

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DETERMINAÇÃO DE QTLs EM GERAÇÕES AVANÇADAS DE
RETROCRUZAMENTOS EM MILHO (*Zea mays* L.)

Paula Wiethölter
Bióloga/UPF - Msc. Fitotecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Outubro de 2008

PAULA WIETHÖLTER
Bióloga - UPF
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

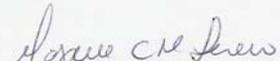
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

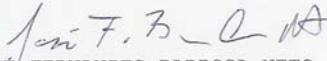
DOCTOR EM FITOTECNIA

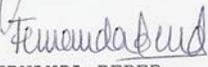
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

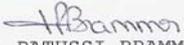
Aprovado em: 10.10.2008
Pela Banca Examinadora


MARIA JANE CRUZ DE MELO SERENO
Orientadora - PPG Fitotecnia


MARIA TERESA SCHIFINO-WITTMANN
PPG Fitotecnia

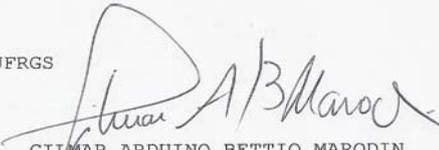

JOSE FERNANDES BARBOSA NETO
PPG Fitotecnia


FERNANDA BERED
PPG Genética e Biologia Molecular/UFRGS


SANDRA PATUSSI BRAMMER
EMBRAPA Trigo
Passo Fundo/RS

Homologado em: 25.11.2008
Por


PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia


GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Diretor da Faculdade
de Agronomia

*“Enquanto houver ciência e fé,
sempre haverá esperança”.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Jane Cruz de Melo Sereno por todos esses anos de orientação, apoio e amizade.

Ao professor Dr. José Fernandes Barbosa Neto, pela parceria de trabalho e de amizade estabelecidos durante o curso e pela participação na minha banca examinadora.

Aos meus pais, Sírio e Araci, por terem me mostrado, desde muito cedo, a importância da educação. Obrigada pelos ensinamentos, pelo estímulo e pelo apoio incondicionais durante toda a minha vida.

Ao meu amor, Ricardo, pelo amor, pelo apoio e pelo carinho com o qual sempre me ajudou, acompanhou e respeitou, por sempre ter me incentivado a ir em busca dos meus sonhos e também por ter esperado pacientemente a conclusão dessa etapa, para darmos início a um novo capítulo nas nossas vidas. Também agradeço a sua família, que será a minha também, pela compreensão durante esses anos de dedicação exclusiva ao estudo.

Aos meus irmãos, Daniela e André, por me ajudarem e me apoiarem em todos os momentos da minha vida, por entenderem o quanto a conclusão dessa etapa era importante para mim e por aceitarem a minha ausência principalmente nos momentos em que precisavam que eu estivesse mais perto. Também agradeço aos meus cunhados, Marcelo e Juliana e ao meu afilhado Matheus.

À Tatiana, pela sua admirável disponibilidade em me ajudar durante todos esses anos. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelo “transporte” aos experimentos, pela amizade que se estabeleceu e por ter estado presente sempre. Agradeço também ao Vitor que me ajudou muito no experimento final.

À Josana e à Thanise, pela disposição em me ajudar desde o início, seja no campo, na estufa ou no laboratório de citogenética e principalmente pela grande amizade que surgiu, dentro do trabalho, e que se refletiu para a vida.

À Fabiane, pela amizade e pela parceria durante os quase seis anos em que fomos colegas. Também agradeço muito pelo auxílio na etapa final do experimento na casa de vegetação, principalmente nos finais de semana.

À Luisa e ao Alexandre, pela amizade e pelos divertidos anos de convivência “em família”.

À Sibebe, minha prima, com quem tive a satisfação de morar nos últimos meses desse curso: simplesmente muito obrigada por tudo.

Aos bolsistas Álvaro, Carolina e Viviane, pela participação e ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura Fábio Martins Berndt e Jonatan Josué Anton e à professora Dra. Carla Andréa Delatorre, pela ajuda diante das dificuldades encontradas na execução do trabalho. Também agradeço a todos os demais colegas, professores e funcionários com quem tive a oportunidade de conviver durante esses anos e que de uma maneira ou de outra contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho. Em especial, agradeço ao funcionário Adroaldo Volthaire de Paula, pela atenção e dedicação ao meu experimento final.

Aos colegas do Departamento de Plantas Forrageiras, pela constante troca de conhecimentos e aos professores Dr. Miguel Dall’Agnol e Dra. Maria Teresa Schifino-Wittmann, pelos ensinamentos, seja dentro ou fora da sala de aula. À professora Maria Teresa também agradeço pela participação na minha banca examinadora.

À pesquisadora da Embrapa Trigo Dra. Sandra Patussi Brammer e à professora do Departamento de Genética da UFRGS Dra. Fernanda Bered, pela participação na minha comissão orientadora do projeto e na minha banca examinadora.

À empresa Sementes Agroeste Ltda. pelo fornecimento das linhagens de milho e pela condução dos primeiros experimentos.

À Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar esse curso e à CAPES pela bolsa.

DETERMINAÇÃO DE QTLs EM GERAÇÕES AVANÇADAS DE RETROCRUZAMENTOS EM MILHO (*Zea mays* L.)¹

Autor: Paula Wiethölter

Orientador: Maria Jane Cruz de Melo Sereno

RESUMO

Os híbridos são os principais materiais de milho cultivados no mundo e a oportunidade de introduzir variabilidade genética nesses materiais é muito limitada, devido às altas exigências do mercado em relação à produtividade. Por essa razão, os melhoristas, em geral, utilizam o próprio germoplasma elite como fonte de variabilidade, garantindo, dessa forma, a manutenção do padrão dos seus materiais. Entretanto, muitas vezes a variabilidade desses genótipos é insuficiente, tornando necessária a busca de alelos em materiais de locais distantes, que muitas vezes apresentam problemas de adaptação ambiental. As variedades crioulas, em contrapartida, além de serem ricas em variabilidade genética, são naturalmente adaptadas às regiões de origem. A desvantagem desses materiais é que eles são agronomicamente inferiores, limitando o seu uso direto como variedade comercial ou como fonte de germoplasma. Por essa razão, um dos grandes desafios do melhoramento genético tem sido determinar estratégias que permitam a rápida e eficiente incorporação de variabilidade em materiais elite. Em milho, os principais caracteres agrônômicos têm natureza quantitativa. Dessa forma, a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e a introgressão de alelos superiores, a partir de gerações avançadas de retrocruzamentos (AB-QTL, *Advanced Backcrosses-QTL*) entre linhagens elite e variedades crioulas, poderia ser uma estratégia para a incorporação de variabilidade. Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram selecionar variedades crioulas com caracteres agrônômicos de interesse e linhagens elite, identificar QTLs associados a caracteres agrônômicos e verificar o potencial da técnica de AB-QTL para a introgressão de alelos superiores da variedade crioula na linhagem elite. Após o cruzamento entre a linhagem elite LA67 e a variedade crioula Argentino Flint, foram realizados dois retrocruzamentos com a linhagem e dois ciclos de autofecundação. A progênie resultante foi genotipada com microssatélites e fenotipada para 25 caracteres agrônômicos. Foram identificados 29 QTLs e pelo menos cinco alelos superiores da variedade crioula foram introgridos na linhagem elite. Esses resultados indicaram que a técnica de AB-QTL foi eficiente tanto para a identificação de novos QTLs quanto para a introgressão de alelos superiores da variedade crioula na linhagem elite.

¹ Tese de doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (100p.) Outubro, 2008.

QTLs DETERMINATION IN ADVANCED BACKCROSSES GENERATIONS IN MAIZE (*Zea mays* L.)²

Author: Paula Wiethölter

Adviser: Maria Jane Cruz de Melo Sereno

ABSTRACT

Most corn presently cultivated in the world are hybrids. The chances to introduce genetic variability in this material are small due to market requirements in terms of productivity. For this reason corn breeders in general use their own elite germoplasm as source of genetic variability, maintaining therefore the standard characteristics of their germoplasm. However, the variability of these genotypes might be insufficient, requiring the use of germoplasm from different locations that often do not have wide environment adaptation. The landraces, besides being rich in genetic variability, are naturally adapted to their sites of origin. The disadvantage of these materials is that they are agronomically inferior, limiting their direct use as commercial varieties or as germplasm source. For this reason one of the main challenges of genetic breeding has been to create strategies that allow a rapid and efficient incorporation of variability in elite materials. In corn the main agronomic characters are of quantitative nature. Therefore the QTLs (*Quantitative Trait Loci*) identification and the introgression of superior alleles from advanced generations of backcrosses (AB-QTL, *Advanced Backcrosses QTL*) between elite lines and landraces, could be a strategy to incorporate variability. The objectives of this work were: to select landraces with agronomic traits and elite lines, to identify QTLs associated with agronomic characters in corn, and to verify the potential of the AB-QTL technique for introgression of superior alleles from the landraces into elite lines. Two backcrosses and two self-fertilization cycles were done after crossing the elite line LA67 with the Argentino Flint landrace. The progeny was genotyped with microsatellites and phenotyped for 25 agronomic traits. Twenty nine QTLs were identified and at least five superior alleles of the landrace were introgressed into the elite line. The results indicated that the AB-QTL technique was efficient for the identification of new QTLs and for the introgression of superior alleles in the elite lines.

² Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (100p.) October, 2008.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Caracterização geral do milho..... | 4 |
| 2.2 Análises fenotípicas..... | 6 |
| 2.3 Marcadores microssatélites (SSR)..... | 9 |
| 2.4 Identificação de QTLs..... | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 Seleção dos genótipos..... | 20 |
| 3.2 Desenvolvimento das populações segregantes..... | 21 |
| 3.2.1 Populações F1..... | 21 |
| 3.2.2 Primeiro ciclo de retrocruzamento (RC1F1)..... | 23 |
| 3.2.3 Segundo ciclo de retrocruzamento (RC2F1)..... | 25 |
| 3.2.4 Autofecundação das populações RC2F1..... | 28 |
| 3.2.5 Seleção da população final e segundo ciclo de autofecundação | 28 |
| 3.3 Análises moleculares com marcadores microssatélites..... | 30 |
| 3.3.1 Coleta do material..... | 30 |
| 3.3.2 Extração e quantificação do DNA..... | 31 |
| 3.3.3 Amplificação e genotipagem..... | 31 |
| 3.4 Análises fenotípicas..... | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 4.1 Seleção das populações..... | 39 |
| 4.2 Análises moleculares com marcadores microssatélites..... | 44 |
| 4.3 Análises fenotípicas..... | 49 |
| 4.3.1 Identificação de famílias com genótipos transgressivos... | 55 |
| 4.3.2 Parâmetros genéticos..... | 60 |
| 4.3.3 Correlações entre caracteres fenotípicos..... | 65 |
| 4.4 Identificação de QTLs associados aos caracteres fenotípicos..... | 70 |
| 4.4.1 Inserção da espiga e número de internódios..... | 71 |
| 4.4.2 Caracteres relacionados à folha..... | 73 |
| 4.4.3 Ciclo..... | 75 |
| 4.4.4 Ramificações do pendão..... | 77 |
| 4.4.5 Componentes do rendimento de grãos..... | 78 |
| V 4.5 Introgressão alélica da variedade crioula na linhagem elite..... | 82 |

| | Página |
|------------------------------------|--------|
| 5. CONCLUSÕES..... | 84 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |
| 7. APÊNDICES..... | 98 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Variedades crioulas e linhagens elite selecionadas para o desenvolvimento das populações segregantes. Porto Alegre, RS..... | 20 |
| 2. Cruzamentos e retrocruzamentos realizados entre as linhagens elite LA67 e LA110 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Caiano Rajado, Cunha, Dente de Ouro, Ferro, Oito Carreiras Branco, Roxo Índio, St. Elite e Bagualão. Porto Alegre, RS..... | 27 |
| 3. Resumo da análise de variância e esperanças dos quadrados médios. Porto Alegre, RS..... | 35 |
| 4. Locos polimórficos identificados entre a linhagem elite LA67 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro. Localização cromossômica (bin), número de alelos por loco e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Porto Alegre, RS... | 41 |
| 5. Matriz de distância genética gerada pelo Coeficiente de Nei72 (NTSYS). Porto Alegre, RS..... | 43 |
| 6. Número de famílias e número de sementes produzidas por família após o primeiro ciclo de autofecundação. Porto Alegre, RS..... | 44 |
| 7. Locos microssatélites analisados na progênie. Localização cromossômica dos locos (bin), número de alelos e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Porto Alegre, RS..... | 46 |
| 8. Segregação esperada dos locos microssatélites em cada geração, conforme o genótipo dos pais (linhagem elite LA67 e variedade crioula Argentino Flint). Porto Alegre, RS..... | 47 |
| 9. Teste Qui-quadrado para análise de segregação dos locos microssatélites. Porto Alegre, RS..... | 49 |
| 10. Resumo da análise de variância (QME) dos caracteres fenotípicos avaliados nos pais, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, entre os meses de janeiro e junho de 2008. Porto Alegre, RS..... | 51 |

| | Página |
|--|--------|
| 11. Resumo da análise de variância (QME) dos caracteres fenotípicos avaliados na progênie RC2F3, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, entre os meses de janeiro e junho de 2008. Porto Alegre, RS..... | 53 |
| 12. Estimativa do intervalo de confiança (IC) inferior (INF) e superior (SUP) na linhagem elite LA67 e identificação das famílias (de 1 a 76) com médias menores ao IC-INF da linhagem e maiores ao IC-SUP da linhagem, nos caracteres fenotípicos analisados. Porto Alegre, RS..... | 56 |
| 13. Estimativa dos parâmetros de variância genética (σ^2_G), de variância ambiental (σ^2_E), fenotípica (σ^2_F), herdabilidade (h^2) e coeficiente de variação genética (CVg) para os caracteres fenotípicos avaliados na progênie RC2F3. Porto Alegre, RS..... | 61 |
| 14. Coeficientes de correlação observados na progênie (os valores em negrito foram significativos a 5 %). Porto Alegre, RS..... | 67 |
| 15. Caracteres fenotípicos associados com locos microssatélites, localização cromossômica do loco (bin), efeito do QTL e percentual da variância fenotípica explicada por cada loco (R^2). Porto Alegre, RS..... | 70 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Esquema geral do projeto. Porto Alegre, RS..... | 19 |
| 2. Variedades crioulas. A) Oito Carreiras Branco; B) Argentino Flint; C) Branco; D) Cunha; E) Caiano Rajado; F) Ferro; G) Dente de Ouro; H) Roxo Índio. Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter..... | 21 |
| 3. Experimento realizado para o desenvolvimento das populações F1. 1) Argentino Flint; 2) Bagualão; 3) Branco; 4) Caiano Rajado; 5) Cunha; 6) Dente de Ouro; 7) Ferro; 8) Oito Carreiras Branco; 9) Roxo Índio; 10) St. Elite; LA67 e LA110: linhagens elite. Xanxerê, SC..... | 22 |
| 4. Procedimentos adotados para a realização dos cruzamentos. a e b) proteção da espiga com saco plástico antes da emissão dos estigmas; c) coleta de grãos de pólen; d) proteção da espiga após o cruzamento com saco de papel. Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter..... | 23 |
| 5. Experimento para o primeiro retrocruzamento com as linhagens elite LA67 e LA110. VC: variedades crioulas; 1) F1 com Argentino Flint; 2) F1 com Bagualão; 3) F1 com Branco; 4) F1 com Caiano Rajado; 5) F1 com Cunha; 6) F1 com Dente de Ouro; 7) F1 com Ferro; 8) F1 com Oito Carreiras Branco; 9) F1 com Roxo Índio; 10) F1 com St. Elite; LA67 e LA110: linhagens elite. Xanxerê, SC. Foto: Paula Wiethölter..... | 24 |
| 6. Experimento para o segundo retrocruzamento entre as quatro populações RC1F1 selecionadas [LA67 x (LA67 x Argentino Flint), LA67 x (LA67 x Branco), LA67 x (LA67 x Cunha) e LA67 x (LA67 x Dente de Ouro)] com a linhagem elite LA67, em maio de 2006, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS. Porto Alegre, RS. Foto: Paula Wiethölter..... | 25 |
| 7. Experimento para a autofecundação da população RC2F1 selecionada "LA67 x [LA67 x (LA67 x Argentino Flint)]". Porto Alegre, RS. Foto: Paula Wiethölter..... | 29 |

| | Página |
|---|--------|
| 8. Experimento instalado em 2008, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, para a análise dos caracteres fenotípicos nas 76 famílias da progênie. Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter. | 33 |
| 9. Pais e população selecionada. Da esquerda para a direita: linhagem elite LA67, variedade crioula Argentino Flint, população segregante (RC2F2). Porto Alegre, RS. Foto: Paula Wiethölter..... | 44 |

1 INTRODUÇÃO

Os híbridos são os principais materiais de milho cultivados no mundo há décadas, devido a sua alta produtividade. Para garantir a manutenção do alto padrão de desempenho dos genótipos, os melhoristas utilizam o próprio germoplasma elite como fonte de variabilidade genética. Entretanto, a variabilidade disponível nesses materiais nem sempre é suficiente, e a busca por outras fontes torna-se freqüentemente necessária. Muitas vezes, os melhoristas buscam essa variabilidade em genótipos de locais distantes, resultando, em muitos casos, em dificuldades de adaptação ambiental.

