatougui M., Michael M., Slash M., Haghparast R., Rahmanian M., Taheri A., Al-Yassin A., Benbelkacem A., Labdi M., Minoun H., Nachit M. (2010) Plant breeding and climate changes. *Journal of Agricultural Science*, 148: 627-637. <https://doi:101017/S00218596-10000651>

Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo - CIMMYT (1994) *Managing trials and reporting data for CIMMYT's international maize testing program*. Mexico, Cimmyt, 23p. <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/697?show=full>.

Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo - CIMMYT (2012) *Cimmyt bank passport information: CIMMYTMA 4157*. <https://doi.org/1018730/GCFPQ>.

Chancellor International AgriBusiness (2021) *Portifólio: Popcorn*. <https://agribusiness.chancellor.com.br/popcorn/>

Chapman, S.C., Chakraborty, S., Dreccer, M.F., Howden, S.M. (2012) Plant adaptation to climate change—opportunities and priorities in breeding. *Crop and Pasture Science*, 63(3): 251-268.

Clements, M.J., Kleinschmidt, C.E., Maragos, C.M., Pataky, J.K., White, D.G. (2003) Evaluation of inoculation techniques for Fusarium ear rot and fumonisin contamination of corn. *Plant Disease*, 87(2): 147-153.

Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, Brasil (2021) *Pesquisa – preços agrícolas, da sociobio e da pesca*. <http://sisdep.conab.gov.br/precosiagroweb/>.

Conceição Silva, T.R., Amaral Júnior, A.T., Almeida Filho, J.E., Freitas, M.S. M., Guimarães, A.G., Kamphorst, S.H. (2019) Contrasting phosphorus environments as indicators for popcorn breeding lines. *Functional Plant Breeding Journal*, 1(1): 1-15. <http://dx.doi.org/10.35418/2526-4117/v1n1a1>.

Crossa, J., Pérez-Rodríguez, P., Cuevas, J., Montesinos-López, O., Jarquín, D., Los Campos, G., Burgueño, J., González-Camacho, J.M., Pérez-Elizalde, S., Bayene, Y., Dreisigacker, S., Singh, R., Zhang, X., Gowda, M., Roorkiwal, J., Varshney, R. K. (2017). Genomic selection in plant breeding: methods, models,

and perspectives. *Trends in Plant Science*, 22(11): 961-975.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.011>.

Czembor E., Waśkiewicz A., Piechota U., Puchta M., Czembor J.H., Stepień L. (2019) Differences in ear rot resistance and *Fusarium verticillioides*-produced fumonisin contamination between Polish currently and historically used maize inbred lines. *Frontiers in Microbiology*. 10: 449. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00449>.

Da Costa, R.V., Cota, L., Da Rocha, L.M.P., Nolasco, A., Da Silva, D.D., Parreira, D., Ferreira, P. (2010) Recomendação de cultivares de milho para a resistência a grãos ardidos. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.

Daros, M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G. (2002) Genetic gain for grain yield and popping expansion in full-sib recurrent selection in popcorn. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2(3), 339-344.

Daros, M., Amaral Júnior, A.T.D., Pereira, M.G., Santos, F.S., Gabriel, A.P.C., Scapim, C.A., Freitas Júnior, S.P., Silvério, L. (2004). Recurrent selection in inbred popcorn families. *Scientia Agricola*, 61: 609-614.

Devadas, S.K., Enyedi, A., Raina, R. (2002) The Arabidopsis hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal*, 30(4): 467-480.

Dhital, S.; Raun, W.R. (2016) Variability in optimum nitrogen rates for maize. *Agronomy Journal*, 108(6): 2165-2173.

Di Domenico, A.S., Christ, D., Hashimoto, E.H., Busso, C., Coelho, S.R.M. (2015) Evaluation of quality attributes and the incidence of *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. in different types of maize storage. *Journal of Stored Products Research*, 61:59-64.

Diggle, P. (1983) *Statistical analysis of spatial point patterns*. Londres, Academic Press, 272 p.

Ding, J.Q., Wang, X.M., Chander, S., Yan, J. B., Li, J.S. (2008) QTL mapping of resistance to *Fusarium* ear rot using a RIL population in maize. *Molecular breeding*, 22(3): 395-403.

- Dodig, D., Bozinovic, S., Nikolic, A., Zoric, M., Vancetovic, J., Ignjatovic, D., Delic N., Welgelt-Fischer, K., Junker, A., Altmann, T. (2019) Image-derived traits related to mid-season growth performance of maize under nitrogen and water stress. *Frontiers in Plant Science* 10: 814 <https://doi:10.3389/fpls.2019.00814>.
- Dos Anjos, A.D., Mazza, M.C.M., Santos, A.C.M.C., Delfini, L.T. (2004) Análise do padrão de distribuição espacial da araucária (*Araucaria angustifolia*) em algumas áreas no Estado do Paraná, utilizando a função K de Ripley. *Scientia Forestalis*, 66: 38-45.
- Duncan, K.E., Howard, R.J. (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 1 [https://doi:10-1094/MPMI-23-1-0006](https://doi:10.1094/MPMI-23-1-0006).
- Duvick, D.N. (2001) Biotechnology in the 1930s: the development of hybrid maize. *Nature Reviews Genetics*, 2(1): 69-74.
- Eickhout, B., Van Bouwman, A.F., Van Zeijts, H. (2006) The role of nitrogen in world food production and environmental sustainability. *Agriculture, ecosystems & environment*, 116(1-2): 4-14.
- Ekwomadu, T.I., Gopane, R.E., Mwanza, M. (2018) Occurrence of filamentous fungi in maize destined for human consumption in South Africa. *Food science & nutrition*, 6(4): 884-890.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. (1989) *Introduction to Quantitative Genetics*. 4. ed. Jhon Wiley & Sons, New York. 448 p.
- Faria Junior, C.A., Freitas, P.S.L., Dallacort, R., Mito, L.S., Barbieri, J.D. (2020). Agricultural zoning of popcorn corn for the state of Mato Grosso, Brazil. *Applied Research & Agrotechnology*, 13: e6449.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A. (2021) *ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs. (Portugues)*. R package version 1.2.1. <https://www.CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>.
- Ferrigo, D., Mondin, M., Ladurner, E., Fiorentini, F., Causin, R., Raiola, A. (2020). Effect of seed biopriming with *Trichoderma harzianum* strain INAT11 on *Fusarium* ear rot and *Gibberella* ear rot diseases. *Biological Control*, 147: 104286.

