



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**ANTONIO LUCAS AGUIAR LOBO**

**MAPEAMENTO DE ASSOCIAÇÃO PARA COMPONENTES DE NORMAS DE  
REAÇÃO À COVARIÁVEIS AMBIENTAIS EM PAINEL PÚBLICO DE MILHO  
TROPICAL SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**FORTALEZA**

**2023**

ANTONIO LUCAS AGUIAR LOBO

MAPEAMENTO DE ASSOCIAÇÃO PARA COMPONENTES DE NORMAS DE REAÇÃO  
À COVARIÁVEIS AMBIENTAIS EM PAINEL PÚBLICO DE MILHO TROPICAL SOB  
DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Júlio César do Vale Silva.  
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Fritsche Neto.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L782m Lobo, Antonio Lucas Aguiar.

Mapeamento de associação para componentes de normas de reação à covariáveis ambientais em painel público de milho tropical sob déficit hídrico / Antonio Lucas Aguiar Lobo. – 2023.  
51 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Júlio César do Vale Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Roberto Fritsche Neto.

1. Estresse abiótico. 2. GWAS. 3. Tolerância à seca. 4. Responsividade. 5. Eficiência no uso da água. I. Título.

CDD 630

---

ANTONIO LUCAS AGUIAR LOBO

MAPEAMENTO DE ASSOCIAÇÃO PARA COMPONENTES DE NORMAS DE REAÇÃO  
À COVARIÁVEIS AMBIENTAIS EM PAINEL PÚBLICO DE MILHO TROPICAL SOB  
DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Júlio César do Vale Silva (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Roberto Fritsche Neto  
Louisiana State University (LSU)

---

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus familiares, pelo amor e valores repassados.

A todos os meus amigos, professores e colegas pelo incentivo, carinho e paciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a toda a minha família pelo apoio e incentivo na busca dos meus objetivos, em especial a minha mãe Antonia Aguiar. Sou grato a todos os professores e colegas que moldaram o profissional que sou.

Sou grato imensamente ao meu orientador do mestrado, professor Júlio César, por todo suporte, orientações e as horas dedicadas a mim no desenvolvimento deste trabalho. Também sou muito grato a banca pelas considerações em especial ao Roberto Fritsche Neto por todo o suporte dado. Agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa Ingrid Pinheiro, Fernanda Carla, Maria Valnice, Anderson Reinbold e Marcos Adriano. Além do grupo de pesquisa agradeço aos meus companheiros de pós-graduação: Johny de Souza, Leticia Bessa e Rafael Santiago.

Agradeço também a banca examinadora pelas contribuições para este trabalho. E a todos os colaboradores que nos ajudaram durante os ensaios experimentais, em especial, ao Tomil, pelas valiosas contribuições. Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa para desenvolver o trabalho. E por fim, agradeço a Universidade Federal do Ceará, em especial ao departamento de Ciências Agrárias, por todo suporte técnico e laboratorial para condução e análises do presente trabalho.

## RESUMO

Os estresses abióticos causam enorme impacto negativo sobre a produção agrícola, principalmente o déficit hídrico. Uma forma eficiente de se entender os efeitos do estresse nos genótipos é por meio de norma de reação. Norma de reação é uma regressão que mostra os possíveis fenótipos que um dado genótipo pode expressar em diferentes condições ambientais. Por ser uma regressão, a norma de reação pode ser decomposta em coeficientes linear (intercepto) e angular (slope). Esses componentes obtidos em função de um gradiente ambiental, dá informação acerca do desempenho base ao longo dos ambientes estudados e a responsividade frente a melhoria ambiental. Portanto, o desempenho base está associado à previsibilidade/estabilidade de um genótipo perante um gradiente ambiental e, dessa forma, relacionado a tolerância, enquanto que a responsividade está ligada à plasticidade fenotípica, isto é, capacidade de resposta frente aos incrementos ambientais. Assim, o uso dessas informações (componentes das normas de reação) ao invés do emprego de dados fenotípicos brutos na realização de estudos de genética associação (GWAS), deve possibilitar conhecer regiões genômicas que são mais influenciadas por variáveis ambientais quanto ao desempenho base e responsividade ao estresse hídrico. Para testar essa hipótese, foi usado um painel público de diversidade genética constituído por 360 linhagens de milho tropical, avaliado em oito ambientes, sendo quatro em condições de suprimento ideal de água (WW) e quatro em condições de estresse hídrico (WS). Foram fenotipados os sistemas radiculares das linhagens via captura e processamento de imagens usando o software RhizoVision Explorer® bem como caracteres da parte aérea como altura de planta, diâmetro do colmo, índice SPAD e massa seca. A princípio, foram realizadas análises dos dados fenotípicos para extração de médias ajustadas (BLUEs) via ajuste de modelo linear misto. Posteriormente, obtidas normas de reação por regressões genótipo a genótipo, considerando os BLUEs de cada linhagem em cada ambiente como variável resposta e o gradiente com as informações da variável ambiental suprimento de água como variável preditora. Foram extraídos os valores de cada linhagem referente aos componentes de normas de reação, intercepto e slope. Assim, com essas informações foram realizadas análises de associação (GWAS) para cada caráter. Depois foi feita a anotação dos genes candidatos, com seus potenciais efeitos e relações fisiológicas com a tolerância ao déficit hídrico via banco de dados MaizeGDB. Foram identificados SNPs significativos em praticamente todo o cariótipo do milho, com exceção dos cromossomos 6 e 7 nas análises de slope e no cromossomo 2 para intercepto e slope. Os SNPs que apareceram em ambas as condições para mais de um caráter, sugerem a ocorrência de efeito pleiotrópico,

como é o caso do gene Zm00001d048702. Ao total foram identificados 25 SNPs significativos, sendo estes, para todos os caracteres avaliados em WW e WS. Destes, 15 SNPs para o desempenho base, 15 para responsividade e 5 comuns a ambas os componentes (intercepto e slope). Além disso, eles explicam no intercepto para cada caráter 40% (PH), 57% (SD), 67% (SPAD), 40% (LRL), 44% (LRA) e para slope explicam 62% (PH), 67% (SD), 30% (SPAD), 61% (LRL), 43% (LRA). Os genes e/ou regiões genômicas identificadas aqui revelam respostas fisiológicas e mecanismos moleculares diretos ou indiretos relacionados à tolerância ao déficit hídrico. Essas informações possibilitarão realizar seleções mais assertivas e subsidiar programas de melhoramento que visam implementar seleção genômica, edição genômica (como CRISPR) ou tecnologias de genotipagem como é o caso da KASPTM (Kompetitive allele specific PCR) que visam obtenção de cultivares destinados a condição de estresse hídrico com redução de custos ao processo de avaliação.

**Palavras-chave:** estresse abiótico; GWAS; tolerância à seca; responsividade; eficiência no uso da água.

## ABSTRACT

Abiotic stresses cause a huge negative impact on agricultural production, mainly the water deficit. An efficient way to understand the effects of stress on genotypes is through reaction norms. Reaction norm is a regression that shows the possible phenotypes that a given genotype can express under different environmental conditions. As it is a regression, the reaction norm can be decomposed into linear (intercept) and angular (slope) coefficients. These components, obtained as a function of an environmental gradient, provide information on the average performance over the planned environments and the responsibility for environmental improvement. Therefore, average performance is associated with the predictability/stability of a genotype against an environmental gradient and, thus, related to tolerance, while responsiveness is linked to phenotypic plasticity, that is, responsiveness to environmental increments. Thus, the use of this information (components of the reaction norms) instead of the use of raw phenotypic data in the performance of genetic association studies (GWAS), should make it possible to know genomic regions that are more influenced by environmental variables in terms of average performance and responsiveness to water stress. To test this hypothesis, a public genetic diversity panel consisting of 360 tropical maize lines was used, evaluated in eight environments, four under conditions of ideal water supply (WW) and four under conditions of water stress (WS). The root systems of the lines were phenotyped via image capture and processing using the RhizoVision Explorer® software, as well as shoot characters such as plant height, stem diameter, SPAD index and dry mass. At first, analyzes of phenotypic data were performed to extract adjusted means (BLUEs) via mixed linear model adjustment. Subsequently, reaction norms were obtained by genotype-by-genotype regression, considering the BLUEs of each strain in each environment as a response variable and the gradient with information on the environmental variable water supply as a predictor variable. The values of each strain referring to the components of reaction norms, intercept and slope were extracted. Thus, with this information, association analyzes (GWAS) were performed for each character. Afterwards, the candidate genes were annotated, with their potential effects and physiological relationships with water deficit tolerance via the MaizeGDB database. Significant SNPs were identified in practically all maize karyotypes, with the exception of chromosomes 6 and 7 in slope analysis and in chromosome 2 for intercept and slope. The SNPs that appeared in both conditions for more than one trait suggest the occurrence of a pleiotropic effect, as is the case of the Zm00001d048702 gene. A total of 25 significant SNPs were identified, these being for all characters evaluated in WW and WS.

Of these, 15 SNPs for average performance, 15 for responsiveness and 5 common to both components (intercept and slope). The genes and/or genomic regions identified here reveal physiological responses and direct or indirect molecular mechanisms related to water deficit tolerance. This information will make it possible to carry out more assertive selections and subsidize breeding programs that aim to implement genomic selection, genomic editing (such as CRISPR) or genotyping technologies such as KASPTM (Kompetitive allele specific PCR) that aim to obtain cultivars intended for water stress conditions with cost reduction in the evaluation process.

**Keywords:** drought stress; abiotic stress; GWAS; drought tolerance; responsiveness; efficiency in the use of water.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Variáveis climáticas coletadas durante a condução dos experimentos em níveis contrastantes de disponibilidade de água (WW e WS). Ensaios conduzidos em 2020 (a e b) e 2021 (c e d). Tmax, temperatura máxima; Tmin, temperatura mínima; Evap, evapotranspiração; Rad, radiation..... 47
- Figura 2 – Normas de reação para: a: altura de plantas; b: diâmetro do colmo; c: índice SPAD; d: massa seca da parte aérea; e: raízes laterais; f: raízes axiais..... 49
- Figura 3 – SNPs significativos via análises de GWAS. Gráficos circulares (círculos concêntricos) de Manhattan das análises de associação dos caracteres PH SD, SPAD, LRL, LRA nas condições de intercepto (a) e slope (b). As linhas contínuas em vermelho indicam o threshold para seu respectivo caráter. Os SNPs significativos (acima das linhas) foram marcados em vermelho. Gráficos quantil-quantil dos caracteres supramencionados sob condições intercepto (c, d, e, f, g) e slope (h, i, j, k, l) respectivamente..... 51
- Figura 4 – Diagramas de Venn com o número de SNPs significativos associados a PH SD, SPAD, LRL, LRA em intercepto (a), slope (b) e em comum as duas condições (c)..... 52

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Teste da razão de verossimilhança (LRT) para o efeito de genótipo das análises de deviances individuais (por ambiente) e herdabilidades médias ( $h^2$ ) dos caracteres altura de planta (PH), diâmetro do colmo (SD), índice SPAD, massa seca de parte aérea (SDM), comprimento de raízes laterais (LRL) e axiais (LRA)..... 48
- Tabela 2 – Herdabilidades no sentido restrito (em %) dos caracteres sinalizadores de estresse hídrico altura de planta (PH), diâmetro do colmo (SD), índice SPAD, massa seca da parte aérea (SDM), comprimento de raízes axiais (LRA) e laterais (LRL) para os componentes de norma de reação intercepto e slope..... 50
- Tabela 2 – Ponto, caráter, SNP, ID do gene candidato, cromossomo (Crm), posição física (Posi), P-valor, minor allele frequency (MAF) da variância explicada para cada SNP significativo, efeito de substituição alélica (ASE) e anotação de genes candidatos detectados pela análise GWAS para o intercepto e slope obtidos via normas de reação para cada linhagem..... 53

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Material genético e condução experimental</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Obtenção de dados fenotípicos de caracteres sinalizadores de estresse hídrico</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Análises de dados fenotípicos</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises envolvendo variáveis e covariáveis ambientais</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Normas de reação</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Genotipagem e controle de qualidade</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Estrutura populacional e decaimento de LD</b> .....	<b>21</b>
<b>2.8</b>	<b>Análises de associação</b> .....	<b>22</b>
<b>2.9</b>	<b>Anotações de gene</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Análises de deviance, variáveis e covariáveis ambientais e normas de reação</b> .	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Análises de associação</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Genes candidatos e anotações funcionais</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Utilidade das normas de reação</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Genes associados à tolerância ao déficit hídrico</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Genes associados à responsividade</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Genes associados tanto à tolerância como à responsividade</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Aplicações no melhoramento vegetal</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
	<b>APÊNDICE A – LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um ambiente constitui-se num conjugado de fatores interligados que interagem entre si (Martins et al., 2020). Estudos recentes vêm mostrando que para compreender um ambiente e melhorar a acurácia de estimativas a serem exploradas dentro de um programa de melhoramento, torna-se necessário considerar em modelos genético-estatístico as covariáveis ambientais (Costa-Neto et al., 2020; Resende et al., 2021; Xu, 2016). Covariáveis ambientais exprimem a relação entre fatores como, por exemplo, temperatura, disponibilidade hídrica, ventos, etc. A relação entre esses fatores interfere no crescimento e desenvolvimento das plantas (Todd et al., 2018). Essa interferência pode moldar a variação fenotípica dos organismos (Guo et al., 2020). Com o uso de covariáveis ambientais tornou-se possível mapear os diferentes ambientes, pois elas funcionam como uma espécie de assinatura do ambiente (Zeraatpisheh et al., 2022). Assim, o comportamento fenotípico pode ser determinado por uma combinação complexa de fatores genéticos e ambientais (Guo e Li, 2023).

Uma melhor compreensão sobre como o ambiente pode afetar os indivíduos é através dos conceitos de tolerância e responsividade. Tolerância está relacionado a resistir a condições adversas e, no sentido agrônomo está associada a redução da produtividade diante de um estresse quando comparada a condições ambientais ideais (Miti et al., 2010). A responsividade, por sua vez, é denotada pela resposta do genótipo frente a quantidade de recursos, seja nutriente ou água, necessária para se obter produtividade, por exemplo (Moll et al., 1982). Tanto na tolerância quanto na responsividade, existem mecanismos fisiológicos responsáveis por buscar evitar danos causados pelos estresses, mas que geralmente funcionam de forma diferente (Zheng et al., 2000) e afetam de forma direta fatores significativos no desenvolvimento da produção, como por exemplo, a eficiência no uso da água. Tendo esse melhor entendimento é possível explorar mais os complexos efeitos quantitativos relacionados ao déficit hídrico.