O milho é considerado o cereal com maior variabilidade genética entre os cultivados. Essa espécie teve origem da América Central, mas dispersou-se praticamente pelo mundo todo, devido a sua ampla capacidade de adaptação ambiental. A riqueza da variabilidade genética existente na espécie é refletida nas centenas de raças crioulas cultivadas há séculos por diversos povos. Em geral, essas raças são inferiores agronomicamente quando comparadas com os genótipos melhorados. Entretanto, alguns estudos sugerem que as variedades crioulas são constituídas por alelos importantes que, quando necessário, poderiam ser incorporados aos materiais elite. Esses trabalhos sugerem ainda que, mesmo que algumas variedades crioulas não apresentem alelos de interesse para os materiais que atualmente estão no mercado, elas

poderão ser úteis futuramente. Por essa razão, as variedades crioulas devem ser coletadas, caracterizadas e preservadas.

Nos últimos anos, mais de 100 variedades crioulas foram coletadas, no Rio Grande do Sul, pelos serviços de extensão rural e vários grupos de pesquisa têm se dedicado a caracterizar esses materiais. O objetivo desses estudos tem sido o de identificar variabilidade genética que possa ser aproveitada pelos programas de melhoramento genético, analisando caracteres qualitativos e quantitativos a campo, além de estudos com marcadores moleculares. Sendo assim, um dos grandes desafios dos programas de melhoramento genético de milho tem sido o de determinar estratégias que permitam a rápida e eficiente incorporação da variabilidade genética dessas variedades crioulas nos materiais elite dos programas de melhoramento.

A identificação de locos de caracteres quantitativos em gerações avançadas de retrocruzamentos (AB-QTL, *Advanced Backcrosses Quantitative Trait Loci*) tem sido utilizada como uma excelente estratégia para a incorporação de variabilidade genética em diversas espécies. Considerando que a maioria dos caracteres de importância agrônoma em milho tem natureza quantitativa, a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) e a introgressão de alelos superiores dos materiais crioulos nas linhagens elite, através da técnica de AB-QTL, poderia ser uma estratégia eficiente a ser adotada para a incorporação dessa variabilidade.

Os objetivos deste trabalho foram selecionar variedades crioulas de milho com caracteres agrônomicos de interesse para introgressão em linhagens elite, identificar QTLs de caracteres de interesse agrônomico na

espécie e verificar o potencial da técnica de AB-QTL para a introgressão de alelos superiores de variedades crioulas em linhagens elite.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização geral do milho

O milho é taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. subsp. *mays* (Paterniani & Campos, 1999). É uma espécie anual e monóica, com praticamente 100 % de alogamia (Russel & Hallauer, 1980; Paterniani & Campos, 1999). Por décadas essa espécie foi considerada diplóide (Mangelsdorf, 1974; Galinat, 1977; Goodman, 1978), porém nos últimos anos, provavelmente devido ao desenvolvimento de melhores equipamentos e metodologias de análises, surgiram evidências de que o milho possui uma origem alotetraplóide, com $2n = 4x = 20$ cromossomos (Gaut *et al.*, 2000), tendo número básico de cromossomos de $x = 5$ (White & Doebley, 1998). A existência de pareamento cromossômico durante a meiose de haplóides, a associação secundária de bivalentes e a distribuição tridimensional em metáfases somáticas (onde os cromossomos formam quatro grupos de cinco cromossomos cada) foram observações decisivas para a determinação da poliploidia (Poggio *et al.*, 2000).

A origem da espécie teria ocorrido por volta de 11 milhões de anos, no México (Gaut *et al.*, 2000), e a domesticação entre 7.000 e 10.000 anos (Galinat, 1992). Atualmente, a subespécie *Zea mays* ssp. *parviglumis*, conhecida como teosinto (Wang *et al.*, 1999; Piperno & Flannery, 2001) tem

sido reconhecida como um dos seus genitores, porém ainda não se sabe se essa subespécie é a única envolvida com a rota evolutiva da espécie.

O milho é uma cultura altamente variável, sendo considerado por Paterniani & Goodman (1978), como a de maior variabilidade genética entre as cultivadas. Essa variabilidade refere-se às adaptações climáticas, que permite que essa espécie seja cultivada em distintas condições de ambiente, desde o extremo norte ao extremo sul, baixas altitudes até altitudes superiores a 2.500 m (Paterniani & Campos, 1999; Teixeira *et al.*, 2002). A variabilidade estende-se a quase todos os demais caracteres da planta, desde a espiga até características gerais da arquitetura da planta.

Segundo Paterniani & Goodman (1978), a grande diversidade genética encontrada na espécie, sem dúvida, pode ser considerada um exemplo de evolução, pois essa corresponde a mudanças nas frequências alélicas ao longo das gerações. A variabilidade genética da espécie pode ser observada nas centenas de raças crioulas de milho existentes. Enquanto a variabilidade pode ser consequência da poliploidização (Gaut *et al.*, 2000) e da intensa presença de elementos transponíveis (Kidwell, 2002), o desenvolvimento das raças, provavelmente, é consequência de hibridações e da seleção (Paterniani & Goodman, 1978).

As variedades crioulas, em geral, apresentam comportamento agrônômico inferior quando comparadas aos híbridos e as variedades melhoradas. Entretanto, além de servirem como importantes fontes de alimento, essas variedades também são fundamentais para os programas de melhoramento genético, os quais frequentemente necessitam de variabilidade genética para desenvolver novas variedades ou melhorar os seus materiais

elite. Entretanto, de acordo com Nass *et al.* (1993), somente 14 % do germoplasma disponível no Brasil tem sido utilizado nos programas de melhoramento nas últimas décadas, pois faltam informações a respeito desses materiais. Por essa razão, diversos grupos vêm trabalhando na identificação e caracterização da variabilidade genética disponível na espécie (Reif *et al.*, 2004), através de análises fenotípicas (Camussi, 1979; Azar *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2002; Warburton *et al.*, 2008), moleculares e isoenzimáticas (Matsuoka *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2006; Warburton *et al.*, 2008).

2.2 Análises fenotípicas

Através das análises fenotípicas é possível estimar os parâmetros fundamentais para o melhoramento genético, tais como o modo de ação gênica e a herdabilidade dos caracteres, além de facilitar na identificação de caracteres que são correlacionados, possibilitando a seleção indireta daqueles de difícil avaliação.

Os caracteres fenotípicos de maior interesse para os programas de melhoramento de milho, e que tem sido avaliados freqüentemente em diversas regiões do mundo são os relacionados com os componentes do rendimento, entre os quais destacam-se comprimento e diâmetro da espiga, diâmetro do sabugo, peso de grão, peso de 200 grãos, número de fileiras de grãos por espiga, número de grãos por fileira, estante final, prolificidade, entre outros (Sibov *et al.*, 2003; Mihaljevic *et al.*, 2005; Blanc *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2006; Gallais *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007b; Li *et al.*, 2008).

Caracteres relacionados ao ciclo, como florescimento feminino, masculino e intervalo no florescimento (Vladutu *et al.*, 1999; Chardon *et al.*,

2005; Blanc *et al.*, 2006; Szalma *et al.*, 2007) também representam análises fundamentais no melhoramento da espécie. Em relação à arquitetura de planta, os principais caracteres analisados referem-se à estatura, altura de inserção da espiga (Sibov *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007a, Li *et al.*, 2008), número de folhas acima e abaixo da espiga e tamanho da folha de inserção da espiga (Sangoi *et al.*, 2002; Reymond *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008). Caracteres relacionados ao pendão também são avaliados freqüentemente, tais como relacionados ao número total de ramificações do pendão, além do comprimento da haste principal e secundária (Upadyayula *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2008).

Estatura e altura de inserção da espiga, em milho, são caracteres de natureza quantitativa de grande importância para o melhoramento genético, e estão diretamente relacionados com a tolerância ao acamamento. Isso ocorre porque a alta relação inserção/estatura pode diminuir o centro de gravidade da planta, provocando o acamamento (Li *et al.*, 2007a).