- Ferro R.N., Brichette, I., Evgenidis G., Karamaligkas, C., Moreno-González, J. (2007) Variability in European maize (*Zea mays* L) landraces under high and low nitrogen inputs. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 54: 295-308. <https://doi:101007/s10722-005-4500-x>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (2021). *Tridge – trading plataforma websites*. <https://www.tridge.com/intelligences/-popcorn-snack/export>.
- Freitas Júnior, S.D.P., Amaral Júnior, A.T., Rangel, R.M., Viana, A.P. (2009) Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9(1): 1-7.
- Freitas, A.S., Pozza, E.A., Alves, M.C., Coelho, G., Rocha, H.S., Pozza, A.A.A. (2016) Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot correlated with soil fertility and plant nutrition. *Precision Agriculture*, 17(1): 93-107.
- Freitas, I.L.J., Amaral Júnior, A.D., Freitas Júnior, S.P., Cabral, P.D.S., Ribeiro, R.M., Gonçalves, L.S.A. (2014). Genetic gains in the UENF-14 popcorn population with recurrent selection. *Genetics and Molecular Research*, 13(1): 518-527.
- Gabriel, L.C., Pereira, C.B., Bavia, G.P., Coan, M., Donel, A.A., Tessmann, D.J., Scapim, C.A. (2018) Avaliação da resistência de genótipos de milho pipoca ao acúmulo de fumonisinas e à podridão de fusarium da espiga. *Summa Phytopathologica*, 44: 286-288.
- Gai, X., Dong, H., Wang, S., Liu, B., Zhang, Z., Li, X., Gao, Z. (2018) Infection cycle of maize stalk rot and ear rot caused by *Fusarium verticillioides*. *PLoS One*, 13(7): e0201588.
- Gaikpa, D. S., Kessel, B., Presterl, T., Ouzunova, M., Galiano-Carneiro, A. L., Mayer, M., Melchinger, A.E., Schön, C.C., Miedaner, T. (2021) Exploiting genetic diversity in two European maize landraces for improving *Gibberella* ear rot resistance using genomic tools. *Theoretical and Applied Genetics*: 134(3): 793-805.
- Ge, C., Tang, C., Zhu, Y.X., Wang, G.F. (2021a) Genome-wide identification of the maize 2OGD superfamily genes and their response to *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum*. *Gene*, 764: 145078.

- Ge, Y., Pu, Y., Sun, M. (2021b). Alternative measure of border effects across regions: Ripley's K-function method. *Papers in Regional Science*, 100(1): 287-302.
- Gerhardt, I.F.S., Amaral Junior, A.T., Ferreira Pena, G., Moreira Guimarães, L.J., Lima, V.J., Vivas, M., Santos, P.H.A.D., Ferreira, F.R.A., Freitas, M.S.M., Kamphorst, S.H. (2019) Genetic effects on the efficiency and responsiveness to phosphorus use in popcorn as estimated by diallel analysis. *PLoS one*, 14(5): e0216980.
- Gil, J.D.B., Reidsma, P., Giller, K., Todman, L., Whitmore, A., Van Ittersum, M. (2019) Sustainable development goal 2: Improved targets and indicators for agriculture and food security. *Ambio*, 48: 685-698 <http://doi:10.1007/s13280-018-1101-4>
- Gomes, P.F.P. (1970) An extension of the method of joint analysis of experiments in complete randomized blocks. *Biometrics*, 14: 521-26.
- Gomes, P.F.P., Guimarães, R.F. (1958) Joint analysis of experiments in complete randomized blocks with some common treatments. *Biometrics*, 14(4): 521-526. <https://www.jstor.org/stable/2527518>
- Guimarães, A.G. (2016) *Ganhos genéticos por seleção recorrente e estreitamento genético na população UENF 14 de milho pipoca por marcadores SSR-ESTs*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 89p.
- Guimarães, R.A., Zanotto, E., Perrony, P.E.P., Zanotto, L.A.S., Silva, L.J., Machado, J.D.C., Pinto, F.A.M.F., Medeiros, H.N., Von Pinho, R.G., Melo, I.S., Silva, J.C.P., Medeiros, F.C.L., Medeiros, F.H.V. (2021) Integrating a chemical fungicide and *Bacillus subtilis* B10UFLA2 ensures leaf protection and reduces ear rot (*Fusarium verticillioides*) and fumonisin content in maize. *Journal of Phytopathology*, 169(3): 139-148.
- Guo, T., Li, H., Yan, J., Tang, J., Li, J., Zhang, Z., Zhang, L., Wang, J. (2013) Performance prediction of F1 hybrids between recombinant inbred lines derived from two elite maize inbred lines. *Theoretical and applied genetics*, 126(1): 189-201.

- Guo, Z., Zou, C., Liu, X., Wang, S., Li, W. X., Jeffers, D., Fan, X., Xu, M., Xu, Y. (2020) Complex genetic system involved in fusarium ear rot resistance in maize as revealed by GWAS, bulked sample analysis, and genomic prediction. *Plant disease*, 104(6): 1725-1735.
- Gxasheka, M., Wang, J., Gunya, B., Mbanjwa, V., Tyasi, T. L., Dlamini, P., Gao, J. (2021) In vitro effect of some commercial fungicides on mycelial growth of Fusarium species causing maize ear rot disease in China. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(11-12): 557-569.
- Heck, D.W., Dita, M., Ponte, E.M.D., Mizubuti, E.S. (2021) Incidence, Spatial Pattern and Temporal Progress of Fusarium Wilt of Bananas. *Journal of Fungi*, 7(8): 646.
- Henne, D.C., Workneh, F., Rush, C.M. (2012) Spatial patterns and spread of potato zebra chip disease in the Texas Panhandle. *Plant Disease*, 96(7): 948-956.
- Holland, J.B., Marino, T.P., Manching, H.C., Wisser, R.J. (2020) Genomic prediction for resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Science*, 60(4): 1863-1875.
- Horne, D.W., Eller, M.S., Holland, J.B. (2016) Responses to recurrent index selection for reduced Fusarium ear rot and lodging and for increased yield in maize. *Crop Science*, 56(1): 85-94.
- Howden, S.M., Soussana, J.F., Tubiello, F.N., Chhetri, N., Dunlop, M., Meinke, H. (2007) Adapting agriculture to climate change. *PNAS*, 104(50): 19691-19696. <http://doi/101073/pnas0701890104>
- Huang, T., Jander, G., De Vos, M. (2011) Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry*, 72(13): 1531-1537.
- Hung, H., Holland, J.B. (2012) Diallel analysis of resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Science*, 52(5): 2173-2181.
- Hurni, S., Scheuermann, D., Krattinger, S. G., Kessel, B., Wicker, T., Herren, G., Fitze, M.N., Breen, J., Presterl, T., Ouzunova, M., Keller, B. (2015) The maize disease resistance gene Htn1 against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(28): 8780-8785.