Contudo, o ambiente modifica a expressão fenotípica de forma limitada conforme a predominância do genótipo (Ibañez et al., 2021), pois o genótipo exerce uma influente predominância na determinação de certos traços fenotípicos (Galgaye e Deresa, 2023). Isso ocorre principalmente quando a característica é altamente controlada por genes com efeitos fortes e bem estabelecidos. Na tentativa de tentar explicar melhor os efeitos do ambiente, Finlay e Wilkinson (1963) propuseram o uso de dados fenotípicos para gerar a média

ambiental e a partir disso elaborar um índice para as condições ambientais, assim ficou possível avaliar a qualidade dos dados por meio de um gradiente. Este índice surgiu como uma forma de melhor delinear os experimentos bem como obter dados ambientais mais condizentes. O método envolve regressão da média ambiental, obtida a partir da média de todos os genótipos presentes. Um exemplo das formas de aplicação é associar com a produtividade, pois ela sofre interferência de uma ampla gama de fatores ambientais. Posteriormente, Eberhart e Russell (1966) propuseram um método capaz de gerar estimativas de adaptabilidade e de estabilidade de produção. Essas estimativas estão relacionadas ao conceito de normas de reação proposto primeiro por Woltreck em 1909.

Assim, a norma de reação diz que um dado genótipo não determina apenas um fenótipo, mas pode apresentar uma gama de fenótipos possíveis para certos caracteres (Van Eeuwijk et al., 2019; Liu et al., 2020). O uso das normas de reação vem se mostrando relevante na compreensão das respostas populacionais quanto a aclimatação em diferentes locais (Lasky et al., 2020). Para se ter normas de reação, antes é necessário identificar as covariáveis ambientais relevantes à expressão dos caracteres. Após isso, por meio de regressão da variável resposta, o fenótipo do caráter de interesse, em função das variações ambientais proporcionadas pelas covariáveis ambientais, é possível obter um melhor entendimento da resposta dos genótipos via componentes de normas de reação (Costa-Neto et al., 2020). Assim, pelas várias regressões estabelecidas para cada genótipo, pode-se identificar os coeficientes linear (intercepto) e angular (slope) para cada um. O intercepto é em uma regressão o ponto da reta que cruza o eixo y; na norma de reação, corresponde ao desempenho base esperado do indivíduo em diferentes condições ambientais e pode ser associado a tolerância. Já o slope em uma regressão é o ângulo que a reta apresenta em relação ao eixo x e indica uma mudança de comportamento; na norma de reação, corresponde a responsividade, isto é, respostas fenotípicas (plasticidade) conforme as variações ambientes (Shi et al., 2023).

A relação entre essas expressões ou respostas e aquelas informações obtidas no processo de genotipagem da espécie é trivialmente usada em estudos de associação genética (GWAS), que constitui numa ferramenta útil na identificação de regiões genômicas associadas a determinados fenótipos (Cano-Gamez e Trynka, 2020). Entretanto, são raros os estudos que além dessas, relacionam informações ambientais, o que na prática melhora a acurácia em estudos de predição (Costa-Neto et al. 2020). Assim, se espera também que os resultados de GWAS a partir de componentes de normas de reação (intercepto e slope) ao estresse hídrico tragam informações mais assertivas aos programas de melhoramento que atuam no desenvolvimento de genótipos para essas condições.

Em GWAS, quando associações entre fenótipo e SNP são significativas, normalmente obtém-se os efeitos médios de substituição alélica para cada SNP relacionado, sendo potenciais genes candidatos subjacentes ao caráter alvo (Han e Huang, 2013). Desta maneira, é possível entender quais regiões do genoma são mais importantes à tolerância e/ou eficiência ao déficit hídrico. Assim, apesar de não ser um método comum, pode-se descobrir genes responsáveis pela expressão do desempenho base do caráter e aqueles que possibilitam melhorar a resposta da espécie quando submetida a condição de déficit hídrico (responsividade). Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi identificar regiões do genoma associadas à expressão de caracteres sinalizadores do estresse hídrico quanto ao desempenho base e responsividade.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material genético e condução experimental

Para a realização deste projeto foi usado um painel público de diversidade constituído por 360 linhagens endogâmicas de milho tropical (Yassue et al., 2021).

Por tratar-se de estudo envolvendo condições de suprimento de água contrastantes, bem irrigado (WW) e de estresse hídrico (WS), anteriormente aos experimentos principais, conduziu-se um experimento piloto com cinco linhagens (escolhidas aleatoriamente dentro do painel) e foram testados cinco níveis de suprimento de água: 100% de água disponível (AD), 80% de AD; 70% de AD; 50% de AD e 40% de AD. As linhagens foram conduzidas até o estágio V6 para se avaliar qual o seu comportamento nos diferentes níveis de disponibilidade hídrica. Por meio de regressão se estabeleceu uma curva de retenção de água para obtenção da capacidade de campo e delimitou a quantidade de água a ser disponibilizada via irrigação. Com isso, determinaram-se os pontos de WW e WS, sendo as lâminas de 80% de AD e a de 40% de AD, respectivamente como os mais adequados para caracterizar essas condições.

Por ter sido conduzido em campo aberto, o controle da irrigação de cada experimento foi realizado de forma manual e diária. Assim, usou-se 15 amostras aleatórias para calcular a média do peso diário dos vasos dentro de cada nível de disponibilidade de água. Posteriormente, era calculada a diferença entre o peso atual e o peso total obtido em cada nível de suprimento de AD para reposição do volume de água dentro de cada nível. Vale destacar que, para cada estágio vegetativo, foi obtido o peso médio das plantas, a fim de subtrair juntamente com o peso atual e este não interferir no volume de água a ser repostado.

Os experimentos principais foram conduzidos sob WW e WS, quatro para cada condição, no delineamento experimental linha  $\times$  coluna. Cada experimento continha três blocos e, nestes, as parcelas distribuídas em 9 colunas e 40 linhas, espaçadas por 0,50 m. Foram conduzidos em dois anos (2020 e 2021) na área experimental do setor de agricultura da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza-CE, a 3°44'24.27" de latitude S e 38°34'29.93" de longitude O e aproximadamente 18 m de altitude acima do nível médio do mar. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw', caracterizado como tropical chuvoso, muito quente, com chuvas predominantes nas estações do verão e do outono. Assim, conduziu-se os experimentos sempre no segundo semestre de cada ano, após a quadra chuvosa da região, época no qual se assemelha com o período de sequeiro presentes

em regiões semiáridas. Os registros de algumas variáveis climáticas, incluindo o volume de água disponibilizado as plantas em cada experimento estão sumarizadas na Figura 1.

As sementeiras foram realizadas em vasos plásticos com capacidade de 3L, contendo substrato na proporção 3:1 (arisco: húmus de minhoca). Semearam-se 2 sementes por vaso, a uma profundidade média de 3 a 4 cm. O desbaste foi efetuado quando as plântulas estavam com duas folhas completamente desenvolvidas (V2), deixando apenas uma plântula por vaso (parcela). Neste mesmo estágio fenológico, também se iniciou a imposição do déficit hídrico, que permaneceu até o estágio V6 (colheita). As adubações de plantio e cobertura foram baseadas na análise química do substrato, levando em consideração as recomendações para a cultura, de modo a isolar o estresse nutricional durante a condução experimental.

## **2.2 Obtenção de dados fenotípicos de caracteres sinalizadores de estresse hídrico**

As avaliações fenotípicas foram realizadas quando a maioria das plantas estavam em estágio fenológico V6. Os caracteres sinalizadores considerados na parte aérea das plantas foram: altura de planta (PH - em cm) - mensuração do solo à inserção da folha bandeira, medido com uso de uma régua graduada; diâmetro do colmo (SD - em mm) - média de duas medidas acima do nível do solo no segundo nó do colmo obtido com uso de um paquímetro; número de folhas (NF) e a estimativa do teor de clorofila (SPAD), utilizando clorofilômetro portátil, aferindo três folhas por planta para obter a média, entre às 10 e 12h da manhã. Posteriormente, as plantas foram cortadas rente ao solo, acondicionadas em sacos e transferidas para uma estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, por 72 horas, para a obtenção da massa seca de parte aérea (SDM).

Por ocasião da colheita, o sistema radicular foi separado da parte aérea, o substrato removido e as raízes lavadas cuidadosamente com água. Posteriormente, as raízes foram armazenadas em potes plásticos com capacidade de 1L, contendo uma solução de água e álcool 70% (proporção 3:1, respectivamente) para conservação, até o período das fotografias. Estas, por sua vez, foram realizadas sobre uma estrutura permanente com formato de cubo, para uniformizar a distância da câmera até as raízes (objeto/alvo). Para melhor distribuição de luzes em seu interior, fixou-se LEDs de 12W, em todas as direções, para evitar a formação de sombras. Após a obtenção das imagens, as raízes foram levadas e mantidas em secadora de circulação forçada de ar, a uma temperatura de 40 °C, por 4 dias, tempo necessário para constância de peso.

As imagens capturadas pelo dispositivo, em formato JPEG foram analisadas pelo software RhizoVision Explorer® para extração de dados. Foram considerados os caracteres: comprimento das raízes laterais (LRL) e axiais (LRA). O nível de limite da imagem foi ajustado uma a uma e o limite de poda de raiz foi definido com 5 pixels para todas as imagens. Considerou-se um limiar de diâmetro de raiz de 0,50 mm para distinguir raízes axiais de raízes laterais. Assim, foram considerados raízes laterais fragmentos com diâmetro igual ou inferior a 0,50 mm, e para as raízes axiais, fragmentos com diâmetro maior que 0,50 mm (Trachsel et al., 2009).

### 2.3 Análises de dados fenotípicos

Equações de modelos lineares mistos foram usadas para analisar os dados fenotípicos das linhagens do painel. Para isso, inicialmente foram eliminados os outliers via função `boxplot.stats` na base do software R versão 4.03 (R Core Team, 2021), seguida da verificação de ajuste via `QQplots`. Posteriormente, foi ajustado um modelo misto para obter o melhor preditor linear não-viesado (BLUP) pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) para cada caráter estudado nos ambientes de WW e WS, pelos pacotes `spATS` (Rodriguez-Alvarez et al., 2018) e `JOPS` (Eilers et al., 2021). Essas análises foram realizadas usando o seguinte modelo:

$$y = X_1b + X_2NL + Z_1r + Z_2c + Z_3g + \varepsilon$$

em que  $\mathbf{y}$  é o vetor de valores fenotípicos das linhagens do painel para cada caráter avaliado;  $X_1$  e  $X_2$  são matrizes de incidência para os efeitos fixos;  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  são matrizes de incidência para os efeitos aleatórios;  $\mathbf{b}$  é efeito fixo de bloco;  $\mathbf{r}$  é o efeito aleatório de linha, sendo  $\mathbf{r} \sim N(0, I\sigma_r^2)$ ;  $\mathbf{c}$  é o efeito aleatório de coluna, sendo  $\mathbf{c} \sim N(0, I\sigma_c^2)$ ;  $\mathbf{g}$  é o efeito aleatório de genótipo, sendo  $\mathbf{g} \sim N(0, I\sigma_g^2)$ ;  $\varepsilon$  é o efeito aleatório do resíduo, onde  $\varepsilon \sim N(0, I\sigma_\varepsilon^2)$ . A fim de corrigir a diferença no vigor e desenvolvimento das plantas, o número de folhas (NL) foi usado como covariável.

Na primeira etapa destas análises, o efeito de genótipo foi declarado como aleatório para possibilitar obter os componentes de variância e, conseqüentemente, alguns parâmetros genéticos. Posteriormente, numa segunda etapa, o efeito de genótipo foi declarado como fixo para obtenção do melhor estimador linear não-viesado (BLUE) de cada linhagem em cada ambiente de WW e WS para as análises seguintes.

## 2.4 Análises envolvendo variáveis e covariáveis ambientais

Dados climáticos foram importados da plataforma nasapower (Sparks, 2022) por meio da função `get_weather` do pacote `EnvRtype` (Costa-Neto, 2021b). As informações de pluviosidade foram somadas ao suprimento de água realizado diariamente em cada ambiente para obtenção da variável água disponível. Posteriormente, foi realizado um ajuste cardinal para temperatura e assim gerar outras variáveis ambientais via função `processWTH` do mesmo pacote. Para isso, foram usadas temperaturas mínimas e máximas recomendadas para o cultivo do milho em condições tropicais, como:  $T_{base1} = 8$ ,  $T_{base2} = 45$ ,  $T_{opt1} = 30$ ,  $T_{opt2} = 37$ .

O intuito com as análises realizadas aqui foi de agrupar variáveis ambientais como a disponibilidade de água, temperatura, radiação etc., que apresentassem capacidade de discriminação semelhante numa escala de tempo diária. Além disso, também foram analisadas as covariáveis ambientais, como a correlação entre chuva e vento, temperatura e radiação, chuva e temperatura etc., numa escala de tempo diária (Duan et al., 2022). Contudo, análises descritivas constataram que apenas a variável água disponível variou ao longo dos ambientes. Assim, nas análises seguintes, foi considerada apenas essa variável para relacionar com os BLUE das linhagens ao longo dos ambientes de WW e WS descrito anteriormente.

## 2.5 Normas de reação

Foram agrupados os BLUE indexando as linhagens ao longo dos ambientes para cada variável e assim obtidos os data frames. Em análises prévias constatou-se que alguns ambientes (considerando os BLUE de todas as linhagens) tanto em WW como em WS, causaram “ruído” às análises detalhadas a seguir. Assim, promoveu-se a remoção desses ambientes, permanecendo apenas aqueles que apresentaram efeito de genótipo significativo nas ANADEVs, com o intuito de obter curvas de regressão entre os ambientes mais contrastantes e discriminantes quanto a disponibilidade de água.