Quantidade e tamanho de folhas também são caracteres de suma importância para o melhoramento porque estão diretamente relacionados com o índice de área foliar (IAF), que representa a capacidade das plantas em explorar o espaço disponível. O aumento do número e tamanho das folhas pode elevar o IAF, resultando, teoricamente, na maior capacidade fotossintética de uma planta (Winkler, 2006). Porém, sob altas densidades, o qual está entre os fatores responsáveis pelo aumento potencial no rendimento do milho, a distância entre as plantas diminui, provocando alterações na qualidade da luz. Com isso, alguns eventos fisiológicos são desencadeados, levando a planta a priorizar a alocação dos fotoassimilados para o caule principal, resultando na supressão do desenvolvimento das ramificações laterais e, dessa forma,

contribuindo para a maior esterilidade feminina (Sangoi *et al.*, 2002). Por essa razão, os híbridos modernos tem sido desenvolvidos com menor número de folhas, com folhas mais eretas e com menor área foliar, resultando em plantas mais tolerantes a densidades mais elevadas. Dessa forma, a competição entre as plantas é minimizada e, conseqüentemente, a esterilidade feminina também (Almeida *et al.*, 2000).

O pendão, que se diferencia antes da inflorescência feminina, requer grandes quantidades de nutrientes em relação à espiga. Sob altas densidades, o seu desenvolvimento é estimulado, devido a diminuição da radiação solar que estimula a síntese de auxinas. Como o pendão necessita de maiores quantidades desse hormônio, a dominância apical é garantida e, conseqüentemente, o desenvolvimento das gemas axilares é suprimido, principalmente se o intervalo no florescimento for muito grande. Por essa razão, o melhoramento genético vem trabalhando na tentativa de reduzir o período entre o florescimento masculino e feminino, resultando na produção de pendões menores (menos ramificados) e garantindo, com isso, maior quantidade de fotoassimilados para a espiga (Sangoi *et al.*, 2002).

As análises de correlação entre os caracteres fenotípicos são muito importantes para o melhoramento genético, pois a seleção não é realizada considerando apenas um caráter e sim um conjunto de caracteres de interesse. Além disso, as análises de correlação permitem a seleção indireta de caracteres de baixa herdabilidade ou de difícil análise (Vencovsky & Barriga, 1992; Bento, 2006).

2.3 Marcadores microssatélites (SSR)

Os marcadores moleculares foram desenvolvidos a partir de 1970 e, desde então, foi possível analisar o polimorfismo genético em organismos vivos em nível de DNA. Os microssatélites (SSR), que surgiram somente após o desenvolvimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), são seqüências curtas de nucleotídeos, repetidas de 10 a 60 vezes. Cada SSR constitui um loco genético altamente variável, multialélico, com elevado conteúdo de polimorfismo (Taramino & Tingey, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998). As principais vantagens dos SSR são a co-dominância, o alto polimorfismo detectado e a alta reprodutibilidade das marcas. Por outro lado, as principais desvantagens estão relacionadas ao alto custo no desenvolvimento dos primers, quando eles ainda não estão disponíveis para a espécie sob estudo e a presença de bandas inespecíficas, que muitas vezes dificulta as avaliações (Faleiro, 2007).

De acordo com revisão de Matsuoka *et al.* (2002), os SSR são abundantes no genoma, altamente variáveis e estão presentes no genoma de muitas espécies. São tipicamente multi-alélicos e locos com mais que cinco alelos são comumente observados em plantas e animais. Devido a estas características, este marcador é um dos preferidos em estudos genéticos em plantas e animais. Em plantas, os sítios de SSR são largamente distribuídos com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases, sendo que o elemento mais comum é o di-nucleotídeo AT. As regiões contendo as seqüências simples repetidas são amplificadas através de PCR, utilizando-se um par de "primers" específicos (20 a 30 pares de bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o SSR. Cada segmento amplificado de

tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. A detecção das seqüências SSR via PCR é feita em gel de eletroforese, utilizando-se poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídeo, nitrato de prata ou através de auto-radiografia, utilizando primers marcados com radioisótopos na reação de PCR (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

No melhoramento de plantas, os marcadores SSR podem ser utilizados na caracterização de germoplasma (Gethi *et al.*, 2002), em estudos de divergência genética entre genótipos parentais (Lu & Bernardo, 2001; Vieira *et al.*, 2005), na seleção em programas de retrocruzamento (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Mesquita *et al.*, 2005), no estudo da base genética de caracteres quantitativos, na detecção de QTLs relacionados a caracteres agrônômicos de interesse, na seleção assistida, entre outros (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os estudos de divergência genética entre genótipos parentais são importantes para o melhoramento genético porque quanto mais divergentes forem os genótipos parentais, maiores são as chances de obtenção de heterose (Falconer & Mackay, 1996). De acordo com Messmer *et al.* (1993), cruzamentos entre genótipos geneticamente distantes, porém com performances agrônômicas similares, podem resultar em maior variância nas progênes, devido à maximização da segregação. Com isso, as chances de obtenção de genótipos superiores são bem maiores do que utilizando genótipos altamente produtivos e geneticamente similares. Isso ocorre porque genótipos geneticamente dissimilares, porém com fenótipos similares e superiores para o caráter de interesse, podem apresentar locos gênicos

distintos controlando o caráter. Esses, quando reunidos em um terceiro genótipo, podem dar origem a uma progênie segregante transgressiva para o caráter sob seleção, devido à ação de genes complementares (Carvalho *et al.*, 2002).

Uma das principais aplicações dos marcadores SSR na pesquisa agrônômica tem sido na identificação de QTLs e na construção de mapas de ligação para diversas espécies (Collard *et al.*, 2005).

2.4 Identificação de QTLs

A identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) associados a caracteres agrônômicos de interesse tem sido empregada no melhoramento desde 1980 (Edwards *et al.*, 1987), visando entender a base genética da variação dos caracteres e, conseqüentemente, desenvolver a seleção assistida (Blanc *et al.*, 2006).

De acordo com Falconer & Mackay (1996), um QTL é um segmento cromossômico que afeta um determinado caráter, de herança quantitativa. Os caracteres quantitativos, por sua vez, são aqueles que apresentam distribuição contínua e a sua classificação requer algum tipo de medição. Esses caracteres são muito influenciados pelo ambiente, pois individualmente o efeito de cada gene (QTL) é pequeno na expressão do caráter (Bueno *et al.*, 2001).

Os estudos dos caracteres quantitativos tem sido realizados há décadas com base nos parâmetros genéticos, tais como os componentes de média e de variância, associados aos coeficientes de herdabilidade e correlações entre caracteres (Thoday, 1961). Com essa abordagem, foi possível esclarecer a

herança de diversos caracteres, resultando na predição dos ganhos de seleção.

A associação entre avaliações fenotípicas e marcadores moleculares representa a principal alternativa para o conhecimento do número aproximado de locos atuando no controle dos caracteres quantitativos. Além disso, é possível determinar onde os locos encontram-se distribuídos no genoma e em que intensidades atuam sobre os caracteres (Bento, 2006). A determinação de ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos no loco do marcador e os alelos do QTL. O desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as frequências genotípicas dos gametas diferem do produto das frequências alélicas. Esse desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador, que podem ser detectados e estimados através de análises estatísticas específicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A presença de ligação entre um QTL e um marcador molecular permite que os efeitos fenotípicos do caráter em estudo sejam verificados, possibilitando o uso dessa informação para a seleção. Os marcadores SSR, por serem co-dominantes e multi-alélicos, são considerados os mais apropriados para a identificação de QTLs (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Roder *et al.*, 1998).

Os métodos de avaliação de QTLs mais utilizados envolvem análises de marcas simples (que incluem análise de variância, razão de verossimilhança, teste *t* e regressão linear simples), análises de regressão linear múltipla, mapeamento por intervalo, mapeamento por intervalo múltiplo e mapeamento por intervalo composto (Silva, 2001).

No caso da utilização de um único marcador, realiza-se uma comparação estatística do valor médio do caráter para as distintas classes genóticas do marcador. Quando o resultado estatístico é significativo, infere-se a existência de associação entre o marcador e o QTL da característica em questão. Porém, a avaliação de associação entre marcadores e QTLs pode ser realizada utilizando dois ou mais marcadores simultaneamente, considerando que o poder de detecção do QTL será maior quanto maior for o número de marcadores disponíveis (Lynch & Walsh, 1998).