- Instituto Agronômico de Campinas - IAC (2006) *Cultivares de Milho IAC 125 Milho Pipoca híbrido*. <https://www.iacsp.gov.br/areasdepesquisa-/graos/milho.php>
- Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (2021). Brasil. Dados da Estação Meteorológica A607 – Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. <https://mapas.inmet.gov.br/>.
- Johannsen, W. (1911) The genotype conception of heredity. *The American Naturalist*, 45(531): 129-159.
- Johnson, E.T., Proctor, R.H., Dunlap, C.A., Busman, M. (2018) Reducing production of fumonisin mycotoxins in *Fusarium verticillioides* by RNA interference. *Mycotoxin research*, 34(1): 29-37.
- Jumbo, M. B. (2011) Comparison of conventional, modified single seed descent, and doubled haploid breeding methods for maize inbred line development using GEM breeding crosses. *Crop Science*, 51:1534–1543.
- Kamphorst, S.H., Amaral Júnior, A.T.D., Lima, V.J.D., Guimarães, L.J.M., Schmitt, K.F.M., Leite, J.T., Santos, P.H.A.D, Moura, M., Mafra, G.S., Santos Júnior, D.R., Cruz, C.D., Campostrini, E. (2019) Can genetic progress for drought tolerance in popcorn be achieved by indirect selection? *Agronomy*, 9(12): 792.
- Kamphorst, S.H., de Lima, V.J., Schmitt, K.F.M., Leite, J.T., Azeredo, V.C., Pena, G.F., Santos, P.H.A.D., Santos Júnior, D.R., Silva Júnior, S.B., Bispo, R.B., Santos, T.O., Khan, S., Amaral Junior, A.T. (2018b). Water stress adaptation of popcorn roots and association with agronomic traits. *Genetics and Molecular Research*, 17(3): gmr18078.
- Kamphorst, S.H., Gonçalves, G.M.B., Amaral Júnior, A.T.D., Lima, V.J. D., Schmitt, K.F.M., Leite, J.T., Azeredo, V.C., Gomes, L.P., Silva, J.G.S., Carvalho, C.M., Mafra, G.S., Dhaer, R.F., Campostrini, E. (2021) Supporting physiological trait for indirect selection for grain yield in drought-stressed popcorn. *Plants*, 10(8): 1510.
- Kamphorst, S.H., Gonçalves, G.M.B., Amaral Júnior, AT. D., Lima, VJ. D., Leite, J.T., Schmitt, K.F.M., Santos Júnior, D.R., Santos, J.S., Oliveira, F.T., Corrêa, C.C.G., Rodrigues, W.P., Campostrini, E. (2020) Screening of Popcorn Genotypes for Drought Tolerance Using Canonical Correlations. *Agronomy*, 10(10): 1519.

- Kamphorst, S.H., Lima, V.J., Amaral Júnior, A.T., Schmitt, K.F.M., Leite, J.T., Carvalho, C.M., Silva, R.M.R., Xavier, K.B., Ferreira, F.R.A., Santos, P.H.A.D., Campostrini, E. (2018a). Popcorn breeding for water-stress tolerance or for agronomic water-use efficiency. *Genetic and Molecular Research*, 17(4): gmr18184.
- Kang, M.S., Gorman, D.P. (1989) Genotype x Environment Interaction in Maize. *Agronomy Journal*, 81:662-664. <https://doi.org/10.2134/agronj19890002-1962008100040020x>
- Kanter, D.R., Bartolini, F., Kugelberg, S., Leip, A., Oenema, O., Uwizeye, A. (2020) Nitrogen pollution policy beyond the farm. *Nature Food*, 1(1): 27-32.
- Khan, S., Amaral Júnior, A.T.D., Ferreira, F.R.A., Kamphorst, S.H., Gonçalves, G.M.B., Freitas, M.S.M., Silveira, V., Souza Filho, G.A., Teixeira do Amaral, J.F., Smith, R.E.B., Khalil, I.H., Vivas, J.M.S., Souza, Y.P., Alves Peçanha, D. (2020) Limited Nitrogen and Plant Growth Stages Discriminate Well Nitrogen Use, Uptake and Utilization Efficiency in Popcorn. *Plants*, 9(7): 893.
- Kim, H., Woloshuk, C.P. (2008) Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6): 947-953.
- Kuki, M.C., Pinto, R.J.B., Bertagna, F.A.B., Tessmann, D.J., Teixeira do Amaral, A., Scapim, C.A., Holland, J.B. (2020) Association mapping and genomic prediction for ear rot disease caused by *Fusarium verticillioides* in a tropical maize germplasm. *Crop Science*, 60(6): 2867-2881.
- Kurosawa, R.N., Vivas, M., Júnior, A.T.A., Santos, A., Mafra, G.S., Guimarães, A.G., Schwantes, I.A. (2016) Reaction of popcorn germplasm to polysora rust under field conditions and natural inoculation. *Tropical Plant Pathology*, 41(6): 415-422.
- Kurosawa, R.N.F., Amaral Junior, A.T., Vivas, J.M.S., Guimarães, A.G., Miranda, S.B., Dias, V.M., Scapim, C.A. (2017) Potential of popcorn germplasm as a source of resistance to ear rot. *Bragantia*, 76: 378-385 doi:10.1590/1678-4499178
- Kurosawa, R.N.F., Amaral Junior, A.T., Vivas, M.; Almeida, R.N., Vivas, J.M.S., Lima, V.J., Silveira, S.F. (2021) Diallel analysis for resistance to northern leaf

- blight in popcorn under contrasting nitrogen availability. *Agronomy Journal*, 113(2): 1029-1038 agj220590-10. <https://doi.org/10.1002/agj-220590>
- Lamkey, K.R., Schnicker, B.J., Melchinger, A.E. (1995) Epistasis in an elite maize hybrid and choice of generation for inbred line development. *Crop science*, 35(5): 1272.
- Lan, G., Zhu, H., Cao, M., Hu, Y., Wang, H., Deng, X., Zhou, S., Cui, J., Huang, J., He, Y., Liu, L., Xu, H., Song, J. (2009) Spatial dispersion patterns of trees in a tropical rainforest in Xishuangbanna, southwest China. *Ecological Research*, 24(5): 1117-1124.
- Lanubile, A., Borrelli, V.M.G., Soccio, M., Giorni, P., Stagnati, L., Busconi, M., Marocco, A. (2021) Loss of ZmLIPOXYGENASE4 Decreases Fusarium verticillioides Resistance in Maize Seedlings. *Genes*: 12(3), 335.
- Lanubile, A., Maschietto, V., Borrelli, V.M., Stagnati, L., Logrieco, A.F., Marocco, A. (2017) Molecular basis of resistance to Fusarium ear rot in maize. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1774.
- Leite, J.T., Amaral Junior, A.T.D., Kamphorst, S.H., Lima, V.J.D., Santos Junior, D.R.D., Schmitt, K.F.M., Souza, Y.P., Santos, T.O., Bispo, R.B., Mafra, G.S., Campostrini, E., Rodrigues, W.P. (2021). Water use efficiency in popcorn (*Zea mays* L. var. everta): which physiological traits would be useful for breeding? *Plants*, 10(7): 1450.
- Leyva-Madriral, K.Y., Larralde-Corona, C.P., Apodaca-Sánchez, M.A., Quiroz-Figueroa, F.R., Mexia-Bolaños, P.A., Portillo-Valenzuela, S., Ordaz-Ochoa, J., Maldonado-Mendoza, I.E. (2015). Fusarium species from the Fusarium fujikuroi species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Phytopathology*, 163(6): 486-497.
- Likhayo, P., Bruce, A.Y., Tefera, T., Mueke, J. (2018) Maize grain stored in hermetic bags: Effect of moisture and pest infestation on grain quality. *Journal of Food Quality*. <https://doi.org/10.1155/2018/2515698>.
- Lima, R.; Borém, A. (2018) *Melhoramento de Milho*. 1, ed. Editora UFV. 396p.
- Lima, V.J.D., Amaral Júnior, A.T.D., Kamphorst, S.H., Bispo, R.B., Leite, J.T., Santos, T.O., Smith, K.F.M., Chaves, M.M., Oliveira, U.A., Santos, P.H.A.D., Gonçalves, G.M.B., Khan, S., Guimarães, L.J.M. (2019) Combined dominance

and additive gene effects in trait inheritance of drought-stressed and full irrigated popcorn. *Agronomy*, 9(12), 782.