Na sequência, análises de regressão genótipo-a-genótipo foram realizadas com a função `lm` do pacote `stats`, considerando os BLUE de cada linhagem em cada ambiente de WW e WS como variável resposta e a variável ambiental água disponível dentro de cada ambiente como variável preditora. Gráficos conjugados envolvendo as variáveis resposta foram obtidos em função de um gradiente estabelecido pela variável ambiental (menos e mais água disponível) via pacote `ggplot2` (Wickham, 2011). Por fim, foram extraídas as estimativas

de cada linhagem referente aos componentes de normas de reação, intercepto e slope. Essas estimativas foram usadas nas análises posteriores.

As herdabilidades no sentido restrito para intercepto e slope dos caracteres foram obtidas pelo melhor preditor linear não-viesado genômico (gBLUP) de acordo com (Clark e van der Werf, 2013) considerando a matriz de relacionamento aditivo, conforme descrito em 2.8. Para isso, ajustou-se o modelo pela função *mmer* do pacote *sommer* (Covarrubias-Pazaran, 2016) e, posteriormente, com a função *vpredict* foram obtidos os componentes de variância para estimar as herdabilidades.

## 2.6 Genotipagem e controle de qualidade

As 360 linhagens pertencentes ao painel foram genotipadas pela plataforma *Affymetrix® Axiom Maize Genotyping Array* contendo 18.413 SNP (Unterseer et al., 2014). Primeiro, como controle de qualidade padrão, marcadores com *Call Rate* (CR) < 90% e não bialélico foram removidos. Depois, dados perdidos foram imputados com o algoritmo *Beagle 5.0* (Browning et al., 2018). Finalmente, marcadores com *Minor Allele Frequency* (MAF) menor que 5% também foram descartados. Além disso, foram eliminados os marcadores em desequilíbrio de ligação par a par (LD) que apresentaram correlação das frequências alélicas ao quadrado ( $r^2$ ) > 0,99. Todos esses procedimentos foram realizados com o auxílio do pacote *SNPRelate* (Zheng et al., 2012). Ao final, 12.704 SNP foram retidos para serem usados nas análises seguintes.

## 2.7 Estrutura populacional e decaimento de LD

As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas com base na matriz de relacionamento genômico aditivo (VanRaden, 2008) das linhagens retidas dentro de cada variável resposta após o processo de remoção também pelo pacote *SNPRelate* (Zheng et al., 2012). Essas análises foram usadas a posteriori com o intuito de minimizar vieses ocasionados pela estrutura populacional. A correção via PCA nas análises seguintes foi incorporada automaticamente pelo *FarmCPU*. Assim, foram usados de 2 a 5 componentes e o melhor ajuste ao modelo foi baseado nos gráficos *qqplots*.

O número mais provável de grupos dentro do painel foi realizado de acordo com Yassue et al. (2021), pois se trata do mesmo painel de diversidade. Da mesma forma, as estimativas de LD entre cada par de SNP dentro dos cromossomos foi calculada usando o  $r^2$ .

Para isso, foi considerada uma distância de todos os SNP menor que 1 Mbp, e os valores foram plotados contra a distância do par de bases para obter o decaimento LD por cromossomo. Este procedimento foi realizado com todos os SNP retidos nos procedimentos de controle de qualidade descritos anteriormente.

## 2.8 Análises de associação

As análises de associação (GWAS) foram conduzidas para o intercepto e slope de cada variável resposta pelo método da Unificação de Probabilidade Circulante de Modelo Fixo e Aleatório (*FarmCPU*) no pacote *FarmCPU R* (Liu et al., 2016). Usou-se a função *FarmCPU.P.Threshold* para obter o real *p-threshold*, específico para cada variável e componente de norma de reação via processo de simulação com 100 permutações. Posteriormente, o ponto de corte foi obtido pela razão entre o *p-threshold* e o número de marcadores usados.

Posteriormente, foram obtidos os p-valores (significância), MAF e os efeitos médios de substituição alélica (ASE) para cada SNP significativamente associado, designado a partir de então como potencial gene candidato subjacente ao caráter alvo. Os coeficientes de regressão para cada SNP significativo ( $R_{SNP}^2$ ) também foi obtido com base em MAF e ASE em equações descritas por Da et al. (2014). Posteriormente, regressões liner múltiplas forem estabelecidas para cada caráter usando os SNP significativos como variáveis preditoras e assim obter o quão as marcas influencia a expressão total do caráter ( $R_{TOT}^2$ ). Os gráficos de Manhattan e *qqplots* foram obtidos pelo pacote *CMplot* (Yin et al., 2021). Diagramas de Venn-Euler foram obtidos para verificar a coincidência de marcas entre caracteres e componentes das normas de reação pelo pacote *VennDiagram* (Chen, 2011), também no *software R*.

## 2.9 Anotações de gene

Após a realização da GWAS, os SNPs significativos foram utilizados para encontrar os QTLs e posteriormente, foi feita a anotação dos genes, assim como seus potenciais efeitos e relações fisiológicas com a tolerância e/ou responsividade ao déficit hídrico. A anotação dos genes candidatos foi realizada utilizando o banco de dados MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org>).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Análises de deviance, variáveis e covariáveis ambientais e normas de reação**

Constatou-se efeito de genótipo significativo pelas análises de deviance (ANADEVs) individuais (por ambiente) para quase todos os caracteres, exceto massa seca da parte aérea (SDM) em mais de 50% dos ambientes avaliados (Tabela 1). Nos ambientes em que se observou efeitos significativos, também foram os que apresentaram maiores herdabilidades. Para altura de planta (PH), diâmetro do colmo (SD), comprimentos de raízes laterais (LRL) e axiais (LRA), os ambientes WW\_1, WW\_4, WS\_1, WS\_4 foram aqueles que apresentaram maior capacidade de discriminação das linhagens de milho tropical ao passo que para o caráter SPAD, os ambientes WW\_3, WW\_4, WS\_1 e WS\_2. Assim, buscou-se utilizar sempre o mesmo número de ambientes nas condições distintas de suprimento de água a fim de “balancear” o conjunto de dados usados nas análises posteriores.

Em análises prévias envolvendo as variáveis e covariáveis ambientais obtidas no presente estudo, observou-se que houve efeito significativo apenas para a quantidade de água disponibilizada (irrigação + pluviosidade). Isso ocorreu devido a semelhança dos ambientes utilizados no experimento, o que reforça a relevância do impacto do efeito do estresse hídrico nos cultivos, pois apesar da semelhança ambiental, a disponibilidade hídrica apresentou efeito significativo. Ao considerar os ambientes mais discriminativos por caráter e a referida variável ambiental, foi possível estabelecer um gradiente ambiental e então regressar o desempenho de cada genótipo para obter suas respectivas normas de reação (Figura 2). Assim, graficamente constatou-se grande variação de respostas para os caracteres estudados, reiterada pelas herdabilidades dos componentes da norma de reação – interceptos e slopes, com maior variabilidade sempre para o primeiro componente, independentemente do caráter (Tabela 2).

#### **3.2 Análises de associação**

Foram identificados SNPs significativos em praticamente todo o cariótipo do milho, com exceção dos cromossomos 6 e 7 nas análises de slope e no cromossomo 2 para intercepto e slope (Figuras 3a e 3b). No total foram identificados 25 SNPs, sendo estes, para todos os caracteres avaliados nas duas condições de suprimento hídrico. Destes, 20 SNPs exclusivos para o intercepto e slope (dez para cada) e cinco comuns a ambas as condições (Figura 4c).

Foram identificados para o caráter PH quatro SNPs em intercepto e slope. Nenhum foi comum às condições WW e WS e dois marcadores estão presentes em outros caracteres. Com relação ao caráter SD, quatro e cinco SNPs influenciaram o caráter em intercepto e slope, respectivamente (Figuras 3a, 3b e Tabela 3). Para esse caráter, além de quatro marcadores em comuns em WW e WS, dois marcadores estão presentes em outros caracteres e um outro somente no slope. Para o SPAD, um SNP foi identificado para cada componente, mas não são comuns e nem estão associados a outros caracteres. Para o caráter LRL, oito e seis SNPs foram identificados em intercepto e slope, respectivamente. Somente um dos marcadores em ambos. Com relação ao caráter LRA, identificou-se um SNP em intercepto e slope, ambos são comuns a WW e WS. Os qqplots revelaram, no geral, um ajuste adequado dos dados ao modelo usado nas análises de associação em todos os caracteres (Figuras 3c a 3l). Além disso, o limite para associações significativas entre marcador/caráter variou de 5,70 a 19,37 (Tabela 3). As proporções da variância fenotípica explicadas pelos SNPs significativos variaram de 40 a 67% para intercepto, com destaque para o gene *Zm00001d032011* que é considerado de ocorrência rara, por possuir MAF igual a 0,06, mas que sozinho é responsável por explicar 67% do efeito no caráter SPAD. Já no slope a variação foi de 30 a 67%.

### 3.3 Genes candidatos e anotações funcionais

Dentre os genes candidatos identificados via GWAS (Tabela 3) para o caráter PH foram observados quatro para intercepto e quatro para slope, o gene *Zm00001d053244* e o *Zm00001d048702*, localizados no cromossomo 4, aparecem em mais de um caráter nas duas condições de suprimento de água. Para o SD foram identificados quatro para o intercepto e cinco para slope, sendo quatro simultaneamente associados que são os genes *Zm00001d040803*, *Zm00001d048702*, *Zm00001d053244*, *Zm00001d011765* localizados nos respectivos cromossomos 3, 4, 4 e 8. Já para o índice SPAD, identificou-se um gene para intercepto e um gene para slope. Para o caráter LRL foram detectados oito genes para intercepto e seis para slope, foi encontrado um gene simultâneo que é o *Zm00001d048702* do cromossomo 4. Por fim, para o LRA foram identificados um gene em intercepto e um gene em slope que é o *Zm00001d024468*, localizado no cromossomo 10 e simultâneo em ambos.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Utilidade das normas de reação

As linhagens de milho tropical apresentaram comportamento variado para os caracteres estudados ao longo dos ambientes (Figura 1). O estabelecimento de um gradiente ambiental que busca relacionar os efeitos do ambiente é bastante relevante, pois uma vez obtido, além de possibilitar modelar o fenótipo observado, permite também prever o desempenho fenotípico em outros ambientes não estudados usando médias meteorológicas históricas (Costa-Neto et al., 2021a).

O gradiente ambiental no presente estudo visando estabelecer as diferenças entre os ambientes de WW e WS, foi obtido pela quantidade de água disponível, única variável ambiental que diferiu entre ambas as condições. Apesar disso, foi possível entender melhor o desempenho fenotípico das linhagens com base em diferentes normas de reação, dando atenção principalmente aos componentes de intercepto e slope (Figura 1). No geral, naqueles ambientes em que o efeito de genótipo foi significativo, observou-se maiores herdabilidades, independentemente do caráter (Tabela 1). Como o material genético usado foi o mesmo nos diferentes ambientes, a diferença dos coeficientes de herdabilidade se deve exclusivamente a variação ambiental, o que demonstra que os caracteres estudados apresentam herança quantitativa (Miranda-Jacomé et al., 2014).

A inclinação das curvas de normas de reação das linhagens para os caracteres estudados, mostra que algumas dessas apresentam maior responsividade, isto é, responderam eficientemente à melhoria do ambiente (Bradshaw, 2006). Assim, torna-se necessário conhecer quais genes estão envolvidos a essa adaptação fenotípica (plasticidade) para serem explorados em processos de seleção assistida via marcadores por programas de melhoramento que visam gerar cultivares para condições de déficit hídrico. Ademais, como esperado e de acordo com outros estudos (Ren et al., 2021; Zhang et al., 2022; Ullah et al., 2021), há maior variabilidade genética para tolerância ao estresse hídrico (Tabela 2), geralmente observado naqueles genótipos que apresentam comportamento mais previsível (estável) e não respondem satisfatoriamente mesmo sob condições melhores de aporte de água (Fritsche-Neto e DoVale, 2012).

Além disso, as características fenotipicamente plásticas são normalmente características quantitativas, mas a genética quantitativa, apesar de ser uma ferramenta importante para estudos, não é tão eficiente para lidar com a plasticidade fenotípica (Jong,

1990; Kovuri et al., 2023). A genética quantitativa trata de componentes de variação. A plasticidade fenotípica leva a um componente de variância dentro da variância ambiental, dessa forma, a plasticidade reduz a estimativa de herdabilidade em uma população que tem distribuição ambiental. Normalmente, herdabilidades aplicam-se apenas à população e ao ambiente onde foram estimados, mas no caso de caracteres fenotipicamente plásticos, a herdabilidade muda com o ambiente (Ul-Allah et al., 2023). As consequências evolutivas da variação genética na plasticidade fenotípica podem ser mais bem avaliadas quando pode ser detalhada a dependência da hereditariedade na média e da variância do ambiente, tal como a população o percebe (Jong, 1990). Assim, para compreender a seleção de diferentes caracteres fenotípicos num ambiente variável, é preciso conhecer como os componentes da matriz de variância genética, variâncias aditivas e covariâncias, mudam com o ambiente da população. Contudo, a genética quantitativa dos valores de características que se alteram com o ambiente se torna necessária. Desta maneira, a genética quantitativa pode ser enquadrada utilizando o conceito de norma de reação.

#### **4.2 Genes associados à tolerância ao déficit hídrico**

Os genes identificados nos caracteres para o componente do intercepto, estão associados ao desempenho base das linhagens ao longo do gradiente ambiente e, portanto, denotam a estabilidade e/ou previsibilidade, condição associada no presente estudo à tolerância do déficit hídrico. Assim, o gene *Zm00001d017714* significativo para o caráter LRL está associado a adaptação morfológica de raízes e exploração do solo visando uma maior eficiência da aquisição de nitrogênio (Remans et al., 2006). O déficit hídrico estimula a expansão do sistema radicular para zonas mais profundas e úmidas do perfil do solo. A densidade de pelos radiculares aumenta, contribuindo assim para uma maior área de absorção de água pelas raízes (Liu et al., 2018). Apesar dos experimentos terem sido conduzidos em vasos, observou-se esse comportamento no terço final das raízes onde concentrou maior teor de umidade. Além disso, as raízes podem acumular solutos orgânicos, como açúcares e aminoácidos, para manter o equilíbrio osmótico e proteger as células da desidratação (Alves e Setter, 2004).