A principal dificuldade no mapeamento de QTLs é que diversos fatores genéticos e ambientais afetam a expressão final do fenótipo. Os delineamentos experimentais envolvem, dessa forma, a medição e a genotipagem de várias centenas de indivíduos para atingir a resolução desejada. Entretanto, mesmo com progênies relativamente pequenas, um número significativo de associações entre marcadores e QTLs tem sido detectado. A proporção cumulativa explicada pelos vários QTLs detectados experimentalmente é muito variada, e depende do tipo de cruzamento analisado, da característica, do delineamento experimental (número de famílias, repetições e ambientes analisados) e do número de marcadores utilizados (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Quando vários ambientes são testados e a interação QTLs x ambiente é observada, as informações geradas podem ser utilizadas de três formas, (Bernardo, 2002): ignorar os QTLs com interações e apenas considerar aqueles estáveis em diversos ambientes; dividir os ambientes em subgrupos menos heterogêneos quanto as condições ambientais e, dessa forma, estimar QTLs específicos de cada subgrupo; explorar a interação QTL x ambiente

através da identificação de QTLs em um único ambiente. Segundo o autor, a primeira estratégia seria ideal, porém em regiões tropicais, a interação é muito acentuada. Dessa forma, a segunda e a terceira estratégia, provavelmente, permite uma maior resposta à seleção assistida por marcadores em regiões tropicais.

Diversos tipos de populações tem sido utilizadas para a detecção e mapeamento de QTLs em plantas. Entre essas se destacam as populações de retrocruzamento (Li *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2008), populações F2 (Ross *et al.*, 2005), duplo-haplóides, famílias de meio-irmãos, famílias de irmãos-inteiros (Omoigui *et al.*, 2006), linhagens derivadas de F2 (Enoki *et al.*, 2006a) e linhagens recombinantes (Szalma *et al.*, 2007). Em geral, a detecção de QTLs tem sido realizada apenas com populações bi-alélicas, ou seja, construídas a partir de dois genótipos parentais homozigotos. De acordo com Blanc *et al.* (2006), a utilização de cruzamentos multi-parentais poderia aumentar a variabilidade genética e, conseqüentemente, ampliar as possibilidades de testar as interações entre os QTLs. Em geral, o desenvolvimento dessa metodologia tem detectado QTLs em plantas com muito sucesso (Blanc *et al.*, 2006).

Vários fatores podem interferir na detecção dos QTLs incluindo o tamanho da população, o número de QTLs e o quanto afetam o caráter e o erro experimental, presente nos experimentos de fenotipagem (Beavis *et al.*, 1994; Flint-Garcia *et al.*, 2005).

A identificação de QTLs para caracteres de importância agrônômica é o passo inicial para a aplicação da seleção assistida por marcadores moleculares em programas de melhoramento (Salgado *et al.*, 2006). Alguns QTLs

identificados já foram clonados em tomate, arroz (Liu *et al.*, 2003) e em milho (Doebley *et al.*, 1997; Salvi *et al.*, 2005). Porém, uma fração muito pequena da variabilidade genética disponível para o melhoramento tem sido analisada. Conforme a análise de Chardon *et al.* (2004), um total de 62 QTLs provavelmente estão envolvidos com a variação no florescimento em milho. Para Blanc *et al.* (2006), esse resultado sugere que diversos caracteres quantitativos, provavelmente, também apresentam dezenas de QTLs envolvidos com a sua expressão. Como, em geral, apenas quatro ou cinco QTLs são identificados por população (Chardon *et al.*, 2004), a diversidade genética da maioria dos trabalhos também se mantém restrita, quando comparada a existente na espécie, indicando que os estudos de QTLs deveriam abranger a diversidade mais globalmente.

Em milho, a maioria dos caracteres de interesse agrônômico é controlada por vários genes, tais como os relacionados aos componentes do rendimento (Ross *et al.*, 2006; Srdie *et al.*, 2007), resistência a doenças (Zhang *et al.*, 2006; Balint-Kurti *et al.*, 2007; Baumgarten *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007), estresse à seca (Vargas *et al.*, 2006); florescimento (Salvi *et al.*, 2007), habilidade de expansão (Babu *et al.*, 2006), características de raiz (Zhu *et al.*, 2006), estatura de planta (Zhang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007a), altura de inserção de espiga (Zhang *et al.*, 2006), conteúdo de amido (Dong *et al.*, 2006), arquitetura da inflorescência (Upadyayula *et al.*, 2006a; Upadyayula *et al.*, 2006b), traços do endosperma (Wang *et al.*, 2007), componentes do grão (Li *et al.*, 2007b) entre outras.

A introgressão e a identificação de QTLs de interesse agrônômico a partir de retrocruzamentos avançados (*Advanced Backcrosses* - AB-QTL)

representa uma estratégia rápida e eficiente para a incorporação de germoplasma exógeno em variedades elite. Segundo simulações realizadas por Tanksley & Nelson (1996), quanto mais avançados forem os retrocruzamentos na população, mais fácil será a incorporação somente do segmento desejado, eliminando o problema da incorporação de caracteres indesejados ligados ao QTL. A vantagem principal desta metodologia é que, diferentemente da análise convencional de QTLs, que necessita de cinco anos para desenvolver variedades candidatas, a análise de AB-QTLs pode produzir essas variedades em apenas um ano após a detecção inicial do QTL. Essa técnica se baseia na associação de metodologias convencionais de melhoramento, como a análise fenotípica de caracteres de interesse, com metodologias modernas, como as análises moleculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido na empresa Sementes Agroeste Ltda. (Xanxerê, SC), na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS) e na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Eldorado do Sul, RS).

Inicialmente, o projeto contou com a participação de diversas variedades crioulas e linhagens elite, às quais foram, a cada ciclo (cruzamento e retrocruzamentos), sendo eliminadas. O processo de seleção e, conseqüentemente, de eliminação de populações, foi realizado com base em uma caracterização prévia dos materiais crioulos (Wiethölter, 2005). A população selecionada passou por vários ciclos, incluindo o cruzamento (linhagem elite x variedade crioula = F1), dois ciclos de retrocruzamentos com a linhagem elite correspondente (RC1F1 e RC2F1), dois ciclos de autofecundações (RC2F2 e RC2F3 – constituição das famílias) e um ciclo de polinização aberta (RC2F3S1). A geração RC2F2 foi utilizada na genotipagem com marcadores microssatélites, a geração RC2F3 nas análises fenotípicas dos caracteres agronômicos da planta e a geração RC2F3S1 nas análises fenotípicas dos caracteres agronômicos da espiga.

Os resultados obtidos na genotipagem com microssatélites e nas análises fenotípicas foram avaliados visando identificar QTLs associados a

caracteres agronômicos de interesse e se a através da técnica de AB-QTL foi possível introgridir alelos superiores de uma variedade crioula em uma linhagem elite. A escolha por utilizar diversas variedades crioulas no início do projeto foi visando eliminar, a cada geração, aquelas com comportamento indesejado, pois muitas populações, em função de estresses ambientais, da manipulação nos cruzamentos e da própria constituição genética, poderiam apresentar desempenho insatisfatório durante o seu desenvolvimento e não produzir descendentes férteis em quantidade suficiente para o desenvolvimento das gerações seguintes. O processo de seleção dos genótipos (variedades crioulas e linhagens elite) e a descrição dos experimentos conduzidos para a realização de todas as etapas estão descritos abaixo. A Figura 1 apresenta um esquema com todas as etapas do projeto.

**1) Seleção de 10 variedades
crioulas e duas linhagens elite**
(Março/05)



**2) Desenvolvimento das
populações F1**
(linhagem x variedade crioula
= 20 populações F1)
(Campo - Xanxerê/SC,
março a setembro/05)

**3) Primeiro ciclo de
retrocruzamento com as
linhagens**
(Campo - Xanxerê/SC,
outubro/05 a abril/06)

10 populações
RC1F1 com LA67

10 populações
RC1F1 com LA110

**4) Seleção de quatro
populações RC1F1**

Seleção com base em caracteres
fenotípicos previamente
identificados (Wiethölter, 2005)

Eliminação devido
a não produção de
sementes

Provável causa:
incompatibilidade no ciclo
reprodutivo da linhagem LA110
com as variedades crioulas

**5) Segundo ciclo de retrocruzamento
com a linhagem LA67**

Casa de vegetação (UFRGS/POA,
abril a outubro/06)

4 populações
RC2F1 com LA67

Populações RC1F1 selecionadas:
- LA x (LA x Argentino Flint)
- LA x (LA x Branco)
- LA x (LA x Cunha)
- LA x (LA x Dente de Ouro)

6) Primeiro ciclo de autofecundação

Campo (EEA/Eldorado do Sul/RS,
outubro/06 a abril/07)

4 populações
RC2F2 com LA67

**7) Seleção da
população final**

Maior divergência genética (SSR)
entre a linhagem LA67 e a
variedade crioula.