Lione, G., Gonthier, P. (2016) A permutation-randomization approach to test the spatial distribution of plant diseases. *Phytopathology*, 106(1): 19-28.

Liu, X., Zhang, Y., Han, W., Tang, A., Shen, J., Cui, Z., Vitousek, P., Erisman, J.W., Goulding, K., Christie, P., Fangmeier, A., Zhang, F. (2013). Enhanced nitrogen deposition over China. *Nature*, 494(7438): 459-462.

Liu, Y., Hu, G., Zhang, A., Loladze, A., Hu, Y., Wang, H., Qu, J., Zhang, X., Olsen, M., Vicente, F.S., Crossa, J., Lin, F., Prasanna, B.M. (2021) Genome-wide association study and genomic prediction of Fusarium ear rot resistance in tropical maize germplasm. *The Crop Journal*, 9(2): 325-341.

Löffler, M., Kessel, B., Ouzunova, M., Miedaner, T. (2010) Population parameters for resistance to Fusarium graminearum and Fusarium verticillioides ear rot among large sets of early, mid-late and late maturing European maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(5): 1053-1062.

López-Castillo, L.M., Silva-Fernández, S.E., Winkler, R., Bergvinson, D.J., Arnason, J.T., García-Lara, S. (2018) Postharvest insect resistance in maize. *Journal of Stored Products Research*, 77: 66-76 <http://doi:10-1016/jjspr201803004>

Lü, F.L., Hou, M.M., Zhang, H.T., Khan, A., Ayaz, M., Qiangjiu, C., Hu, C., Yang, X., Sun, B., Zhang, S.L. (2019) Closing the nitrogen use efficiency gap and reducing the environmental impact of wheat-maize cropping on smallholder farms in the Guanzhong Plain, Northwest China. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1): 169-178.

Luo, M., Zhao, Y., Weisong Zhang, R., Su, A., Li, C., Wang, X., Xing, J., Shi, Z., Zhao, J. (2017) Effect of saline stress on the physiology and growth of maize hybrids and their related inbred lines. *Maydica*, 62.

Maekawa, S., Sato, T., Asada, Y., Yasuda, S., Yoshida, M., Chiba, Y., Yamaguchi, J. (2012) The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. *Plant Molecular Biology*, 79(3): 217-227.

Mafra, G.S., Amaral Júnior, A.T.D., Almeida Filho, J.E.D., Vivas, M., Santos, P. H.A.D., Santos, J.S., Pena, G.F., Lima, V.J., Kamphorst, S.H., Oliveira, F.T.,

- Souza, Y.P., Shwantes, I.A., Santos, T.O... & Mora, F. (2019). SNP-based mixed model association of growth-and yield-related traits in popcorn. *PLoS One*, 14(6): e0218552.
- Mafra, G.S., Amaral, A.T.D., Vivas, M., Santos, J.S.D., Silva, F.H.D.L., Guimarães, A.G., Pena, G.F. (2018) The combining ability of popcorn S7 lines for Puccinia polysora resistance purposes. *Bragantia*, 77: 519-526.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. (2003) Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 723-730.
- Mastrodomenico, A.T., Bohn, M.O., Lipka, A.E., Below, F.E. (2018) Genomic selection using maize ex-plant variety protection germplasm for the prediction of nitrogen-use traits. *Crop Science*, 59: 212-220 <https://doi:10.2135/cropsci2018060398>
- Mesterhazy, A., Lemmens, M., Reid, L.M. (2012) Breeding for resistance to ear rots caused by Fusarium spp. in maize—a review. *Plant Breeding*, 131(1): 1-19.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. (2011) *Instrução Normativa Nº61, de 22 de dezembro de 2011*. Regulamento Técnico do Milho Pipoca. Brasil, 10p.
- Mooney, C. Z. (1997) *Monte carlo simulation*. vol. 116. Sage. 37p.
- Morales, L., Marino, T.P., Wenndt, A.J., Fouts, J.Q., Holland, J.B., Nelson, R.J. (2018) Dissecting symptomatology and fumonisin contamination produced by Fusarium verticillioides in maize ears. *Phytopathology*, 108(12): 1475-1485.
- Morris, M., Dreher, K., Ribaut, J.M., Khairallah, M. (2003) Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. *Molecular Breeding*, 11(3): 235-247.
- Mu, X., Chen, Y. (2021) The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158: 76-82.
- Mueller, D. S., et al. (2016) Corn yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada from 2012 to 2015. *Plant Health Progress*, 17(3): 211-222.

- Mur, L.A., Prats, E., Pierre, S., Hall, M. A., Hebelstrup, K.H. (2013) Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science*, 4: 215.
- Mur, L.A., Simpson, C., Kumari, A., Gupta, A.K., Gupta, K.J. (2016) Moving nitrogen to the center of plant defense against pathogens. *Annals of Botany*, 119: 703–709 <http://doi:101093/aob/mcw179>.
- Narro, T., Medina, A., Vencovsky, R. (2017) Selección para incrementar rendimiento y resistencia a pudrición de mazorca en maíz amiláceo. *Arch. Académicos USFQ*, 9: 65.
- Ndoungué Djeumekop, M.M., Ngo Bieng, M.A., Ribeyre, F., Bonnot, F., Cilas, C., Neema, C., Ten Hoopen, G.M. (2021) Spatial and temporal analysis of *Phytophthora megakarya* epidemic in newly established cacao plantations. *Plant Disease*, PDIS-09.
- Nirenberg, H.I., O'donnell, K. (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3): 434-458.
- Parentoni SN, Souza Junior CL, Carvalho Alves VM, Gama EEG, Coelho AM, Oliveira AC, Guimarães PEO, Guimarães CT, Vasconcelos MJV, Patto Pacheco CA, Meirelles WF, Magalhães JV, Moreira Guimarães LJ, Silva AR, Ferreira Mendes F, Schaffert RE (2010) Inheritance and breeding strategies for phosphorus efficiency in tropical maize (*Zea mays* L). *Maydica*, 55: 1-15.
- Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T. (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. *Crop breeding and Applied Biotechnology*, 1(1): 3-10.
- Poffenbarger, H.J., Sawyer, J.E., Barker, D.W., Olk, D.C., Six, J., Castellano, M.J. (2018) Legacy effects of long-term nitrogen fertilizer application on the fate of nitrogen fertilizer inputs in continuous maize. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 265: 544-555.
- Rangel, R.M., Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S.P. (2011) Association between agronomical traits and popping expansion in a popcorn population under recurrent selection. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(2): 225-233.