O caráter PH é sempre considerado em estudos envolvendo estresse hídrico em milho, pois em condição restrita desse insumo a tendência é que as plantas fiquem mais baixas. O gene *Zm00001d052079* identificado nesse caráter também confere função conectada ao equilíbrio osmótico. Ele está relacionado a ativação de enzimas integrantes da via

metabólica do ácido aspártico (Jander e Joshi, 2010). O ácido aspártico durante o déficit hídrico está ligado a síntese de prolina. A prolina é um aminoácido conhecido por sua função como osmólito, que ajuda a regular a pressão osmótica nas células e as protegê-las contra os efeitos do estresse hídrico (Farooq et al., 2020). Além disso, o ácido aspártico também desempenha um papel na síntese de outros aminoácidos, como a metionina e a treonina, que são importantes na regulação do metabolismo de nitrogênio e do balanço de carbono nas plantas (Taiz et al., 2017). Durante o déficit hídrico, a regulação desses aminoácidos pode ser afetada, modificando assim o metabolismo global da planta.

O gene *Zm00001d053429* também identificado no caráter LRL apresenta função similar, pois é um dos responsáveis pela biossíntese de açúcares e processos de regulação de plantas buscando promover uma melhor estabilidade perante as variações do ambiente (Sridhar et al., 2004). Com o déficit hídrico as plantas promovem o acúmulo de açúcares a fim de aumentar o seu potencial osmótico, permitindo o aumento da turgescência via osmoproteção (Ahmed et al., 2021).

Portanto, os genes supracitados oferecerem respostas às plantas quando submetidas à condição de estresse hídrico, indicando ajustes morfológicos e fisiológicos para compensar o declínio em desempenho e conferir estabilidade ao estresse. Assim, esses genes significativos para o componente do intercepto podem ser úteis a estudos que visam elucidar a arquitetura genética da tolerância ao estresse hídrico assim como para pesquisas que buscam mapear ou identificar QTLs associados a essa condição.

O gene *Zm00001d011679* identificado no caráter PH regula a passagem de nitrato e amônio através da membrana plasmática das células da epiderme por meio de transportadores específicos (Larsson e Ingemarsson, 1989). O transporte de nitrato é uma parte essencial do metabolismo de nitrogênio nas plantas, e ele pode estar relacionado à altura das plantas durante o déficit hídrico de várias maneiras. O nitrogênio é um nutriente vital para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo um componente importante dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais. Durante o déficit hídrico, a disponibilidade de água pode influenciar a absorção, assimilação e transporte de nitrato, afetando diretamente o crescimento e a altura das plantas (Li et al., 2023).

Outro gene que apresenta uma conexão com as raízes mesmo que de forma indireta é o *Zm00001d040002* que está relacionado a tolerância de plantas ao alumínio podendo proporcionar alterações através da modulação no desenvolvimento (Khouidi, 2021) e está associado ao transporte de proteínas e outras substâncias (Gaudet et al., 2011). O transporte de proteínas é fundamental para muitos processos celulares e fisiológicos,

incluindo a regulação da expressão gênica, a resposta a estresses ambientais e o ajuste do metabolismo (Srivastava et al., 2022). Durante o déficit hídrico, as plantas precisam se adaptar para conservar água, minimizar a perda de água por transpiração e manter as funções essenciais para a sobrevivência. Já com relação a solos com excesso de alumínio, em condições de déficit hídrico, a absorção dele pode ser maior devido a reduzida disponibilidade de água, levando a uma menor lavagem do alumínio tóxico e a uma maior concentração desse elemento nas proximidades das raízes (Siecińska et al., 2019).

O gene *Zm00001d025082* também presente em LRL está associado a proteínas envolvidas no catabolismo de polissacarídeos (Kesari et al., 2015). O catabolismo de polissacarídeos requer água como solvente para as reações enzimáticas envolvidas na sua quebra. Com o déficit hídrico, a velocidade e a eficiência do catabolismo de polissacarídeos são comprometidas e as plantas redirecionam os recursos limitados para garantir a sobrevivência e a proteção de órgãos vitais, como brotos e folhas jovens (Zia et al., 2021). Isso pode levar a restrições aos órgãos de reserva, onde ocorre o armazenamento de polissacarídeos.

O caráter LRL apresentou não só o maior número de SNPs significativos na GWAS, mas também mais genes direta ou indiretamente relacionados à regulação fisiológica e/ou bioquímica ao estresse hídrico. O gene *Zm00001d045136* é regulador da ação de transportadores que apresentam substratos extremamente amplos, sendo capazes de transportar uma grande variedade de produtos tóxicos naturais ou sintéticos, de origem endógena ou exógena. Desta forma, evitam ou reduzem o acúmulo desses produtos no interior das células e, conseqüentemente, evitam ou minimizam a sua ação tóxica (Del Sorbo et al., 2000). O estresse ocasiona mudanças no limite das atividades metabólicas, o que pode ser associado a tolerância e desintoxicação, assim, ele pode gerar acúmulo de substâncias tóxicas ou levar à deficiência de substâncias essenciais as plantas (Feng et al., 2023). Isso também confere uma importância para o estudo de tolerância de plantas, principalmente os que envolvem sistema radicular, tendo em vista a o efeito do gene deve influenciar no crescimento e desenvolvimento das raízes.

### **4.3 Genes associados à responsividade**

Os genes identificados nos caracteres para o componente do slope estão associados as respostas das linhagens aos estímulos favoráveis proporcionados ao longo do gradiente ambiental. Diante disso, o gene *Zm00001d025472* identificado no caráter PH é um

regulador negativo das vias de sinalização das citocininas. A expressão ARR16 é uma resposta dada a sinalizadores e é regulada em vários estágios de desenvolvimento (Srivastava et al., 2019). O fitohormônio citocinina desempenha um papel fundamental na regulação de crescimento e desenvolvimento das plantas, está envolvido em várias respostas fisiológicas às mudanças ambientais, dentre elas o déficit hídrico (Wang et al., 2023). O gene *Zm00001d048410* também foi localizado no mesmo caráter e está associado ao transporte vacuolar de proteínas, transportadoras de auxinas. As proteínas são localizadas na membrana plasmática, e sua localização é controlada por vários mecanismos (Martínez-Navarro et al., 2022). As auxinas controlam o crescimento e o fototropismo em plantas e em condições de déficit hídrico tem atuação determinante na regulação do metabolismo e crescimento das raízes (Sharma et al., 2018). O gene *Zm00001d033673* foi identificado no caráter SD e apresenta uma função semelhante aos demais. É relacionado a fatores de transcrição do tipo Teosinte Branched1/Cycloidea/PCF (TCP) que controlam diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal, como morfogênese foliar, simetria floral e padrão de ramificação desenvolvimento das gemas axilares (Aguilar-Martínez et al., 2007), geralmente afetados negativamente pelo déficit hídrico.

Dessa forma, esses genes supracitados há certa associação entre a atividades dos genes supracitados com a condição de estresse avaliada. As citocininas promovem o crescimento e a divisão celular, estimulando a proliferação de células em várias partes da planta, incluindo gemas laterais e gemas axilares. As auxinas são conhecidas por regular o alongamento celular e a formação de raízes e a dominância apical, inibindo o crescimento das gemas laterais. Em condições de estresse hídrico, ocorrem alterações nos níveis e no equilíbrio dos hormônios vegetais, incluindo citocininas e auxinas. As plantas apresentaram maiores repostas com efeito imediato sinalizando uma adaptação as diferentes condições ambientais. Pode-se utilizar essas informações para verificar a plasticidade fenotípica em um ambiente e separar os efeitos genéticos contínuos. Isso mostra os genes individuais que estão por trás das respostas plásticas de diversos genótipos ao ambiente.

Os genes *Zm00001d013288* localizado no SPAD e *Zm00001d046561* identificado no LRL estão associados diretamente a sinalização mecanismos de adaptação das plantas para sobreviver em condição de estresse. A condição de estresse é sinalizada na planta e ela desencadeia uma resposta. As proteínas quinases e fosfatases desempenham um papel fundamental na regulação das vias de sinalização de estresse e principalmente as quinases se encontram envolvidas em vários processos da resposta para estresses abióticos, dentre eles o estresse hídrico (Shukla e Mattoo, 2008). Elas desempenham um papel crucial na regulação

de uma ampla variedade de processos celulares, incluindo a transdução de sinais, o metabolismo, o crescimento celular e a resposta ao estresse (Liu et al., 2023). São sinalizadas pelo estresse osmótico gerado através do déficit hídrico e mediam essa sinalização do estresse para a planta. O que ocasiona alterações na expressão gênica e ativação de várias classes de proteínas e osmólitos (Zhu, 2002). Outro gene associado a sinalização de estresse também localizado no LRL é o *Zm00001d046740* que é conectado ao domínio dedo de zinco que corresponde a uma estrutura proteica estabilizada pela ligação coordenada a um íon zinco com aminoácidos (Brayer e Segal, 2008). Esse domínio dedo de zinco passou a representar uma das maiores e mais importante famílias de proteínas de ligação ao DNA na transcrição de eucariotos devido as suas funções e quantidade presente no genoma (Wei et al. 2022). Uma delas é regular respostas de estresses abióticos, dentre eles mecanismos relacionados ao déficit hídrico (Seok et al., 2016).

O caráter LRL quanto ao componente do slope não apresentou apenas genes envolvidos na sinalização de estresse. O gene *Zm00001d048421* está relacionado a síntese e regulação de fosfolípidios de membrana ou regiões ácidas de várias proteínas (Uchida et al., 2000). Uma diminuição da fluidez das membranas pode ocorrer, reduzindo a facilidade na troca de fosfolípidios entre as duas bicamadas, por conta da oxidação lipídica (Gill e Tuteja, 2010). A peroxidação lipídica tem sido amplamente utilizada como um indicador de danos às membranas celulares em plantas sob déficit hídrico. Outro gene no LRL também associado ao efeito de danos celulares é o *Zm00001d045534* que está envolvido com enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades (amino ou carboxi -terminal) das proteínas produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos (Ryan, 1990). O déficit hídrico favorece a um estresse oxidativo que promove a inativação de enzimas e interferência nesse processo e nas rotas metabólicas (Xiao et al., 2023). Assim, o maior entendimento desses efeitos pode trazer uma contribuição ao processo de seleção de programas de melhoramento que buscam aumentar a eficiência das plantas no uso de recursos como água e nutrientes.

O gene *Zm00001d045570* identificado no caráter LRL não está diretamente associado aos demais, ele possui relação com a proteína identificada fosfoglicerato mutase que atua na via glicolítica, resultando na produção de energia na forma de ATP e NADH, utilizada em vários processos celulares (Nelson e Cox, 2003). O déficit hídrico afeta o funcionamento normal do organismo, incluindo o metabolismo celular. A disponibilidade adequada de água é importante para a correta atividade das enzimas envolvidas, incluindo a fosfoglicerato mutase que tem sua expressão diminuída. Embora não esteja diretamente

relacionada ao sistema radicular das plantas, a glicólise e o metabolismo energético são fundamentais para o funcionamento e desenvolvimento saudável das raízes. As raízes das plantas desempenham várias funções vitais, incluindo a absorção de água e nutrientes do solo e armazenamento de carboidratos (Wang et al., 2023). Para isso, as raízes precisam de energia para o crescimento, manutenção celular e atividade metabólica. Foi possível notar o efeito disso nas diferentes condições hídricas através da variação do comprimento das raízes.

#### **4.4 Genes associados tanto à tolerância como à responsividade**

Os genes identificados nos caracteres para os componentes de intercepto e slope contribuem tanto para manter as plantas em condições subótimas de disponibilidade de água como para melhorar a resposta delas quando o ambiente está propício. Nestas condições, o gene *Zm00001d048702* significativo para os caracteres PH, SD e LRL mostrou-se mais relevante. Esse gene está relacionado as benzoxazinonas que são os principais metabólitos secundários defensivos no milho. Pertencem a uma das classes de metabólitos secundários de plantas mais bem estudadas em termos de sua distribuição, atividades biológicas, bem como sua biossíntese de aspectos bioquímicos e genéticos moleculares (Sue et al., 2011). Durante o déficit hídrico, a produção de benzoxazinonas pode ser induzida nas plantas como uma resposta adaptativa ao estresse. Esses compostos desempenham várias funções benéficas para as plantas durante condições de falta de água, como proteção contra patógenos, regulação do crescimento, proteção contra herbivoria e resposta antioxidante (Gholami et al., 2019). A proteção contra patógenos ocorre, pois as benzoxazinonas têm propriedades antimicrobianas e antifúngicas, o que significa que elas podem ajudar a proteger as plantas contra infecções causadas por patógenos que podem se aproveitar do estresse hídrico para atacar as plantas susceptíveis. Podem ainda ser tóxicas ou ter propriedades repelentes para insetos e outros animais que se alimentam das plantas. Já a regulação do crescimento acontece porque as benzoxazinonas também podem ter efeitos regulatórios no crescimento das plantas afetando o caule e as folhas bem como a taxa de crescimento no geral das plantas (Aguirre-Becerra et al., 2022). A planta também pode redirecionar recursos para a produção de benzoxazinonas e modular a expressão de genes relacionados ao crescimento, permitindo que sejam alocados recursos de forma mais eficiente para sobreviver às condições de déficit hídrico (Sicker e Schulz, 2002). Com relação ao sistema radicular, elas podem influenciar a morfologia, promovendo o desenvolvimento de raízes em camadas mais profundas do solo durante o déficit hídrico, influenciando na capacidade das plantas de encontrar e absorver água em

condições de escassez hídrica. Ademais, o déficit hídrico pode levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas, resultando em estresse oxidativo. Como as benzoxazinonas têm propriedades antioxidantes, reduzem a síntese de ROS nessas condições (Nair et al., 1990). Outro ponto importante é que esses compostos ajudam a regular a abertura dos estômatos, as estruturas nas folhas responsáveis pela troca de gases com o ambiente (Yu et al., 2021). A regulação dos estômatos é crucial para controlar a transpiração e a perda de água, permitindo que a planta conserve água em condições de baixa disponibilidade hídrica. Além de suas funções diretas na resposta ao estresse hídrico, as benzoxazinonas também podem estar envolvidas em complexos processos de sinalização molecular que coordenam a resposta da planta ao estresse causado pelo déficit hídrico (Siecker et al., 2000).