**8) Segundo ciclo de autofecundação
na população selecionada**

Casa de vegetação
(UFRGS/POA, maio a novembro/07)

Objetivo: aumentar o número de famílias

**Progênie
(LA67 com Argentino Flint)
= 76 famílias**

9) Análises moleculares

Marcador SSR
Laboratório de Biotecnologia - UFRGS

10) Análises fenotípicas

25 caracteres - fevereiro a julho/08
Casa de vegetação - UFRGS

11) Identificação de QTLs

Associação locos SSR x caráter

FIGURA 1. Esquema geral do projeto. Porto Alegre, RS.

3.1 Seleção dos genótipos

O experimento iniciou com a seleção de dez variedades crioulas e duas linhagens elite (Tabela 1). As linhagens elite (LA67 e LA110) foram cedidas pela empresa Sementes Agroeste Ltda. As variedades crioulas St. Elite e Bagualão foram recomendadas pela Embrapa Clima Temperado e as demais (Argentino Flint, Branco, Caiano Rajado, Cunha, Dente de Ouro, Ferro, Oito Carreiras Branco e Roxo Índio) (Figura 2) foram selecionadas com base em Wiethölter (2005). As variedades selecionadas foram as que apresentaram, em geral, performances agronômicas similares à melhor testemunha em relação ao ciclo, estatura, inserção da espiga, comprimento da espiga e número de fileiras de grãos por espiga (Wiethölter, 2005).

TABELA 1. Variedades crioulas e linhagens elite selecionadas para o desenvolvimento das populações segregantes. Porto Alegre, RS.

| Genótipos | No cruzamento | Local de coleta |
|------------------------------------|----------------|-----------------|
| Argentino Flint ¹ | Pai doador | Canguçu |
| Bagualão ¹ | Pai doador | Pelotas |
| Branco ¹ | Pai doador | Canguçu |
| Caiano Rajado ¹ | Pai doador | Canguçu |
| Cunha ¹ | Pai doador | Paim Filho |
| Dente de Ouro ¹ | Pai doador | Canguçu |
| Ferro ¹ | Pai doador | Ibarama |
| Oito Carreiras Branco ¹ | Pai doador | Herval D'Oeste |
| Roxo Índio ¹ | Pai doador | Canguçu |
| St Elite ¹ | Pai doador | Pelotas |
| LA67 ² | Pai recorrente | Agroeste |
| LA110 ² | Pai recorrente | Agroeste |

¹Variedades crioulas; ² Linhagens elite;

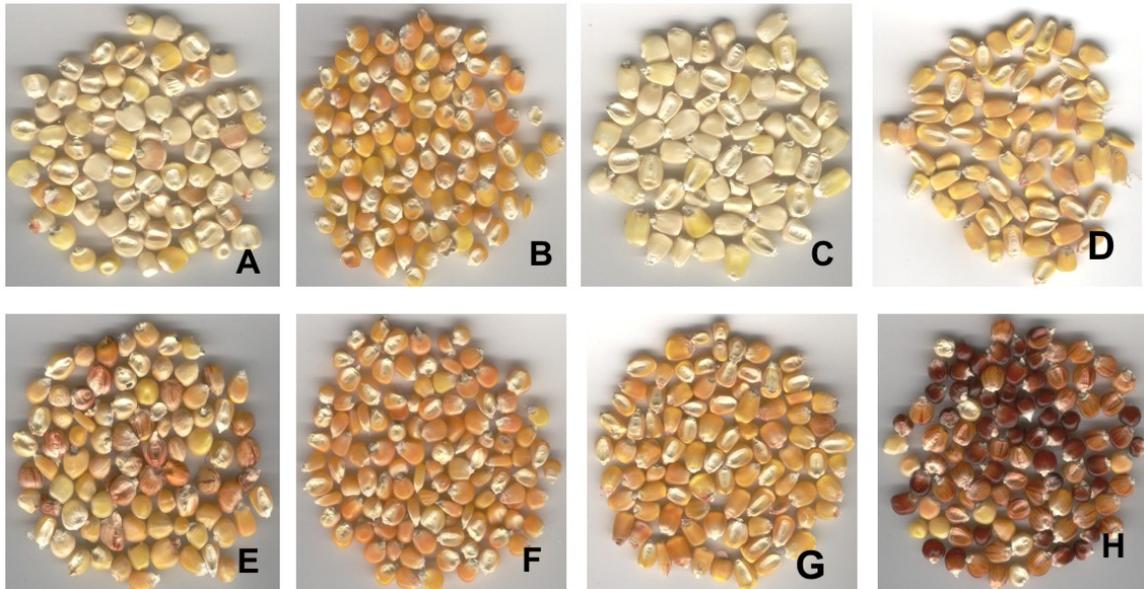


FIGURA 2. Variedades crioulas. A) Oito Carreiras Branco; B) Argentino Flint; C) Branco; D) Cunha; E) Caiano Rajado; F) Ferro; G) Dente de Ouro; H) Roxo Índio. Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter.

3.2 Desenvolvimento das populações segregantes

3.2.1 Populações F1

O experimento para o desenvolvimento das populações F1 foi instalado a campo, nas dependências da empresa Sementes Agroeste Ltda. (Xanxerê, SC), em março de 2005. Cada uma das dez variedades crioulas foi cruzada com as duas linhagens elite, ou seja, com a linhagem LA67 e com a linhagem LA110 (exemplos: LA67 X Argentino Flint e LA110 X Argentino Flint; LA67 X Bagualão e LA110 X Bagualão).

Foram utilizadas linhas de 8 metros, com espaçamento de 70 cm entre linhas e 20 cm entre plantas. Foram semeadas três linhas de cada linhagem (LA67 e LA110) e duas linhas de cada variedade crioula (uma para o cruzamento com a linhagem LA67 e uma para o cruzamento com a linhagem LA110), totalizando 26 linhas. Em cada linha foram semeadas, aproximadamente, 40 plantas, totalizando 80 plantas de cada variedade crioula e 120 plantas de cada linhagem elite (40 plantas de cada variedade crioula

para 12 plantas de cada linhagem elite). As plantas de cada linha semeada com variedades crioulas foram utilizadas como doadoras de pólen nos cruzamentos realizados com as linhagens elite. Foi utilizado um número superior de plantas doadoras de pólen (pais) em relação às linhagens elite (mães) para garantir uma maior abrangência da variabilidade genética presente em cada variedade crioula. A disposição das variedades e das linhagens foi realizada conforme demonstrado na Figura 3.

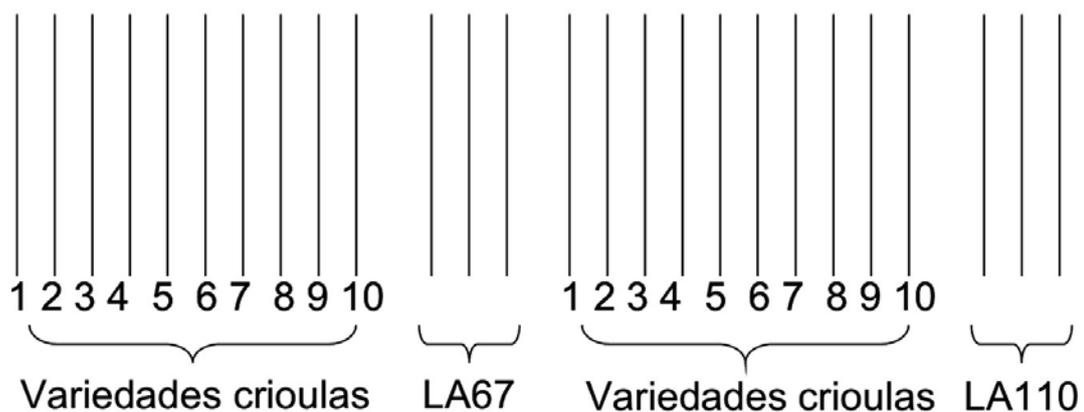


FIGURA 3. Experimento realizado para o desenvolvimento das populações F1. 1) Argentino Flint; 2) Bagualão; 3) Branco; 4) Caiano Rajado; 5) Cunha; 6) Dente de Ouro; 7) Ferro; 8) Oito Carreiras Branco; 9) Roxo Índio; 10) St. Elite; LA67 e LA110: linhagens elite. Xanxerê, SC.

No período do florescimento, antes da emissão dos estigmas, as espigas de todas as plantas de ambas linhagens (LA67 e LA110) foram protegidas com sacos de plástico (Figura 4a e 4b) a fim de evitar que os estigmas fossem fecundados por pólen indesejado. No período da antese, quando aproximadamente 50 % das plantas da linha estavam na fase de liberação de grãos de pólen, com auxílio de um saco de papel, para cada variedade crioula (linha), foi coletada uma mistura de grãos de pólen de várias plantas (Figura 4c), que foi utilizada para a realização dos cruzamentos com as linhagens elite.