- Reid, L. M.; Zhu, X.; Ma, B. L. (2001) Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to gibberella (*Fusarium graminearum*) ear rot. *Plant and Soil*, 237(1): 1-14.
- Ribeiro, R.M., Amaral, A.T.D., Pena, G.F., Vivas, M., Kurosawa, R.N., Gonçalves, L.S.A. (2016). Effect of recurrent selection on the variability of the UENF-14 popcorn population. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, 123-131.
- Ribeiro, R.M., do Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Candido, L.S., Silva, T.R.C., Pena, G.F. (2012). Genetic progress in the UNB-2U population of popcorn under recurrent selection in Rio de Janeiro, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 1417-1423.
- Riedelsheimer, C., Technow, F., Melchinger, A.E. (2012) Comparison of whole-genome prediction models for traits with contrasting genetic architecture in a diversity panel of maize inbred lines. *BMC Genomics*, 13(1): 1-9.
- Ripley, B.D. (1977) Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 39(2): 172-192.
- Ripley, B.D. (1981). *Spatial Statistics*. 1. ed. Londres: John Wiley & Sons, Press. 267p.
- Rizzo, D.M., Whiting, E.C., Elkins, R.B. (1998) Spatial distribution of *Armillaria mellea* in pear orchards. *Plant Disease*, 82(11): 1226-1231.
- Robertson, L.A., Kleinschmidt, C.E., White, D.G., Payne, G.A., Maragos, C.M., Holland, J.B. (2006) Heritabilities and correlations of *Fusarium* ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Science*, 46(1): 353-361.
- Robertson-Hoyt, L.A., Jines, M.P., Balint-Kurti, P.J., Kleinschmidt, C.E., White, D.G., Payne, G.A., Maragos, C.M., Molnár, T.L., Holland, J. B. (2006) QTL mapping for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination resistance in two maize populations. *Crop Science*, 46(4): 1734-1743.
- Rossi, V., Scandolara, A., Battilani, P. (2009) Effect of environmental conditions on spore production by *Fusarium verticillioides*, the causal agent of maize ear rot. *European Journal of Plant Pathology*, 123(2): 159-169.

- Santiago, R., Cao, A., Malvar, R.A., Butrón, A. (2020) Genomics of maize resistance to Fusarium ear rot and fumonisina contamination. *Toxins*, 12(7): 431.
- Santos, A., Amaral Júnior, A.T., Kurosawa, R.N.F., Gerhardt, I.F.S., Fritsche Neto, R. (2017) GGE Biplot projection in discriminating efficiency of popcorn lines to use nitrogen. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(1): 22-31 <http://doi:101590/1413-70542017411030816>.
- Santos, A.D., Amaral Júnior, A.T., Kamphorst, S.H., Gonçalves, G.M.B., Santos, P.H.A.D., Vivas, J.M.S., Mafra, G.S., Khan, S., Oliveira, F.T., Schmitt, K.F.M., Santos Júnior, D.R., Mora, F. (2020). Evaluation of popcorn hybrids for nitrogen use efficiency and responsiveness. *Agronomy*, 10(4): 485.
- Santos, F.S., Amaral Júnior, A.T.D., Freitas Júnior, S.D.P., Rangel, R.M., Pereira, M.G. (2007) Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. *Bragantia*, 66: 389-396.
- Santos, J.S., Vivas, M., do Amaral Júnior, A.T., Ribeiro, R.M., Mafra, G.S., Pena, G.F. (2019) Gene effects from *Bipolaris maydis* incidence and severity on popcorn. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)*, 14(4): e5677.
- Santos, T.D.O., et al. (2021) Phenotyping Latin American Open-Pollinated Varieties of Popcorn for Environments with Low Water Availability. *Plants*, 10(6): 1211.
- Sassenrath, G.F., Schneider, J.M., Gaj, R., Grzebisz, W., Halloran, J.M. (2013) Nitrogen balance as an indicator of environmental impact: Toward sustainable agricultural production. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 28(3): 276-289.
- Schmitt, K.F.M., Lima, V.J., Amaral Júnior, A.T., Santos, J.S., Mafra, G.S., Vivas, M., Khamphorst, S.H., Souza, Y.P., Oliveira, F.T., Ferreira, F.R.A., Vivas, J.M.S. (2019) Combining ability of popcorn lines for resistance to the fungus *Puccinia polysora* (Pucciniaceae). *Genetics and Molecular Research*, 18: gmr18330.
- Schultz, J.C., Appel, H.M., Ferrieri, A., Arnold, T.M. (2013) Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers in Plant Science*, 4: 324.
- Schwantes, I.A., Amaral Júnior, A.T., Gerhardt, I.F.S., Vivas, M., Silva, F.H.D.L., Kamphorst, S.H. (2017) Diallel analysis of resistance to Fusarium ear rot in

- Brazilian popcorn genotypes. *Tropical Plant Pathology*, 42(2): 70-75
<http://doi:101007/s40858-017-0136-6>.
- Schwantes, I.A., Amaral, A.T.D., Vivas, M., Almeida, J.E.D., Kamphorst, S.H., Guimarães, A.G., Khan, S. (2018) Inheritance of resistance to Fusarium ear rot in popcorn. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18: 81-88.
- Scott, R.J., Knott, M. (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-512. <http://doi:102307/2529204>
- Shull, G.H. (1908) The composition of a field of maize. *Journal of Heredity*, 1: p. 296-301.
- Silva, E., Mora, E.A., Medina, A., Vásquez, J., Valdez, D., Danial, D.L., Parlevliet, J. E. (2007) Fusarium ear rot and how to screen for resistance in open pollinated maize in the Andean regions. *Euphytica*, 153(3): 329-337.
- Smale, M., Olwande, J. (2014) Demand for maize hybrids and hybrid change on smallholder farms in Kenya. *Agricultural Economics*, 45(4): 409-420.
- Small, I.M., Flett, B.C., Marasas, W.F.O., McLeod, A., Stander, M.A., Viljoen, A. (2012) Resistance in maize inbred lines to Fusarium verticillioides and fumonisin accumulation in South Africa. *Plant disease*, 96(6): 881-888.
- Smil, V. (1999) Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global biogeochemical cycles*. 13(2): 647-662.
- Souza, T.M., Bernd, L.P., Okumura, R.S., Takahashi, H.W., Ono, E.Y.S., Hirooka, E.Y. (2016) Nitrogen fertilization effect on chemical composition and contamination by fungal-fumonisin of maize kernels. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 11: 218-223. <http://doi:105039/agr-ariav11i3a5389>.
- Stagnati, L., Martino, M., Battilani, P., Busconi, M., Lanubile, A., Marocco, A. (2020) Development of early maturity maize hybrids for resistance to Fusarium and Aspergillus ear rots and their associated mycotoxins. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 13(4): 459-471. <http://103920/-WMJ20192554>.
- Stear, M.J., Bishop, S.C., Mallard, B.A., Raadsma, H. (2001) The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Research in Veterinary Science*, 71: 1-7. <http://doi:101053/rvsc20010496>