O gene *Zm00001d040803* associado ao SD, está envolvido na formação de peptídeo hormonal ubíquo que induz a atividade de uma MAP quinase (Zhang et al., 2020). A ativação da via de sinalização da MAP quinase é uma resposta comum durante o estresse hídrico. Durante o déficit hídrico, a planta percebe a falta de água e inicia uma cascata de eventos de sinalização intracelular. Isso resulta na ativação da MAP quinase através de fosforilação. A ativação da MAP quinase desencadeia várias respostas fisiológicas e bioquímicas em plantas expostas ao déficit hídrico (Wang et al., 2014). Essas respostas incluem a regulação da expressão gênica de genes envolvidos na resposta ao estresse, a produção de moléculas antioxidantes para lidar com o estresse oxidativo, a regulação da abertura e fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água por transpiração, entre outras (Ning et al., 2010). Vale salientar que a tolerância está relacionada à capacidade de resistir a variações ou adversidades sem perda significativa no desempenho, enquanto a responsividade está relacionada à capacidade de responder prontamente e de forma eficiente às mudanças ou estímulos. Além disso, a atividade da MAP quinase está associada a respostas específicas do sistema radicular em plantas submetidas ao déficit hídrico. A MAP quinase desempenha um papel importante na modulação do crescimento radicular, no desenvolvimento de raízes laterais e na resposta às mudanças nas condições de disponibilidade de água no solo.

O gene *Zm00001d011765* também identificado no caráter SD influencia na formação de clorofila e, conseqüentemente, na fotossíntese (Von Elbe, 2000; Taiz et al., 2017). Um dos principais efeitos do déficit hídrico na clorofila é a redução na sua concentração. Isso ocorre porque a falta de água afeta a atividade enzimática envolvida na biossíntese de clorofila, resultando em uma diminuição na produção dessa molécula. Como a

clorofila é essencial para a absorção de luz e a conversão de energia, a redução na sua concentração pode levar a uma diminuição na eficiência fotossintética (Chiango et al., 2021). Outro gene simultâneo associado ao SD é o *Zm00001d053244* que está relacionado com a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e participa de uma sinalização celular necessária à resposta da planta (Fernandez et al., 2004). O déficit hídrico pode afetar a hidrólise de ATP e ter impactos nas atividades celulares. O ATP é a principal molécula de energia utilizada pelas células. A disponibilidade limitada de água pode levar a alterações nas atividades celulares e nos processos metabólicos. A hidrólise de ATP pode ser afetada de várias maneiras, ocasionando redução da sua eficiência no déficit hídrico. Isso pode ter consequências negativas para a produção de energia nas células, afetando diretamente a atividade metabólica, o crescimento e a sobrevivência das plantas (Xu et al., 2022). Vale salientar que a tolerância está relacionada à capacidade de resistir a variações ou adversidades sem perda significativa no desempenho, enquanto a responsividade está relacionada à capacidade de responder e sinalizar prontamente e de forma eficiente às mudanças ou estímulos.

Já o gene *Zm00001d024468* foi identificado no caráter LRA e está envolvido na regulação gênica em nível de transcrição, esse é um dos principais pontos no controle dos processos biológicos, sendo que os fatores de transcrição desempenham um papel fundamental nesse processo. A taxa de transcrição de um gene é importante determinante na expressão do etileno, os mecanismos moleculares pelos quais a transcrição gênica é regulada têm interesse crescente e têm se tornado um dos tópicos principais de estudos em genética molecular envolvendo o etileno (Ito et al., 2012). Durante o déficit hídrico, a produção de etileno pode ser aumentada como parte da resposta adaptativa das plantas à condição de estresse. Conferindo assim uma resposta imediata frente a mudança ambiental. Uma das funções do etileno durante o déficit hídrico é a regulação do fechamento dos estômatos. Os estômatos são pequenas aberturas presentes nas folhas e nos caules das plantas, responsáveis pela troca de gases, como dióxido de carbono e oxigênio, entre a planta e o ambiente. Durante o déficit hídrico, a planta precisa conservar a água e reduzir a perda por transpiração. Nesse contexto, o aumento na produção de etileno pode levar ao fechamento dos estômatos, reduzindo assim a perda de água por transpiração. O que corresponde a uma forma de tolerância, tendo em vista que a planta busca resistir a condição. Além disso, o etileno também está envolvido na regulação de várias respostas adaptativas ao déficit hídrico (Nazar et al., 2015). Ele pode induzir a síntese de proteínas de estresse, como as proteínas de resposta ao estresse que desempenham um papel na proteção das células vegetais contra os danos causados pelo estresse hídrico, o que reforça o efeito responsivo do gene.

#### 4.5 Aplicações no melhoramento vegetal

Pode-se observar a associação significativa de diversos genes com diferentes caracteres nas duas condições hídricas tanto de intercepto como de slope. Diante disso, os genes que apresentaram relação para mais de um caráter no trabalho sugerem a ocorrência de efeito pleiotrópico, como é possível verificar para o gene *Zm00001d048702* que mais se repetiu e foi identificado tanto para caracteres no componente do intercepto como para outros no slope. Assim, esse gene influencia na resposta das plantas à tolerância como na responsividade.

Os genes associados à responsividade e tolerância ao déficit hídrico têm um enorme potencial biotecnológico, especialmente à medida que as preocupações com a mudança climática e a escassez de água aumentam. A biotecnologia desempenha um papel fundamental na manipulação desses genes para desenvolver plantas mais adaptadas a ambientes com disponibilidade limitada de água (Nawaz et al., 2023).

A identificação e caracterização de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico permitem aos cientistas criar plantas geneticamente modificadas que exibem características de melhor adaptação a condição. Isso pode ser feito através da inserção de genes que regulam os mecanismos de resposta ao estresse hídrico, como a regulação da abertura estomática, a acumulação de compostos osmoprotetores e a proteção contra danos oxidativos (Doron et al., 2020).

Além disso, a aplicação biotecnológica pode ser usada para desenvolver plantas que sejam mais eficientes no uso da água, reduzindo a quantidade de água necessária para um crescimento saudável (Wei et al., 2022). Isso pode incluir a modificação de genes relacionados à transpiração, evitando a perda excessiva de água, bem como a melhoria da absorção e retenção de água pelas raízes.

Ademais, SNPs detectados mostram que existem efeitos de diversos genes nos caracteres estudados, o que reforça a ideia de caracteres complexos para expressar o efeito (Spitkó et al., 2014). Assim, dados referentes as respostas de tolerância e responsividade dos caracteres das plantas de milho e a identificação de genes-chave em condições de déficit hídrico é fundamental aos programas de melhoramento, pois contribuem para que sejam desenvolvidas estratégias mais pontuais e mais eficazes de seleção para a condição de interesse.

As informações obtidas neste trabalho possibilitarão realizar seleções mais assertivas. Tendo em vista que podem subsidiar programas de melhoramento que visam

implementar seleção genômica, edição genômica (como CRISPR) ou tecnologias de genotipagem como é o caso da KASPTM (Kompetitive allele specific PCR) que busquem obtenção de cultivares destinados a condição de estresse hídrico com redução de custos ao processo de avaliação. Isso tanto para cultivares tolerantes como também para cultivares mais responsivas.

Dessa forma, também pode-se selecionar indivíduos através das marcas obtidas nesse estudo em condições experimentais ideais, sem precisar impor um déficit hídrico e realizar avaliações destrutivas, o que conseqüentemente, permite dobrar o controle parental buscando tornar maiores as chances de se identificar genótipos superiores.

#### 4 CONCLUSÃO

Foram identificados 25 SNPs em associação a todos os caracteres avaliados de milho tropical em disponibilidade ideal de água e déficit hídrico para intercepto e slope. Eles explicam no intercepto para cada caráter 40% (PH), 57% (SD), 67% (SPAD), 40% (LRL), 44% (LRA) e para slope explicam 62% (PH), 67% (SD), 30% (SPAD), 61% (LRL), 43% (LRA). Sendo que cinco foram comuns a ambas as condições. Esses genes mostraram respostas fisiológicas, moleculares e mecanismos sinalizadores associados tanto a tolerância ao déficit hídrico como também a responsividade que podem ser utilizadas em estudos posteriores bem como em programas de melhoramento com objetivo de obter cultivares adaptados a condições de estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

- AGUILAR-MARTÍNEZ, J. A.; POZA-CARRIÓN, C.; CUBAS, P. Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. **Plant Cell**, [s.l.], v.19, n.2, p.458–472, 2007.
- AGUIRRE-BECERRA, H.; VAZQUEZ-HERNANDEZ, M. C.; SAENZ DE LA O, D.; ALVARADO-MARIANA, A.; GUEVARA-GONZALEZ, R. G.; GARCIA-TREJO, J.F.; FEREGRINO-PEREZ, A. A. Role of stress and defense in plant secondary metabolites production. In: Pal D, Nayak AK. **Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications**, [s.l.], v.140, p.151-195, 2021.
- AHMED, N.; RAHMAN, K.; RAHMAN, M.; SATHI, K. S.; ALAM, M. M.; NAHAR, K.; ISLAM, M. S.; HASANUZZAMAN, M. Insight into the thiourea-induced drought tolerance in two chickpea varieties: Regulation of osmoprotection, reactive oxygen species metabolism and glyoxalase system. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v.167, p.449-458, 2021.
- ALVES, A. A. C.; SETTER, T. L. Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.259–271, 2004.
- BRADSHAW, A. D. Unravelling phenotypic plasticity – why should we bother? **New Phytologist**, v.170, n.4, p.644-648, 2006.
- BRAYER, K. J.; SEGAL, D. J. Keep Your Fingers Off My DNA: Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.50, 2008.
- BROWNING, B.L.; ZHOU, Y.; BROWNING, S. R. A one-penny imputed genome from next-generation reference panels. **American journal of human genetics**, v.103, n.3, p.338-348, 2018.
- CANO-GAMEZ, E.; TRYNKKA, G. From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. **Frontiers in Genetics**, v.11, n.424, p.1-24, 2020.
- CHEN, H.; BOUTROS, P. C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. **BMC Bioinformatics**, v.12, n.35, p.1-7, 2011.
- CHIANGO, H.; FIGUEIREDO, A.; SOUSA, L.; SINCLAIR, T.; SILVA, J. M. Assessing drought tolerance of traditional maize genotypes of Mozambique using chlorophyll fluorescence parameters. **South African Journal of Botany**, v.138, p.311-317, 2021.
- COSTA-NETO, G.; CROSSA, J.; FRITSCHÉ-NETO, R. Enviromic assembly increases accuracy and reduces costs of the genomic prediction for yield plasticity. **Frontiers in plant science**, v.12, n.717552, p.1-21, 2021a.
- COSTA-NETO, G.; FRITSCHÉ-NETO, R.; CROSSA, J. Nonlinear kernels, dominance, and envirotyping data increase the accuracy of genome-based prediction in multi-environment trials. **Heredity**, v.126, n.1, p.92-106, 2020.

COSTA-NETO, G.; GALLI, G.; CARVALHO, H. F.; CROSSA, J.; FRITSCHÉ-NETO, R. EnvRtype: a software to interplay enviromics and quantitative genomics in agriculture. **G3: Genes - Genomes - Genetics**, v.11, n.4, p.1-20, 2021b.

COVARRUBIAS-PAZARAN, G. Genome assisted prediction of quantitative traits using the R package sommer. **PLoS ONE**, v. 11, p.1-15, 2016.

CLARK, S.; VAN DER WERF, J. V. D. Genomic best linear unbiased prediction (gBLUP) for the estimation of genomic breeding values. **Methods in Molecular Biology**, v.1019, p.321-330, 2013.

DA, Y.; WANG, C.; WANG, S.; HU, G. Mixed Model Methods for Genomic Prediction and Variance Component Estimation of Additive and Dominance Effects Using SNP Markers. **Plos One**, v.9, n.1, p.1-11, 2014.

DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H. J.; DE WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, v.30, 2000.

DORON, L.; XU, L.; RACHMILEVITCH, S.; STERN, D. B. Transgenic overexpression of rubisco subunits and the assembly factor RAF1 are beneficial to recovery from drought stress in maize. **Environmental and Experimental Botany**, v.177, n.104126, 2020.

DUAN, M.; GUO, Z.; ZHANG, X.; WANG, C. Influences of different environmental covariates on county-scale soil type identification using remote sensing images. **Ecological Indicators**, v.139, n.10951, 2022.

EBERHART, S. A.; RUSSELL, W. A. Stability parameters for comparing varieties. **Crop Science**, v.6, n.1, p.36-40, 1966.

EILERS, P.H.C.; MARX, B.D. Practical Smoothing, The Joys of P-splines. **Cambridge University Press**, 2021. 209 p.

FAROOQ, A.; BUKHARI, S. A.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M.; WIJAYA, L.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. Exogenously applied ascorbic acid-mediated changes in osmoprotection and oxidative defense system enhanced water stress tolerance in different cultivars of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). **Plants**, v.9, n.1, p.104-119, 2020.

FENG, D.; WANG, R.; SUN, X.; LIU, L.; LIU, P.; TANG, J.; ZHANG, C.; LIU, H. Heavy metal stress in plants: Ways to alleviate with exogenous substances. **Science of the Total Environment**, v.897, n.165397, p.1-16, 2023.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M.; PETITOT, A.; SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, v.5, 2004.

FINLAY, K. W.; WILKINSON, G. N. The analysis of adaptation in a plant breeding programme. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.14, p.742-754, 1963.

Fritsche-Neto, R.; DoVale, J. C. Breeding for Stress-Tolerance or Resource-Use Efficiency?. In: Roberto Fritsche-Neto; Aluizio Borém. (Org.). **Plant Breeding for Abiotic Stress**

**Tolerance.** 1ed, v.1, p.13-19. 2012.

GALGAYE, G. G.; DERESA, H. K. Effect of garlic genotypes (*Allium sativum* L.) on phenotype, growth, yield-related attributes, and nutritional quality at Bule Hora agro-ecology. **Heliyon**, v.9, n.6, p.1-10, 2023.

GAUDET, P.; LIVSTONE, M. S.; LEWIS, S. E.; THOMAS, P. D. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. **Briefings In Bioinformatics**, v.12, n.5, p.449-462, 2011.

GHOLAMI, H. R.; MOHSENI, M. Síntese, caracterização de Atividades Antibacterianas e antioxidantes de novas benzoxazinonas e benzoxatiinonas. **Jornal de Química Heterocíclica**, v.56, n.5, p.1505-1513, 2019.

GILL, S. S.; TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

GUO, T.; LI, X. Machine learning for predicting phenotype from genotype and environment. **Current Opinion in Biotechnology**, v.79, n.102853, p.1-6, 2023.