Para a realização do cruzamento, o saco de plástico que estava protegendo a espiga foi retirado e o pólen rapidamente despejado sobre os estigmas. A espiga foi protegida com um saco de papel (Figura 4d) até a colheita, realizada em setembro de 2005. Foram desenvolvidas 20 populações F1.

As espigas de cada população F1 foram debulhadas e todas as sementes da população foram misturadas.



FIGURA 4. Procedimentos adotados para a realização dos cruzamentos. a, b) proteção da espiga com saco de plástico antes da emissão dos estigmas; c) coleta de grãos de pólen; d) proteção da espiga após o cruzamento com saco de papel. Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter.

3.2.2 Primeiro ciclo de retrocruzamento (RC1F1)

O primeiro ciclo de retrocruzamento (RC1F1) foi realizado em um experimento instalado na empresa Sementes Agroeste Ltda. em Xanxerê, em outubro de 2005. O delineamento experimental e os cruzamentos seguiram a mesma metodologia utilizada no experimento anterior (item 3.2.1), onde as linhagens foram os genótipos recorrentes, porém as plantas doadoras de grãos de pólen foram as populações F1. A colheita foi realizada em abril de 2006.

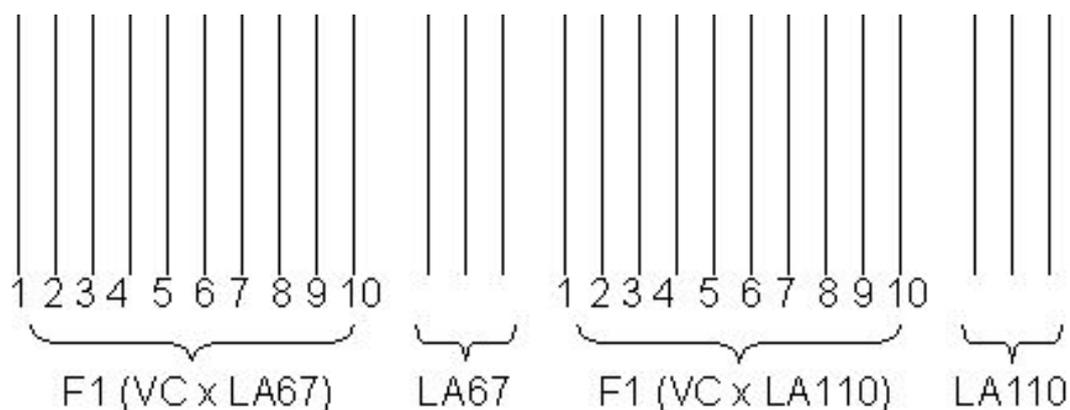


FIGURA 5. Experimento para o primeiro retrocruzamento com as linhagens elite LA67 e LA110. VC: variedades crioulas; 1) F1 com Argentino Flint; 2) F1 com Bagualão; 3) F1 com Branco; 4) F1 com Caiano Rajado; 5) F1 com Cunha; 6) F1 com Dente de Ouro; 7) F1 com Ferro; 8) F1 com Oito Carreiras Branco; 9) F1 com Roxo Índio; 10) F1 com St. Elite; LA67 e LA110: linhagens elite. Xanxerê, SC.

Todas as populações F1 retrocruzadas com a linhagem elite LA67 produziram sementes, diferente das retrocruzadas com a linhagem elite LA110, que não produziram nada. Não houve produção de sementes nesses retrocruzamentos, provavelmente, devido a uma assincronia entre os ciclos reprodutivos das populações F1 e da linhagem elite LA110. Essa linhagem apresentou florescimento feminino muito tardio, quando os grãos de pólen das populações F1, provavelmente, já haviam perdido a sua viabilidade.

Entre as 10 populações RC1F1 que produziram sementes (todas obtidas através do retrocruzamento com a linhagem elite LA67), somente quatro (com origem no cruzamento entre a linhagem elite LA67 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro) foram selecionadas para o segundo ciclo de retrocruzamento. O processo seletivo ocorreu com base nas informações prévias das variedades crioulas parentais (Wiethölter, 2005), dando ênfase aos caracteres estatura, inserção da espiga e ciclo.

As espigas de cada população RC1F1 foram debulhadas e todas as sementes da população foram misturadas.

3.2.3 Segundo ciclo de retrocruzamento (RC2F1)

O experimento para o segundo ciclo de retrocruzamento com a linhagem elite LA67 foi instalado em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figura 6). A semeadura das quatro populações RC1F1 selecionadas [LA67 x (LA67 x Argentino Flint), LA67 x (LA67 x Branco), LA67 x (LA67 x Cunha) e LA67 x (LA67 x Dente de Ouro)] e da linhagem elite LA67 ocorreu em maio de 2006.



FIGURA 6. Experimento para o segundo retrocruzamento entre as quatro populações RC1F1 selecionadas [LA67 x (LA67 x Argentino Flint), LA67 x (LA67 x Branco), LA67 x (LA67 x Cunha) e LA67 x (LA67 x Dente de Ouro)] com a linhagem elite LA67, em maio de 2006, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS. Porto Alegre, RS. Foto: Paula Wiethölter.

Foram cultivados 40 vasos (uma planta por vaso) com a linhagem elite LA67, e 80 vasos (duas plantas por vaso) com cada população de retrocruzamento (dez plantas de LA67 para 160 plantas de cada população de

retrocruzamento doadora de pólen). Foi utilizado substrato (Apêndice 1) para o cultivo das plantas, com aplicação de nitrogênio, aproximadamente, 30 dias após a semeadura, estimando-se 100 kg/ha (0,4 g/vaso). Os retrocruzamentos foram realizados da mesma maneira que para o desenvolvimento das populações F1, porém as plantas doadoras de grãos de pólen foram as populações RC1F1 selecionadas. A colheita das quatro populações RC2F1 produzidas foi realizada em novembro de 2006. As espigas de cada população RC2F1 foram debulhadas e todas as sementes da população foram misturadas.

Na Tabela 2 estão descritos os cruzamentos e retrocruzamentos realizados.

TABELA 2. Cruzamentos e retrocruzamentos realizados entre as linhagens elite LA67 e LA110 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Caiano Rajado, Cunha, Dente de Ouro, Ferro, Oito Carreiras Branco, Roxo Índio, St. Elite e Bagualão. Porto Alegre, RS.

| Genótipos recorrentes (linhagens) | Genótipos doadores (variedades crioulas) | F1 / Xanxerê-SC (03/05 a 09/05) | 1º ciclo de retrocruzamento (RC1F1) / Xanxerê-SC (10/05 a 04/06) | 2º ciclo de retrocruzamento (RC2F1) / Xanxerê-SC (05/06 a 11/06) |
|-----------------------------------|--|---------------------------------|--|--|
| LA67 | Argentino Flint (AF) | LA67 x AF | LA67 x (LA67 x AF) | LA67 x [LA67 x (LA67 x AF)]** |
| LA67 | Bagualão (BG) | LA67 x BG | LA67 x (LA67 x BG) | - |
| LA67 | Branco (BR) | LA67 x BR | LA67 x (LA67 x BR) | LA67 x [LA67 x (LA67 x BR)]** |
| LA67 | Caiano Rajado (CR) | LA67 x CR | LA67 x (LA67 x CR) | - |
| LA67 | Cunha (CN) | LA67 x CN | LA67 x (LA67 x CN) | LA67 x [LA67 x (LA67 x CN)]** |
| LA67 | Dente de Ouro (DO) | LA67 x DO | LA67 x (LA67 x DO) | LA67 x [LA67 x (LA67 x DO)]** |
| LA67 | Ferro (FR) | LA67 x FR | LA67 x (LA67 x FR) | - |
| LA67 | Oito Carreiras Branco (CB) | LA67 x CB | LA67 x (LA67 x CB) | - |
| LA67 | Roxo Índio (RI) | LA67 x RI | LA67 x (LA67 x RI) | - |
| LA67 | St Elite (SE) | LA67 x SE | LA67 x (LA67 x SE) | - |
| LA110 | Argentino Flint (AF) | LA110 x AF | * | - |
| LA110 | Bagualão (BG) | LA110 x BG | * | - |
| LA110 | Branco (BR) | LA110 x BR | * | - |
| LA110 | Caiano Rajado (CR) | LA110 x CR | * | - |
| LA110 | Cunha (CN) | LA110 x CN | * | - |
| LA110 | Dente de Ouro (DO) | LA110 x DO | * | - |
| LA110 | Ferro (FR) | LA110 x FR | * | - |
| LA110 | Oito Carreiras Branco (CB) | LA110 x CB | * | - |
| LA110 | Roxo Índio (RI) | LA110 x RI | * | - |
| LA110 | St Elite (SE) | LA110 x SE | * | - |

* Populações que não produziram sementes; ** Populações selecionadas.