- Suleiman, R., Rosentrater, K.A., Bern, C. (2013) Effects of deterioration parameters on storage of maize: A review. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(9): 147-165.
- Sun, Y., Wang, M., Mur, L.A.J., Shen, Q., Guo, S. (2020) Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 572. <http://doi:103390/ijms201020572>.
- Thayer, A.W., Vargas, A., Castellanos, A.A., Lafon, C.W., McCarl, B.A., Roelke, D.L., Winemiller, K.O., Lacher, T. (2020) Integrating agriculture and ecosystems to find suitable adaptations to climate change. *Climate*, 8(10): 1-19. <http://doi:103390/cli8010010>
- Tolk, J.A., Evett, S.R., Xu, W., Schwartz, R.C. (2016) Constraints on water efficiency of drought tolerant maize grown in a semi-arid environment. *Field Crops Research*, 186: 66-77. <http://doi:101016/jfcr201511012>
- Universidade Federal de Viçosa – UFV. (2001) *Milhos UFVM – Cultivar de milho pipoca UFVM 2 – Barão de Viçosa* <http://arquivoufvbr-/dft/milho/UFVM2htm>
- Vasconcelos, L.C. (2021) *Caracterização de linhagens de milho pipoca para resistência à ferrugem polissora e qualidade da pipoca*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF – Campos dos Goytacazes - RJ. 58p.
- Vilela, F.O., do Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G., Daher, R.F., Scapim, C.A., Pacheco, C.A.P. (2005) Viability of the UENF popcorn improvement program based on divergence in S1 families. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5: 215-221.
- Wen, J., Shen, Y., Xing, Y., Wang, Z., Han, S., Li, S., Yang, C., Hao, D., Zhang, Y. (2021) QTL Mapping of Fusarium Ear Rot Resistance in Maize. *Plant Disease*, 105(3): 558-565.
- Wokorach, G., Landschoot, S., Audenaert, K., Echodu, R., Haesaert, G. (2021) Genetic Characterization of Fungal Biodiversity in Storage Grains: Towards Enhancing Food Safety in Northern Uganda. *Microorganisms*, 9(2): 383.
- Yaeno, T., Iba, K. (2008) BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant physiology*, 148(2): 1032-1041.

- Yao, L., Li, Y., Ma, C., Tong, L., Du, F., Xu, M. (2020) Combined genome-wide association study and transcriptome analysis reveal candidate genes for resistance to Fusarium ear rot in maize. *Journal of integrative plant biology*, 62(10): 1535-1551.
- Ye, G., Smith, K.F. (2008) Marker-assisted gene pyramiding for inbred line development: Basic principles and practical guidelines. *International Journal of Plant Breeding*, 2(1): 1-10.
- Yu, S., Jia, B., Liu, N., Yu, D., Zhang, S., Wu, A. (2021) Fumonisin B1 triggers carcinogenesis via HDAC/PI3K/Akt signalling pathway in human esophageal epithelial cells. *Science of The Total Environment*, 787: 147405.
- Zambrano, J.L., Yáñez, C.F., Sangoquiza, C.A. (2021) Maize Breeding in the Highlands of Ecuador, Peru, and Bolivia: A Review. *Agronomy*, 11(2): 212.
- Zhang, A., Pérez-Rodríguez, P., San Vicente, F., Palacios-Rojas, N., Dhliwayo, T., Liu, Y., Cui, Z., Guan, Y., Wang, H., Zheng, H., Olsen, M., Prasanna, B.M., Ruan, Y., Crossa, J., Zhang, X. (2021) Genomic prediction of the performance of hybrids and the combining abilities for line by tester trials in maize. *The Crop Journal*, 2: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.04.007>.
- Zhang, J., Huang, Y., Pu, R., Gonzalez-Moreno, P., Yuan, L., Wu, K., Huang, W. (2019) Monitoring plant diseases and pests through remote sensing technology: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 165: 104943.
- Zila, C.T., Ogut, F., Romay, M.C., Gardner, C.A., Buckler, E.S., Holland, J. B. (2014) Genome-wide association study of Fusarium ear rot disease in the USA maize inbred line collection. *BMC Plant Biology*, 14(1): 1-15.

APÉNDICE

APÊNDICE A

Tabela 1A – Custos de implantação, cultivo e avaliação de 176 linhagens endogâmicas de milho pipoca em 2 safras.

Insumo / Operação	Valor *	Quant.	Valor Total
Preparo da área de plantio	R\$ 130.00 /hora	2 h	R\$ 260.00
Combustível (máquinas)	R\$ 2.85 /L	25 L	R\$ 71.25
Plantio - Mão de obra	R\$ 90.00 /diária	4 und	R\$ 360.00
Fertilizante NPK (04-14-08)	R\$ 124.40 /sc 50 kg	3 sc	R\$ 373.20
Desbaste e Adubação	R\$ 90.00 /diária	3 und	R\$ 270.00
Inseticida	R\$ 94.00 /L	0.4 L	R\$ 37.60
Aplicação Inseticida	R\$ 130.00 /diária	3 und	R\$ 390.00
Capina mecânica	R\$ 70.00 /diária	18 und	R\$ 1,260.00
Fertilizante NPK (20-00-20)	R\$ 217.79 /sc 50 kg	1 sc	R\$ 217.79
Fertilizante - Ureia	R\$ 7.98 /kg	37.8 kg	R\$ 301.64
Colheita manual	R\$ 90.00 /diária	5 und	R\$ 450.00
Avaliação de espigas	R\$ 90.00 /diária	13 und	R\$ 1,170.00
Total			R\$ 5,161.48
Valor por planta **			R\$ 0.51
Valor por planta avaliada ***			R\$ 0.76

* Valores pagos no período de março de 2019 a fevereiro de 2021; ** valor considerando não haver perda de plantas desde o plantio até a colheita; *** valor já considerando as perdas de plantas ao longo do cultivo.