GUO, T.; MU, Q.; WANG, J.; VANOUS, A. E.; ONOGI, A.; IWATA, H.; LI, X.; YU, J. Dynamic effects of interacting genes underlying rice flowering-time phenotypic plasticity and global adaptation. **Genome Research**, v.30, p.673-683, 2020.

HAN, B.; HUANG, X. Sequencing-based genome-wide association study in rice. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n.2, p.133-138, 2013.

IBAÑEZ, V. N.; MASUELLI, R. W.; MARFIL, C. F. Environmentally induced phenotypic plasticity and DNA methylation changes in a wild potato growing in two contrasting Andean experimental gardens. **Genetics Society**, v.126, n.1, p.50-62, 2021.

ITO, T. M.; RAMPIM, M. C.; POLIDO, P. B.; SOUZA, S. G. H. Fatores de transcrição da família P2/ERF e resposta em plantas aos estresses abióticos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, v.15, n.2, p.207-214, 2012.

JANDER, G.; JOSHI, V. Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. **Molecular Plant** v.3, n.1, p.54-65, 2010.

JONG, G. Quantitative Genetics of Reaction Norms. **Journal of evolutionary biology**, v.3, p.447-468, 1990.

KESARI, P.; PATIL, D. N.; KUMAR, P.; TOMAR, S.; SHARMA, A. K.; KUMAR, P. Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. **Proteomics**, v.15, n.10, p.1693-1705, 2015.

KHOUDI, H. Significance of vacuolar proton pumps and metal/H<sup>+</sup> antiporters in plant heavy metal tolerance. *Physiologia Plantarum*, v.173, n.1, p.384-393, 2021.

KOVURI, P.; YADAV, A.; SINHA, H. Role of genetic architecture in phenotypic plasticity. **Trends in Genetics**, v.39, n.9, p.703-714, 2023.

LARSSON, C. M.; INGEMARSSON, B. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants.

In: WRAY, J.L., KINGHORN, J.R. Molecular and genetics aspects of nitrate assimilation. Oxford: **Oxford Science**, 1989. 3-14 p.

LASKY, J. R.; HOOTEN, M. B.; ADLER, P. B. What processes must we understand to forecast regional-scale population dynamics? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.287, n.20202219, p.1-12, 2020.

LI, H.; WANG, H.; FANG, Q.; JIA, B.; LI, D.; HE, J.; LI, R. Effects of irrigation and nitrogen application on NO<sub>3</sub>-N distribution in soil, nitrogen absorption, utilization and translocation by winter wheat. **Agricultural Water Management**, v.276, n.108058, p.1-13, 2023.

LIU, S.; LI, C.; WANG, H.; WANG, S.; YANG, S.; LIU, X.; YAN, J.; LI, B.; BEATTY, M.; ZASTROW-HAYES, G.; SONG, S.; QIN, F. Mapping regulatory variants controlling gene expression in drought response and tolerance in maize. **Genome Biol**, v.21, n.163, p.1-22, 2020.

LIU, T. Y.; YE, N. H.; SONG, T.; CAO, Y. Y.; GAO, B.; ZHANG, D.; ZHU, F. Y.; CHEN, M. X.; ZHANG, Y. J.; XU, W. F.; ZHANG, J. H. Rhizosheath formation and involvement in foxtail millet (*Setaria italica*) root growth under drought stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.61, n.4, p.449-462, 2018.

LIU, X.; HUANG, M.; FAN, B.; BUCKLER, E. S.; ZHANG, Z. Iterative Usage of Fixed and Random Effect Models for Powerful and Efficient Genome-Wide Association Studies. **PLoS Genetics**, v.12, n.2, p.1-24, 2016.

LIU, Y.; CAO, L.; WU, X.; WANG, S.; ZHANG, P.; LI, M.; JIANG, J.; DING, X.; CAO, X. Functional characterization of wild soybean (*Glycine soja*) GsSnRK1.1 protein kinase in plant resistance to abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v.280, n.153881, p.1-12, 2023.

MARTÍNEZ-NAVARRO, A. C.; CHAMORRO-FLORES, A.; VÁZQUEZ-BUSTOS, G.; RÍOS-MELÉNDEZ, S.; VILLALOBOS-LÓPEZ, M. A.; OMAR PANTOJA, D. O.; ARROYO-BECERRA, A. Tráfico vesicular, un viaje épico de las proteínas hacia la membrana. **Alianzas y tendencias buap**, v.7, n.28, p.1-38, 2022.

MARTINS, J. K. S. S.; OLIVEIRA, A. F. M.; ALMEIDA, J. S. Variação sazonal das redes de interações planta-artrópodes em Floresta Tropical Sazonalmente Seca. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.13, n.6, p.2671-2713, 2020.

MIRANDA-JACOMÉ, A.; MONTAÑA, C.; FORNONI, J. Environmentally dependent expression of heritable variation on early recruitment traits induced by light conditions and provenance in the columnar cactus *Pilosocereus leucocephalus*. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.16, n.6, p.322-330, 2014.

MITI, F.; TONGOONA, P.; DERERA, J. S1 selection of local maize landraces for low soil nitrogen tolerance in Zambia. **African Journal of Plant Science**, v.4, n.3, p.67-81, 2010.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v. 74, n.6842, p.562-564, 1982.

NAIR, M. G.; WHITENACK, C. J.; PUTNAM, A. R. 2,2'-oxo-1,1'-azobenzene a microbially transformed allelochemical from 2,3- benzoxazolinone. **Journal of Chemical Ecology**, v.16,

1990.

NAWAZ, A. F.; ZIA, M. A.; SHOUKAT, S.; ARIF, M.; ALI, S. Genome-wide identification and expression analysis of the Glutamine synthetase family genes in *Zea mays* under drought stress. **Plant Stress**, v.9, n.100180, p.1-12, 2023.

NAZAR, R.; UMAR, S.; KHAN, N. A.; SAREER, O. Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African Journal of Botany**, v.98, p.84-94, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. 2003. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 3 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2003. 975 p.

NING, J.; LI, X.; HICKS, L. M.; XIONG, L. A Raf-Like MAPKKK Gene DSM1 Mediates Drought Resistance through Reactive Oxygen Species Scavenging in Rice. **Plant Physiology**, v.152, n.2, p.876-890, 2010.

R CORE TEAM (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna.

REMANNS, T.; NACRY, P.; PERVENT, M.; FILLEUR, S.; DIATLOFF, E.; MOUNIER, E.; TILLARD, P.; FORDE, B. G.; GOJON, A. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Biological Sciences**, v.103, n.50, p.19206-19211, 2006.

REN, J.; YANG, X.; MA, C.; WANG, Y.; ZHAO, J. Melatonin enhances drought stress tolerance in maize through coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.167, p.958-969, 2021.

RESENDE, R. T.; PIEPHO, H. P.; G. J. M.; SILVA-JUNIOR, O. B.; SILVA, F. F.; RESENDE, M. D. V.; GRATAPAGLIA, D. Enviromics in breeding: applications and perspectives on envirotypic-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.134, n.1, p.95-112, 2021.

RODRIGUEZ-ALVAREZ, M. X; BOER, M. P.; VAN EEUWIJK, F. A.; EILERS, P. H. C. Correcting for spatial heterogeneity in plant breeding experiments with P-splines. **Spatial Statistics**, v.23, 2018.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, 1990.

SEOK, H. Y.; WOO, D. H.; PARK, H. Y.; LEE, S. Y.; TRAN, H. T.; LEE, E. H.; NGUYEN, L. V.; MOON, Y. H. AtC3H17, a non-tandem CCCH zinc finger protein, functions as a nuclear transcriptional activator and has pleiotropic effects on vegetative development, flowering and seed development in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v.57, n.3, 603-615, 2016.

SHARMA, L.; DALAL, M.; VERMA, R. K.; KUMAR, S. V. V.; YADAV, S. K.; PUSHKAR, S.; KUSHWAHA, S. R.; BHOWMIK, A.; CHINNUSAMY, V. Auxin protects spikelet fertility and grain yield under drought and heat stress in rice. **Environmental and Experimental Botany**, v.150, p.9-24, 2018.

SHI, X. M.; QI, J. H.; LIU, A. X.; ZAKAEI, S.; SONG, L. Leaf phenotypic plasticity coupled with integration facilitates the adaptation of plants to enhanced N deposition. **Environmental Pollution**, v.327, n.121570, p.1-11, 2023.

SHUKLA, V.; MATTOO, A. K. Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2): a family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signaling. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.14, 2008.

SICKER, D.; FREY, M.; SCHULZ, M.; GIERL, A. Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. **International Review of Cytology**, v.198, p.319-346, 2000.

SICKER, D.; SCHULZ, M. Benzoxazinones in plants: Occurrence, synthetic access, and biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.27, p.185-232, 2002.

SIECIŃSKA, J.; WIĄCEK, D.; PRZYSUCHA, B.; NOSALEWICZ, A. Drought in acid soil increases aluminum toxicity especially of the Al-sensitive wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v.165, n.1, p.185-195, 2019.

SPARKS, A. nasapower: A NASA POWER Global Meteorology, Surface Solar Energy and Climatology Data Client for R. **Journal of open source software**, v.3, n.30, p.1-3, 2018.

SPITKÓ, T.; NAGY, Z.; ZSUBORI, Z. T.; HALMOS, G.; BÁNYAI, J.; MARTON, C. L. Effect of drought on yield components of maize hybrids (*Zea mays* L.). **Maydica**, v.59, n.2, p.161-169, 2014.

SRIVASTAVA, A. K.; DUTTA, S.; CHATTOPADHYAY, S. MYC2 regulates ARR16, a component of cytokinin signaling pathways, in Arabidopsis seedling development. **Plant Direct**, v.3, n.11, p.1-13, 2019.

SRIVASTAVA, D.; VERMA, G.; CHAWDA, K.; CHAUHAN, A. S.; PANDE, V.; CHAKRABARTY, D. Overexpression of Asr6, abscisic acid stress-ripening protein, enhances drought tolerance and modulates gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v.202, n.105005, p.1-14, 2022.

SRIDHAR, V. V.; SURENDRARAO, A.; GONZALEZ, D.; CONLAN, R. S.; LIU, Z. Transcriptional repression of target genes by LEUNIG and SEUSS, two interacting regulatory proteins for Arabidopsis flower development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.31, p.11494-11499, 2004.

SUE, M.; NAKAMURA, C.; NOMURA, T. Dispersed Benzoxazinone Gene Cluster: Molecular Characterization and Chromosomal Localization of Glucosyltransferase and Glucosidase Genes in Wheat and Rye. **Plant Physiology**, v. 157, 2011.

TODD, J.; PAN, Y.-B.; KIMBENG, C.; DUFRENE JR., E.; WAGUESPACK JR., H.; PONTIF, M. Analysis of genotype by environment interaction in Louisiana sugarcane research plots by GGE biplots. **Sugar Tech**, v.20, n.4, p.1-13, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. 6 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 858 p.

TRACHSEL, S.; MESSMER, R.; STAMP, P.; ANDREAS HUND, A. Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. **Theoretical and applied genetics**, v.119, n.8,

p.1413-1424, 2009.

UCHIDA, T.; MYERS JR, M. G.; WHITE, M. F. IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, 2000.

UL-ALLAH, S.; HUSSAIN, S.; MUMTAZ, R.; NAEEM, M.; SATARA, A.; SHER, A.; IJAZ, M.; AZEEM, A.; HASSAN, Z.; AHMED, K.; REHMAN, A. U.; HUSSAIN, I.; ABBAS, N.; UR, S.; ALHARBI, S. A.; ALFARRAJ, S.; ANSARI, M. J. Phenotypic characterization of wheat germplasm for heritability and dissection of association among post anthesis traits under variable sowing dates. **Journal of King Saud University – Science**, v.35, n.102578, p.1-10, 2023.

ULLAH, S.; AFZAL, I.; SHUMAILA, S.; SHAH, W. Effect of naphthyl acetic acid foliar spray on the physiological mechanism of drought stress tolerance in maize (*Zea Mays L.*). **Plant Stress**, v.2, n.100035, p.1-11, 2021.

UNTERSEER, S.; BAUER, E.; HABERER, G.; SEIDEL, M.; KNAAK, C.; OUZUNOVA, M.; MEITINGER, T.; STROM, T. M.; FRIES, R.; PAUSCH, H.; BERTANI, C.; DAVASSI, A.; MAYER, K. F.; SCHÖN, C. C. A powerful tool for genome analysis in maize: development and evaluation of the high density 600 k SNP genotyping array. **BMC Genomics**, v.15, n.823, p.1-15, 2014.

VAN EEUWIJK, F. A.; BUSTOS-KORTS, D.; MILLET, E. J.; BOER, MARTIN P.; KRUIJER, W.; THOMPSON, A.; MALOSETTI, M.; IWATA, H.; QUIROZ, R.; KUPPE, C.; MULLER, O.; BLAZAKIS, K. N.; YU, K.; TARDIEU, F.; CHAPMAN, S. C. Modelling strategies for assessing and increasing the effectiveness of new phenotyping techniques in plant breeding. **Plant Science**, v.282, p.23-29, 2019.

VANRADEN, P. M. Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.11, p.4414-4423, 2008.

VON ELBE J. H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. Química de los alimentos. 2. ed. Zaragoza: **Wisconsin - Madison**, 2000. 782-799 p.

WANG, L.; SU, H.; HAN, L.; WANG, C.; SUN, Y.; LIU, F. Differential expression profiles of poplar MAP kinase kinases in response to abiotic stresses and plant hormones, and overexpression of PtMKK4 improves the drought tolerance of poplar. **Gene**, v.545, n.1, p.141-148, 2014.

WANG, Y.; WANG, J.; GUO, H.; WU, X.; HAO, M.; ZHANG, R. Integrative transcriptome and metabolome analysis reveals the mechanism of exogenous melatonin alleviating drought stress in maize roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.199, n.107723, p.1-14, 2023.

WEI, Z.; ABDELHAKIM, L. O. A.; FANG, L.; PENG, X.; LIU, J.; LIU, F. Elevated CO<sub>2</sub> effect on the response of stomatal control and water use efficiency in amaranth and maize plants to progressive drought stress. **Agricultural Water Management**, v.266, n.107609, 2022.