APENDICE B

Lista 1B. Rotina (*Script*) para análise de grupos de experimentos em blocos completos casualizados com desbalanceamento no número de tratamentos e ou de repetições, conforme proposto por Gomes e Guimarães (1970), no programa R:

```
# Importação dos dados em arquivo com extensão txt (bloco de notas)
dados <- read.table("exemplo.txt" , dec= ".", h = TRUE)
# Visualização das primeiras 6 linhas do arquivo
head(dados)
# Separação dos ensaios
Ensaio1 <- subset(dados, Exp == 1)
Ensaio2 <- subset(dados, Exp == 2)
Ensaio3 <- subset(dados, Exp == 3)
Ensaio4 <- subset(dados, Exp == 4)
Ensaio5 <- subset(dados, Exp == 5)
# Informações dos fatores
e = max(dados$Exp)    # número de ensaios
r1 = max(Ensaio1$Rep) # número de repetições do ensaio 1
r2 = max(Ensaio2$Rep)
r3 = max(Ensaio3$Rep)
r4 = max(Ensaio4$Rep)
r5 = max(Ensaio5$Rep)
t1 = max(Ensaio1$Trat) # número total de tratamentos do ensaio 1
t2 = max(Ensaio2$Trat)
t3 = max(Ensaio3$Trat)
t4 = max(Ensaio4$Trat)
t5 = max(Ensaio5$Trat)
c = 3                # número de tratamentos comuns a ser adicionado pelo
pesquisador
z1 = t1-c            # número de tratamentos regulares no ensaio 1
z2 = t2-c            # número de tratamentos regulares no ensaio 2
z3 = t3-c
z4 = t4-c
z5 = t5-c
```

Lista 1B, cont.

Separação dos ensaios somente com Tratamentos Comuns

Comuns = subset(dados, Linhagem == "L59"|

Linhagem == "L70"|

Linhagem == "L80")

"L59", "L70" e "L80" são os identificadores dos tratamentos comuns na coluna "Linhagem" (Tratamentos)

Médias Úteis – Variável "X1"

M = mean(dados\$X1) # Média Geral

M1 = mean(Ensaio1\$X1) # Média do Ensaio 1

M2 = mean(Ensaio2\$ X1) # Média do Ensaio 2

M3 = mean(Ensaio3\$ X1)

M4 = mean(Ensaio4\$ X1)

M5 = mean(Ensaio5\$ X1)

Separação dos blocos para captação do efeito de bloco

B1.1 = subset (Ensaio1, Rep == 1) # Bloco 1 dentro Ensaio 1

B2.1 = subset (Ensaio1, Rep == 2) # Bloco 2 dentro Ensaio 1

B3.1 = subset (Ensaio1, Rep == 3) # Bloco 3 dentro Ensaio 1

B1.2 = subset (Ensaio2, Rep == 1) # Bloco 1 dentro Ensaio 2

B2.2 = subset (Ensaio2, Rep == 2) # Bloco 2 dentro Ensaio 2

B3.2 = subset (Ensaio2, Rep == 3) # Bloco 3 dentro Ensaio 2

B1.3 = subset (Ensaio3, Rep == 1)

B2.3 = subset (Ensaio3, Rep == 2)

B3.3 = subset (Ensaio3, Rep == 3)

B1.4 = subset (Ensaio4, Rep == 1)

B2.4 = subset (Ensaio4, Rep == 2)

B3.4 = subset (Ensaio4, Rep == 3)

B1.5 = subset (Ensaio5, Rep == 1)

B2.5 = subset (Ensaio5, Rep == 2)

B3.5 = subset (Ensaio5, Rep == 3)

Soma de Quadrados de Blocos/Experimentos

Soma dos quadrados de blocos - Ensaio 1

desvB1.1 = ((mean(B1.1\$X1))-M1)^2 # Quadrado dos desvios Rep1/Ensaio 1

Lista 1B, cont.

```

desvB2.1 = ((mean(B2.1$X1))-M1)^2 # Quadrado dos desvios Rep2/Ensaio 1
desvB3.1 = ((mean(B3.1$X1))-M1)^2 # Quadrado dos desvios Rep3/Ensaio 1
SQblocos1 = desvB1.1+desvB2.1+desvB3.1
SQb.e1 = SQblocos1*t1
## Soma dos quadrados de blocos - Ensaio 2
desvB1.2 = ((mean(B1.2$X1))-M2)^2 # Quadrado dos desvios Rep1/Ensaio 2
desvB2.2 = ((mean(B2.2$X1))-M2)^2 # Quadrado dos desvios Rep2/Ensaio 2
desvB3.2 = ((mean(B3.2$X1))-M2)^2
SQblocos2 = desvB1.2+desvB2.2+desvB3.2
SQb.e2 = SQblocos2*t2 # Objeto com a SQ de blocos
## Soma dos quadrados de blocos - Ensaio 3
desvB1.3 = ((mean(B1.3$X1))-M3)^2
desvB2.3 = ((mean(B2.3$X1))-M3)^2
desvB3.3 = ((mean(B3.3$X1))-M3)^2
SQblocos3 = desvB1.3+desvB2.3+desvB3.3
SQb.e3 = SQblocos3*t3 # Objeto com a SQ de blocos
## Soma dos quadrados de blocos - Ensaio 4
desvB1.4 = ((mean(B1.4$X1))-M4)^2
desvB2.4 = ((mean(B2.4$X1))-M4)^2
desvB3.4 = ((mean(B3.4$X1))-M4)^2
SQblocos4 = desvB1.4+desvB2.4+desvB3.4
SQb.e4 = SQblocos4*t4 # Objeto com a SQ de blocos
## Soma dos quadrados de blocos - Ensaio 5
desvB1.5 = ((mean(B1.5$X1))-M5)^2
desvB2.5 = ((mean(B2.5$X1))-M5)^2
desvB3.5 = ((mean(B3.5$X1))-M5)^2
SQblocos5 = desvB1.5+desvB2.5+desvB3.5
SQb.e5 = SQblocos5*t5 # Objeto com a SQ de blocos
# Soma dos quadrados de blocos para análise agrupada
SQb = SQb.e1+SQb.e2+SQb.e3+SQb.e4+SQb.e5
SQb # Objeto com a SQ de blocos da análise agrupada
# Soma de Quadrados de Ensaios
SQEns1 = (M1-M)^2 # Quadrado do desvio para Ensaio 1

```

Lista 1B, cont.

```

SQE1 = SQEns1*(r1*t1) # SQ do ensaio 1
SQEns2 = (M2-M)^2 # Quadrado do desvio para Ensaio 2
SQE2 = SQEns2*(r2*t2) # SQ do ensaio 2
SQEns3 = (M3-M)^2
SQE3 = SQEns3*(r3*t3)
SQEns4 = (M4-M)^2
SQE4 = SQEns4*(r4*t4)
SQEns5 = (M5-M)^2
SQE5 = SQEns5*(r5*t5)
#SQEnsaio para análise conjunta
SQE = SQE1+SQE2+SQE3+SQE4+SQE5
SQE
# Soma de Quadrados da Interação G x E a partir das testemunhas –
## Considerou-se ANOVA em dbc em arranjo fatorial:
## 2 ensaios x 4 testemunhas para captação da Soma de Quadrados
## da Interação (forma usual)
Es = as.factor(Comuns$Exp) # declaração do fator Ensaio
Gen = as.factor(Comuns$Linhagem) # declaração do fator Genótipo
bl = as.factor(Comuns$Rep) # declaração do fator Bloco
# anova em esquema fatorial
anovatestemunhas <- aov (Comuns$X1~bl+Es+Gen+Es*Gen)
summary(anovatestemunhas) # visualização da anova
# Transformação da tabela de anova em formato de lista
list(anovatestemunhas)
# Extração do valor de SQ da interação
SQI<- summary(anovatestemunhas) [[1]] [4,2]
# Soma de Quadrados do Resíduo
#Anova individual (DBC) para o ensaio 1
G1 <- as.factor(Ensaio1$Linhagem)
b1 <- as.factor(Ensaio1$Rep)
anvE1 <- aov(Ensaio1$X1~b1+G1)
summary(anvE1)
list(anvE1)

```

Lista 1B, cont.

```

SQR1 <- summary(anvE1)[[1]][3,2]      # valor observado na SQ resíduo
#Anova individual (DBC) para o ensaio 2
G2 <- as.factor(Ensaio2$Linhagem)
b2 <- as.factor(Ensaio2$Rep)
anvE2 <- aov(Ensaio2$X1~b2+G2)
summary(anvE2)
list(anvE2)
SQR2 <- summary(anvE2)[[1]][3,2]      # valor observado na SQ resíduo
#Anova individual (DBC) para o ensaio 3
G3 <- as.factor(Ensaio3$Linhagem)
b3 <- as.factor(Ensaio3$Rep)
anvE3 <- aov(Ensaio3$X1~b3+G3)
summary(anvE3)
list(anvE3)
SQR3 <- summary(anvE3)[[1]][3,2]
#Anova individual (DBC) para o ensaio 4
G4 <- as.factor(Ensaio4$Linhagem)
b4 <- as.factor(Ensaio4$Rep)
anvE4 <- aov(Ensaio4$X1~b4+G4)
summary(anvE4)
list(anvE4)
SQR4 <- summary(anvE4)[[1]][3,2]
#Anova individual (DBC) para o ensaio 5
G5 <- as.factor(Ensaio5$Linhagem)
b5 <- as.factor(Ensaio5$Rep)
anvE5 <- aov(Ensaio5$X1~b5+G5)
summary(anvE5)
list(anvE5)
SQR5 <- summary(anvE5)[[1]][3,2]
# SQResíduo para análise agrupada
SQR <- SQR1+SQR2+SQR3+SQR4+SQR5
SQR
# Soma de Quadratos Total

```

Lista 1B, cont.

```

# Desvios Totais da Média
dados$X1desv <- dados$X1-M      # adicionar coluna com desvios da média
dados$X1desv2 <- dados$X1desv^2 # adicionar coluna com o quadrado dos
desvios
SQT = sum(dados$X1desv2)      # SQ dos desvios totais = SQTotal
# Soma de Quadrados de Tratamento (Ajustado)
# Obtenção por da SQtrat por diferença
SQtrat <- SQT-(SQb+SQE+SQi+SQR) # Obtenção da SQ de tratamentos por
subtração
SQtrat
# Graus de liberdade (GL) seguindo Gomes e Guimarães (1970)
GLe = e-1                      #GL de Ensaio (e)
GLbe = (sum(r1, r2, r3, r4, r5)-e) #GL de Bloco dentro de Ensaio
GLg = (sum(z1, z2, z3, z4, z5)+(c-1)) #GL de Genótipo (g)
GLi = (c-1)*(e-1)              #GL da Interação G x E
GLtot = ((t1*r1)+(t2*r2)+(t3*r3)+(t4*r4)+(t5*r5))-1 #GL Total
GLr = GLtot-(GLe+GLbe+GLg+GLi) #GL do resíduo - por diferença
# Quadrados Médios (QM) = SQ/GL
QMe <- SQE/GLe
QMbe <- SQb/GLbe
QMg <- SQtrat/GLg
QMi <- SQi/GLi
QMr <- SQR/GLr
QMtot <- SQT/GLtot
# Valor de F – Considerando efeitos fixos
Fensaio <- QMe/QMr
Fbloco <- QMbe/QMr
Ftrat <- QMg/QMr
Fint <- QMi/QMr
# Construindo a Tabela de Análise Conjunta
FV<- c("Ensaio(E)", "Bloco/E", "Tratamento (Adj)",
      "Testemunha x E", "Resíduo", "Total")
GL <- c(GLe, GLbe, GLg, GLi, GLr, GLtot)

```

Lista 1B, cont.

```

SQ <- c(sprintf("%.2f", SQE),sprintf("%.2f", SQb),
        sprintf("%.2f", SQtrat), sprintf("%.2f", SQI),
        sprintf("%.2f", SQR), sprintf("%.2f", SQT))
QM <- c(sprintf("%.2f", QMe), sprintf("%.2f", QMbe),
        sprintf("%.2f", QMg), sprintf("%.2f", QMi),
        sprintf("%.2f", QMr), "-")
F <- c(sprintf("%.2f", Fensaio), sprintf("%.2f", Fbloco),
        sprintf("%.2f", Ftrat), sprintf("%.2f", Fint), "-", "-")

Result <- data.frame(FV, GL, SQ, QM, F)
print(Result) # apresentar resultado no formato de tabela

```

O *script* apresentado anteriormente foi testado a partir dos dados descritos por Gomes e Guimarães (1970), de forma que foi possível obter os valores idênticos ao descritos por estes mesmos autores (Figura 1B), ao final da análise de variância (Figura 2B).

Source of variation	D.F.	S.S.	M.S.	F
Experiments	1	3,375.52		
Blocks within experiments	5	999.14		
Common treatments × experiments interaction	3	215.47	71.82	0.82
Treatments (adjusted)	10	11,077.83	1,107.78	12.64**
Residual	33	2,893.04	87.67	
Total	52	18,561.00		

Figura 1B. Imagem do quadro de análise de variância obtido por Gomes e Guimarães (1970) a partir de dados de diferentes experimentos com testemunhas comuns.

```

R 4.1.2 · ~/Artigo - Capítulo 1/Análise Estatística/Teste de script/
+ sprintf("%.2f", QM), "-")
> F <- c(sprintf("%.2f", Fensaio), sprintf("%.2f", Fbloco),
+        sprintf("%.2f", Ftrat), sprintf("%.2f", Fint), "-", "-")
> Result <- data.frame(FV, GL, SQ, QM, F)
> print(Result)
      FV GL      SQ      QM      F
1  Ensaio(E)  1 3375.52 3375.52 38.50
2    Bloco/E  5  999.14  199.83  2.28
3 Tratamento (Adj) 10 11077.84 1107.78 12.64
4 Testemunha x E  3  215.50   71.83  0.82
5      Resíduo 33 2893.00   87.67    -
6        Total 52 18561.00    -    -
> |

```

Figura 2B. Imagem da saída da análise de variância dos dados apresentados por Gomes e Guimarães (1970) a partir da rotina de comandos (*script*) desenvolvido no programa R (R Core Team, 2021) a partir da interface RStudio versão 4.1.2.