WICKHAM, H. ggplot2. **WIREs Computational Statistics**, v.3, n.2, p.180-185, 2011.

WOLTERECK, R. weitere experimentelle Untersuchungen über Artveränderung, speziell über

das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. **Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft**, v.19, p.110-172, 1909.

XIAO, L.; MIN, X.; LIU, G.; LI, P.; XUE, S. Effect of plant–plant interactions and drought stress on the response of soil nutrient contents, enzyme activities and microbial metabolic limitations. **Applied Soil Ecology**, v.181, n.104666, p.1-11, 2023.

XU, J.; GUO, L.; LIU, L. Exogenous silicon alleviates drought stress in maize by improving growth, photosynthetic and antioxidant metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v.201, n.104974, p.1-19, 2022.

XU, Y. Envirotyping for deciphering environmental impacts on crop plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v.129, n.4, p.653-673, 2016.

YASSUE, R. M.; CARVALHO, H. F.; GEVARTOSKY, R.; SABADIN, F.; SOUZA, P. H.; BONATELLI, M. L.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C.; FRITSCHÉ-NETO, R. On the genetic architecture in a public tropical maize panel of the symbiosis between corn and plant growth-promoting bacteria aiming to improve plant resilience. **Molecular Breeding**, v.41, n.63, p.1-16, 2021.

YIN, L.; ZHANG, H.; TANG, Z.; XU, J.; YIN, D.; ZHANG, Z.; YUAN, X.; ZHU, M.; ZHAO, S.; LI, X.; LIU, X. rMVP: A Memory-efficient, Visualization-enhanced, and Parallel-accelerated Tool for Genome-wide Association Study. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v.19, n.4, p.619-628, 2021.

YU, T.; ZHANG, J.; CAO, J.; CAI, Q.; LI, X.; SUN, Y.; LI, S.; LI, Y.; HU, G.; CAO, S.; LIU, C.; WANG, G.; WANG, L.; DUAN, Y. Leaf transcriptomic response mediated by cold stress in two maize inbred lines with contrasting tolerance levels. **Genomics**, v.113, n.2, p.782-794, 2021.

ZERAATPISHEH, M.; GAROSI, Y.; REZA OWLIAIE, H.; AYOUBI, S.; TAGHIZADEH-MEHRJARDI, R.; SCHOLTEN, T.; XU, M. Improving the spatial prediction of soil organic carbon using environmental covariates selection: A comparison of a group of environmental covariates. **Catena**, v.208, n.105723, p.1-14, 2022.

ZHANG, H.; JING, X.; CHEN, Y.; LIU, Z.; XIN, Y.; QIAO, YUSHAN. The Genome-Wide Analysis of RALF-Like Genes in Strawberry (Wild and Cultivated) and Five Other Plant Species (Rosaceae). **Genes**, v.11, n.174, p.1-19, 2020.

ZHANG, P.; YUAN, Z.; WEI, L.; QIU, X.; WANG, G.; LIU, Z.; FU, J.; CAO, L.; WANG, T. Overexpression of ZmPP2C55 positively enhances tolerance to drought stress in transgenic maize plants. **Plant Science**, v.314, n.111127, p.1-9, 2022.

ZHENG, H. G.; BABU, R. C.; PATHAN, M. S.; ALI, M. L.; HUANG, N.; COURTOIS, B.; NGUYEN, H. T. Quantitative trait loci for root penetration ability and root thickness in rice: comparison of genetic backgrounds. **Genome**, v.43, n.1, p.53-61, 2000.

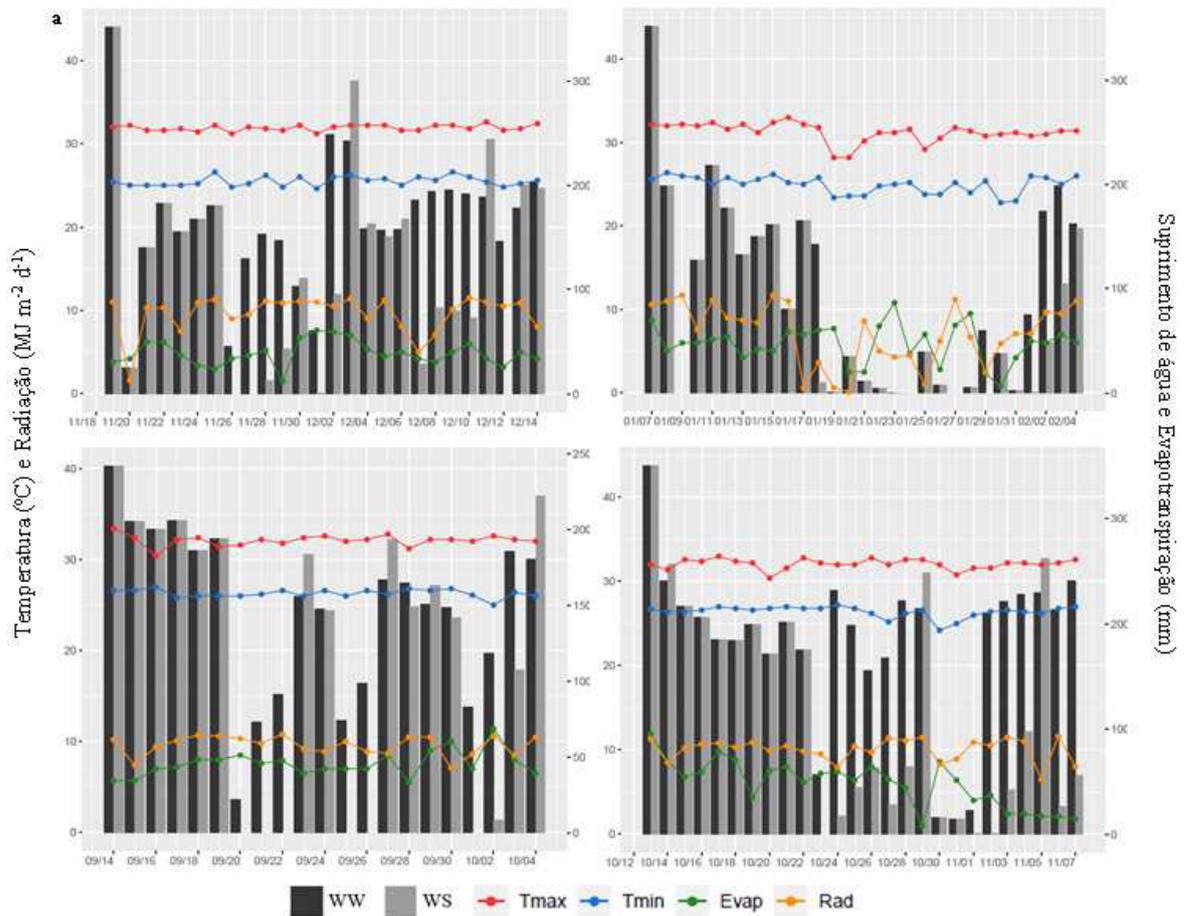
ZHENG, X.; LEVINE, D.; SHEN, J.; GOGARTEN, S. M.; LAURIE, C.; WEIR, B. S. A High-performance Computing Toolset for Relatedness and Principal Component Analysis of SNP Data. **Bioinformatics**, v.103, n.24, p.3326-3328, 2012.

Zhu, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant**

**Biology**. v.53, p.247-273, 2002.

ZIA, R.; NAWAZ, M. S.; SIDDIQUE, M. J.; HAKIM, S.; IMRAN, A. Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. **Microbiological Research**, v.242, n.126626, p.1-16, 2021.

## APÊNDICE A – LISTA DE FIGURAS E TABELAS

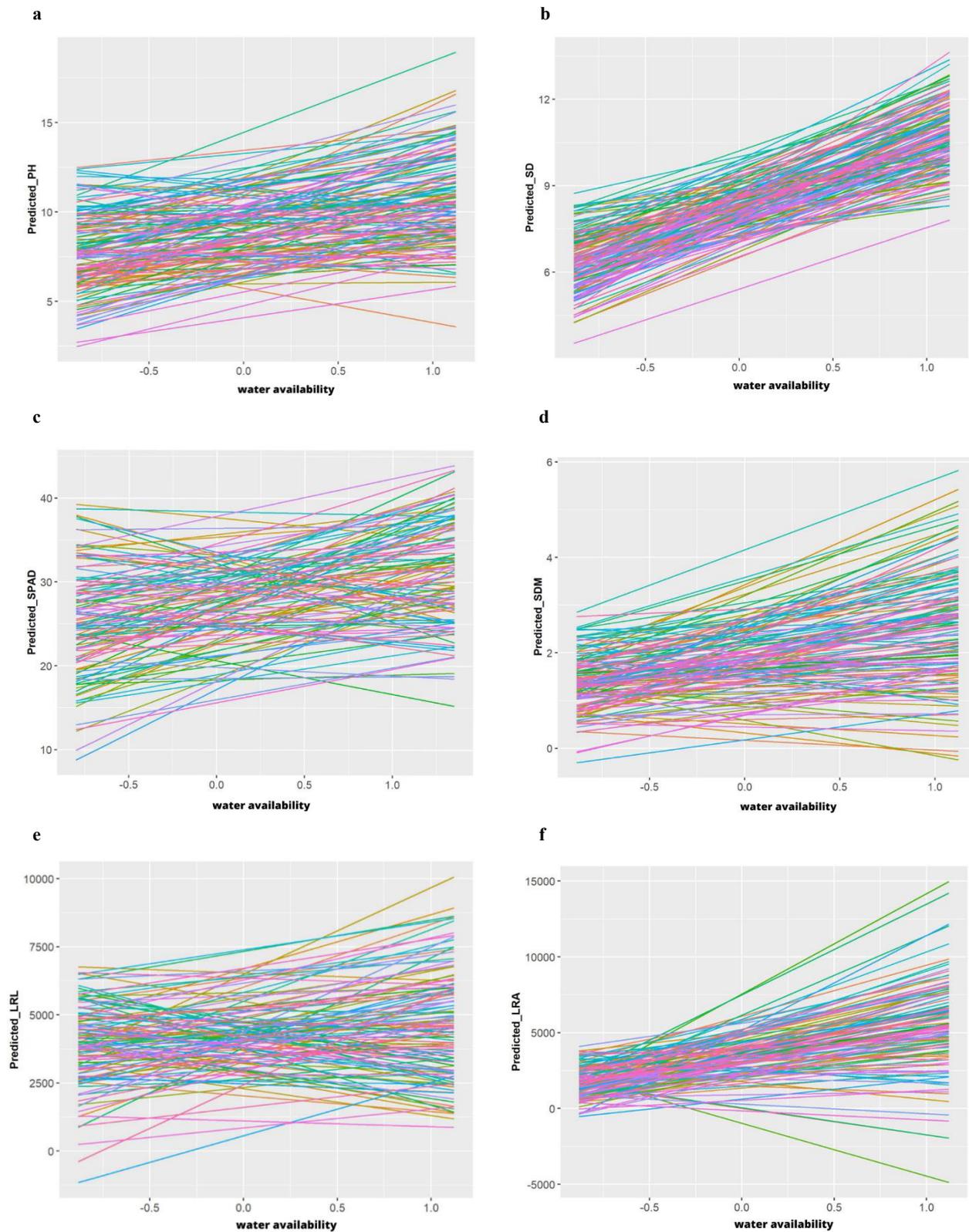


**Figura 1.** Variáveis climáticas coletadas durante a condução dos experimentos em níveis contrastantes de disponibilidade de água (WW e WS). Ensaio conduzido em 2020 (a e b) e 2021 (c e d). Tmax, temperatura máxima; Tmin, temperatura mínima; Evap, evapotranspiração; Rad, radiation.

**Tabela 1.** Teste da razão de verossimilhança (LRT) para o efeito de genótipo das análises de deviances individuais (por ambiente) e herdabilidades médias ( $h^2$ ) dos caracteres altura de planta (PH), diâmetro do colmo (SD), índice SPAD, massa seca de parte aérea (SDM), comprimento de raízes laterais (LRL) e axiais (LRA).

Ambiente	PH		SD		SPAD		SDM		LRL		LRA	
	LRT	$h^2$	LRT	$h^2$	LRT	$h^2$	LRT	$h^2$	LRT	$h^2$	LRT	$h^2$
WW_1	-4,227**	0,61	-2,777*	0,64	0,066	0,01	-0,482	0,21	-3,433*	0,48	-2,740*	0,69
WW_2	0,047	0,36	-1,721	0,01	-3,860**	0,21	-1,665	0,08	0,025	0,10	-0,383	0,17
WW_3	0,074	0,48	0,003	0,39	-3,236*	0,56	-0,856	0,36	3,421*	0,34	0,179	0,07
WW_4	-6,951***	0,71	-4,416**	0,68	-2,921*	0,50	0,987	0,43	4,194**	0,50	-3,342*	0,36
WS_1	-5,755**	0,59	5,074**	0,46	4,075**	0,62	0,067	0,32	3,061*	0,42	-3,311*	0,29
WS_2	-0,169	0,39	0,167	0,08	-3,617*	0,45	-0,657	0,29	-0,316	0,04	-0,712	0,17
WS_3	-0,894	0,07	-0,993	0,46	0,044	0,12	-1,305	0,21	1,097	0,16	-0,158	0,26
WS_4	3,039*	0,41	-2,834*	0,44	0,077	0,14	-0,448	0,25	3,097*	0,34	-3,408*	0,85

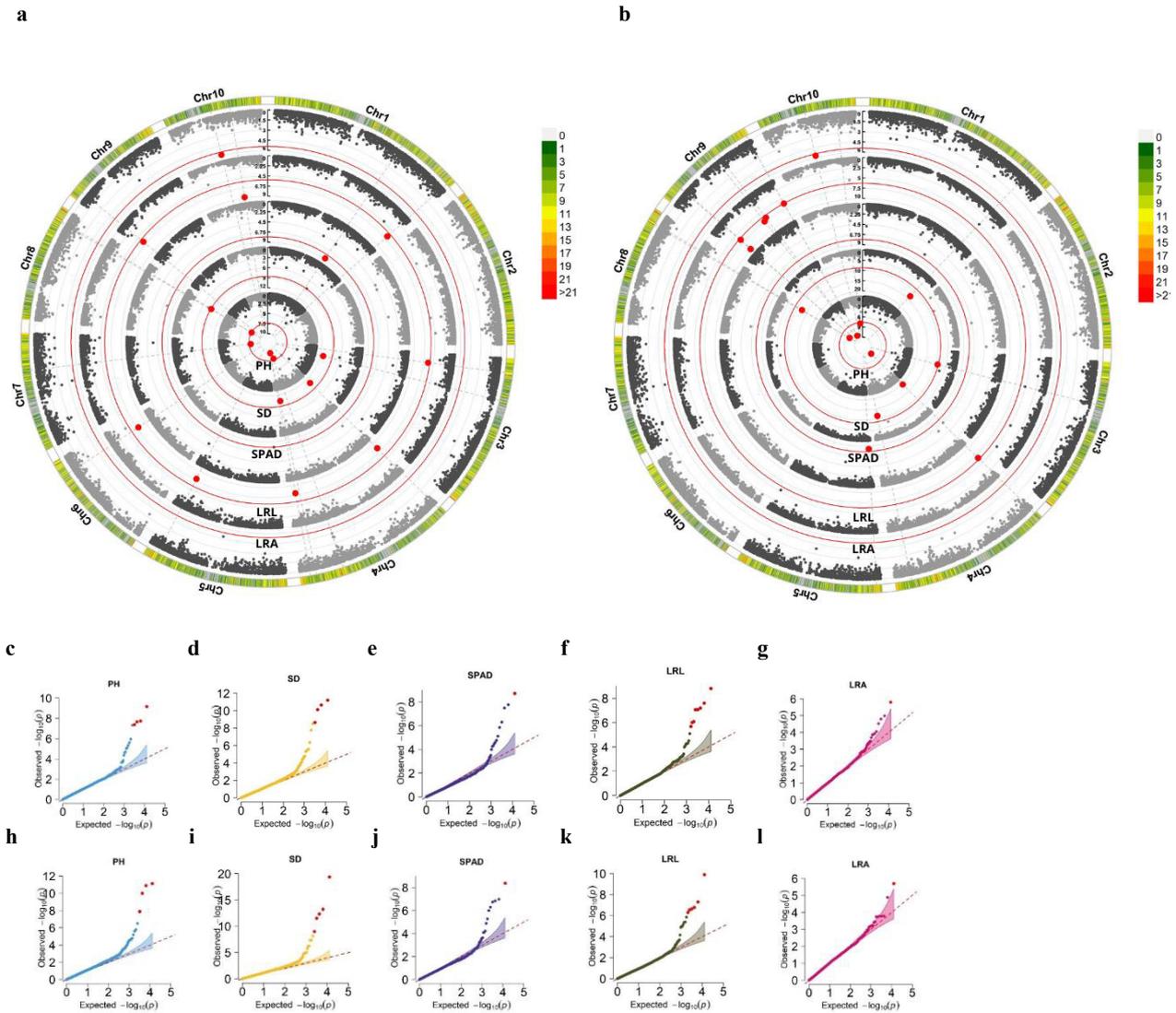
\*, \*\*, \*\*\*: significante ao nível de 0,1, 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste do  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade.



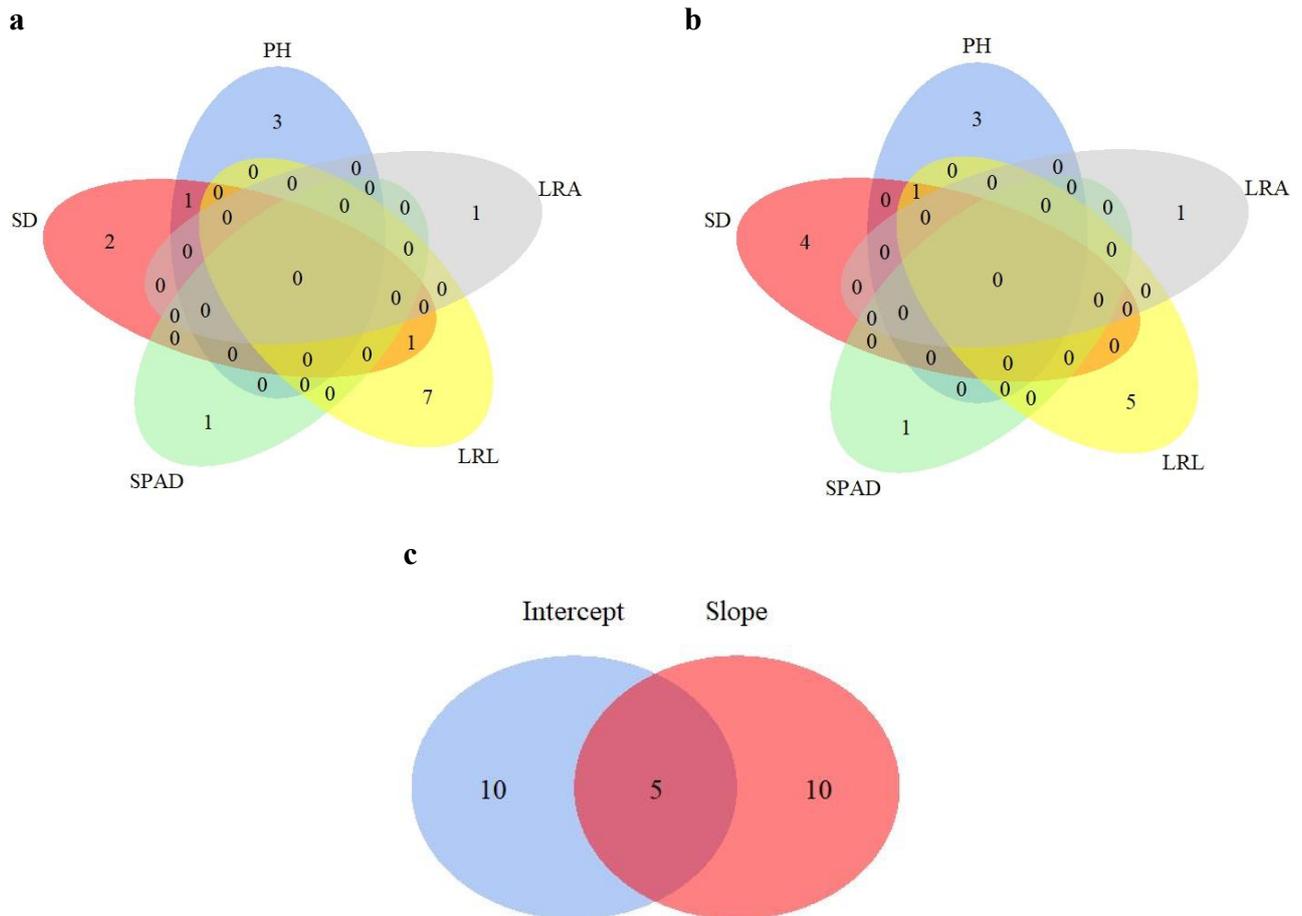
**Figura 2.** Normas de reação para: **a:** altura de plantas; **b:** diâmetro do colmo; **c:** índice SPAD; **d:** massa seca da parte aérea; **e:** raízes laterais; **f:** raízes axiais.

**Tabela 2.** Herdabilidades no sentido restrito (em %) dos caracteres sinalizadores de estresse hídrico altura de planta (PH), diâmetro do colmo (SD), índice SPAD, massa seca da parte aérea (SDM), comprimento de raízes axiais (LRA) e laterais (LRL) para os componentes de norma de reação intercepto e slope.

<b>Componente</b>	<b>PH</b>	<b>SD</b>	<b>SPAD</b>	<b>SDM</b>	<b>LRL</b>	<b>LRA</b>
Intercepto	39,1	47,2	45,2	56,6	32,5	30,5
Slope	8,8	3,4	2,2	0	14,7	5,8



**Figura 3.** SNPs significativos via análises de GWAS. Gráficos circulares (círculos concêntricos) de Manhattan das análises de associação dos caracteres PH, SD, SPAD, LRL, LRA nas condições de intercepto (a) e slope (b). As linhas contínuas em vermelho indicam o *threshold* para seu respectivo caráter. Os SNPs significativos (acima das linhas) foram marcados em vermelho. Gráficos quantil-quantil dos caracteres supramencionados sob condições intercepto (c, d, e, f, g) e slope (h, i, j, k, l), respectivamente.



**Figura 4.** Diagramas de Venn com o número de SNPs significativos associados a PH, SD, SPAD, LRL, LRA em intercepto (a), slope (b) e em comum as duas condições (c).

**Tabela 3.** Ponto, caráter, SNP, ID do gene candidato, cromossomo (Crm), posição física (Posi), P-valor, minor allele frequency (MAF) da variância explicada para cada SNP significativo, efeito de substituição alélica (ASE) e anotação de genes candidatos detectados pela análise GWAS para o intercepto e slope referentes a disponibilidade hídrica obtidos via normas de reação para cada linhagem.

Ponto	Caráter	Marca	Crm	Posi (bp)	$-\log_{10}(\text{p-value})$	MAF	ASE	$R_{SNP}^2$	$R_{TOT}^2$	Anotação putativa
Intercepto	PH	<i>Zm00001d052079</i>	4	178758358	7,66	0,13	-2,48	0,0004	0,40	Lisina-cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase1
		<i>Zm00001d053244</i>	4	221733436	9,17	0,12	2,71	0,0009		Proteína de resistência a doenças (classe TIR-NBS)
		<i>Zm00001d020603</i>	7	124341628	7,74	0,07	3,05	0,0004		Fator de iniciação eucariótica 4F subunidade p150 isoforma 1
		<i>Zm00001d011679</i>	8	158417406	7,38	0,39	1,83	0,0009		Transportador de nitrato de alta afinidade 2,5
	SD	<i>Zm00001d040803</i>	3	66922699	11,21	0,08	1,75	0,0009	0,57	Proteína RALF-like 33, fator de alcalinização rápida 1
		<i>Zm00001d048702</i>	4	3573987	10,64	0,12	2,63	0,0081		Síntese de benzoxazinona3
		<i>Zm00001d053244</i>	4	221733436	10,12	0,12	1,49	0,0009		Proteína de resistência a doenças (classe TIR-NBS)
		<i>Zm00001d011765</i>	8	161175083	8,65	0,20	1,46	0,0016		Aldeído oxigenase (desformilante), metilsterol monooxigenase 2-2
	SPAD	<i>Zm00001d032011</i>	1	209342052	6,80	0,06	24,96	0,0064	0,67	Proteína 4 semelhante a STIG1 específica para estigma
	LRL	<i>Zm00001d034703</i>	1	300277611	6,09	0,14	1275,1	0,0004	0,40	Proteína 2 contendo domínio interativo rico em AT
		<i>Zm00001d040002</i>	3	22478094	5,69	0,46	-909,4	0,0004		Proteína de tolerância a metais 10
		<i>Zm00001d048702</i>	4	3573987	7,60	0,14	2298,0	0,0036		Síntese de benzoxazinona3
		<i>Zm00001d053429</i>	4	231023375	7,20	0,20	1453,8	0,0009		AT-hook motif proteína nuclear localizada
		<i>Zm00001d017714</i>	5	205059342	7,08	0,43	1023,1	0,0009		Proteína NRT1/ FAMÍLIA PTR 8.3
		<i>Zm00001d038071</i>	6	146912777	7,06	0,27	-1212,3	0,0009		Proteína N-terminal glutamina amidohidrolase, Proteína NH2-terminal glutamina deamidase
		<i>Zm00001d045136</i>	9	14000424	6,01	0,27	-1033,2	0,0004		Proteína da superfamília facilitadora principal
<i>Zm00001d025082</i>		10	102925193	8,81	0,24	1334,8	0,0009	Proteína da família 10 da glicosil hidrolase		
LRA	<i>Zm00001d024468</i>	10	72231278	5,80	0,07	-2958,8	0,01	0,44	Fator de transcrição responsivo ao etileno semelhante ao AP2 AIL1	

Slope	PH	<i>Zm00001d048702</i>	4	3573987	10,89	0,13	6,12	0,0121	0,62	Síntese de benzoxazinona3
		<i>Zm00001d016345</i>	8	158417406	10,01	0,39	2,79	0,0025		Proteína não caracterizada
		<i>Zm00001d048410</i>	9	155790521	11,13	0,17	4,24	0,0049		Proteína relacionada a Ras RABF1
		<i>Zm00001d025472</i>	10	119894716	7,89	0,19	3,07	0,0016		Regulador de resposta de dois componentes ARR16
	SD	<i>Zm00001d033673</i>	1	270546340	13,23	0,10	2,52	0,0025	0,67	Fator de transcrição TEOSINTE BRANCHED 1
		<i>Zm00001d040803</i>	3	66922699	8,99	0,08	1,88	0,0004		Proteína RALF-like 33, fator de alcalinização rápida 1
		<i>Zm00001d048702</i>	4	3573987	19,37	0,13	4,21	0,0256		Síntese de benzoxazinona3
		<i>Zm00001d053244</i>	4	221733436	11,52	0,12	1,98	0,0009		Proteína de resistência a doenças (classe TIR-NBS)
		<i>Zm00001d011765</i>	8	161175083	12,32	0,20	1,80	0,0016		aldeído oxigenase (desformilante), metilsterol monooxigenase 2-2
	SPAD	<i>Zm00001d013288</i>	5	7913279	7,92	0,08	23,71	0,0025	0,30	Proteína da superfamília de proteína quinase
	LRL	<i>Zm00001d048702</i>	4	3573987	6,63	0,13	2440,6	0,0025	0,61	Síntese de benzoxazinona3
		<i>Zm00001d045534</i>	9	25757186	9,90	0,13	-2495,9	0,0025		Proteína da superfamília de exopeptidase dependente de Zn
		<i>Zm00001d045570</i>	9	27013113	6,54	0,09	2189,2	0,0009		Glicerolfosfato mutase
		<i>Zm00001d046561</i>	9	95969862	7,30	0,12	2076,2	0,0009		Proteína da superfamília de proteína quinase
		<i>Zm00001d046740</i>	9	103972420	6,78	0,31	1292,6	0,0004		Proteína contendo domínio CCCH de dedo de zinco 52
		<i>Zm00001d048421</i>	9	155968642	6,30	0,18	-1546,7	0,0004		Proteína contendo domínio PH
	LRA	<i>Zm00001d024468</i>	10	72231278	5,70	0,07	-3457,4	0,01	0,43	Fator de transcrição responsivo ao etileno semelhante ao AP2 AIL1