3.2.4 Autofecundação das populações RC2F1

O experimento para autofecundar as quatro populações produzidas no segundo ciclo de retrocruzamento (RC2F1) foi instalado em dezembro de 2006, na EEA/UFRGS (Eldorado do Sul, RS). A área utilizada foi composta por 60 linhas de 5 m, com espaçamento de 70 cm entre linhas. Foram cultivadas 15 linhas por população, com 25 plantas por linha (aproximadamente 300 plantas por população).

As autofecundações foram realizadas da mesma maneira que os cruzamentos e retrocruzamentos anteriores, porém os estigmas de cada planta foram fecundados somente pelos seus próprios grãos de pólen. A colheita das quatro populações RC2F2 produzidas foi realizada em abril de 2007.

Em cada população, cada planta que produziu sementes passou a ser considerada uma família distinta. As sementes foram armazenadas separadamente por família e não mais somente por população.

3.2.5 Seleção da população final e segundo ciclo de autofecundação

A seleção da população final foi realizada com base na análise de marcadores microssatélites nos cinco genótipos parentais das quatro populações selecionadas (linhagem elite LA67 e variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro), visando identificar, entre as variedades crioulas, aquela com maior divergência genética em relação à linhagem elite LA67.

A população selecionada (desenvolvida a partir do cruzamento da linhagem elite LA67 com a variedade crioula Argentino Flint, com dois ciclos de

retrocruzamentos com LA67 e um ciclo de autofecundação) foi submetida a mais um ciclo de autofecundação, para aumentar o número de famílias, que era de apenas 36. Em maio de 2007, o experimento foi instalado em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figura 7). Foram cultivadas, aproximadamente, 200 plantas (cinco a seis sementes de cada família), individualmente, em vasos de 5 kg contendo substrato.



FIGURA 7. Experimento para a autofecundação da população RC2F1 selecionada “LA67 x [LA67 x (LA67 x Argentino Flint)]”. Porto Alegre, RS. Foto: Paula Wiethölter.

Em torno de 30 dias após a semeadura, foi realizada a coleta de folhas para posterior análise molecular dos indivíduos que deixassem descendentes. O material coletado (uma folha por planta) foi armazenado, individualmente, em sacos com sílica para a desidratação e conservação do material.

No período do florescimento, as autofecundações foram realizadas conforme descrito no item 3.2.5 e a colheita ocorreu em novembro do mesmo ano. Das 200 plantas cultivadas na casa de vegetação, somente 76 produziram pelo menos cinco sementes por planta (mínimo necessário para as análises fenotípicas), constituindo, dessa forma, a progênie com 76 famílias.

3.3 Análises moleculares com marcadores microssatélites

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, localizado no Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

As avaliações foram realizadas nos cinco genótipos parentais (linhagem elite LA67 e variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro), para a identificação da variedade crioula mais distante geneticamente da linhagem elite LA67.

Posteriormente, as análises moleculares foram realizadas nas 76 famílias da população selecionada (LA67 x [LA67 x (LA67 x Argentino Flint)]), para a análise dos QTLs.

3.3.1 Coleta do material

Para a análise de distância genética entre a linhagem elite LA67 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro, 20 sementes de cada genótipo foram cultivadas em papel germinador umedecido, a 25 °C. Após a germinação (aproximadamente dez dias depois), foi coletado um pedaço de folha (aproximadamente 20 mg) de 10 plantas de cada genótipo.

Os pedaços de folha das 10 plantas do mesmo genótipo foram acondicionados conjuntamente em um tubo de 2 mL, para a extração do DNA em bulk.

Para a análise da progênie, a coleta foi realizada conforme indicado no item 3.2.5. O DNA foi extraído, individualmente, somente das 76 plantas que produziram sementes e que constituíram, dessa forma, a progênie com as 76 famílias.

3.3.2 Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de Murray & Thompson (1980) e a quantificação do DNA, em gel de agarose 0,9 %. O marcador *lambda* foi utilizado para a comparação dos tamanhos dos fragmentos, que foram marcados com brometo de etídeo, visualizados em luz ultravioleta e fotografados pelo programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

3.3.3 Amplificação e genotipagem

As reações de PCR foram preparadas para um volume de 20 μ L, sendo 11,8 μ L de água, 2 μ L de Tampão 10 X (1 X), 0,6 μ L de $MgCl_2$ (1,5 mM), 0,8 μ L de dNTP mix (0,4 mM), 0,3 μ L do primer forward (0,3 μ M), 0,3 μ L do primer reverse (0,3 μ M), 0,2 μ L da enzima Taq-DNA Polimerase (1 U) e 4 μ L de DNA (60 ng/ μ L).

Para a amplificação do DNA genômico foi utilizado um programa do tipo Touchdown (Apêndice 2) e o marcador DNA Ladder 50 pb (Invitrogen) foi utilizado como padrão de peso molecular. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose 3 %, com migração de 90 minutos a 145

W. Os fragmentos foram marcados com brometo de etídeo, visualizados em luz ultravioleta e fotografados pelo programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

Para a análise de distância genética entre a linhagem elite LA67 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro, foram testados 95 locos microssatélites. A distância genética foi estimada pelo coeficiente de Nei72 (Nei, 1972) (UPGMA - NTSYS, Rohlf, 2000).

Nos genótipos parentais da população final selecionada (linhagem elite LA67 e variedade crioula Argentino Flint), além dos 95 locos SSR, foram testados mais 82 locos, totalizando 177 locos SSR distribuídos nos dez cromossomos da espécie. Os locos que apresentaram polimorfismo entre a linhagem elite LA67 e a variedade crioula Argentino Flint foram testados na progênie.

Os resultados obtidos na análise da progênie foram submetidos a análise de segregação gênica, pelo teste Qui-quadrado.

3.4 Análises fenotípicas

O experimento para as análises fenotípicas das 76 famílias genotipadas com microssatélites foi instalado inicialmente a campo, na EEA-UFRGS (Eldorado do Sul), em dezembro de 2007. O delineamento foi de blocos casualizados, com uma a três repetições (dependendo da quantidade de sementes disponível por família), onde cada parcela foi composta por uma linha de 5 m, com espaçamento de 70 cm entre linhas e 20 cm entre plantas. Esse experimento, entretanto, foi completamente perdido, devido ao ataque de tatus (Apêndice 3).

Por essa razão, em fevereiro de 2008, um novo experimento foi instalado em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figura 8). O delineamento foi o de blocos casualizados, com repetições por família variando de uma a cinco (de acordo com o número de sementes disponível por família), onde cada repetição correspondeu a uma planta (pois para algumas famílias havia sobrado apenas uma semente). Além das 76 famílias, os genótipos parentais (linhagem elite LA67 e variedade crioula Argentino Flint) também foram semeados, em cinco repetições (repetição = uma planta). Para o cultivo das plantas foram utilizados vasos de 5 kg contendo substrato.



FIGURA 8. Experimento instalado em fevereiro de 2008, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, para a análise dos caracteres fenotípicos nas 76 famílias da progênie. Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter.

Foram realizadas quatro aplicações de uréia em solução (30 kg/ha), a cada 15 dias, contando a partir da data da semeadura. Para o controle de insetos foram aplicados os inseticidas Lorsbam (5 mL/L) e Dipel (2,5 g/L), 20 e 50 dias após semeadura, respectivamente.

Não foi realizado nenhum controle nos cruzamentos e a polinização foi aberta. O experimento foi colhido em julho de 2008.

Os caracteres fenotípicos analisados, em cada planta, foram:

NDEE: número de dias a partir da sementeira até a emissão dos estigmas;

NDEP: número de dias a partir da sementeira até a emissão do pendão;

NDLP: número de dias a partir da sementeira até a libertação dos grãos de pólen (antras visíveis);

IF: intervalo de florescimento, correspondente a diferença entre o número de dias a partir da sementeira até a emissão dos estigmas e o número de dias a partir da sementeira até a libertação dos grãos de pólen, obtido pela fórmula: $IF = NDEE - NDLP$

CI: comprimento do internódio (cm);

NI: número de internódios por planta;

DI: diâmetro do internódio abaixo da espiga (cm);

CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga (cm);

LFIE: largura da folha de inserção da espiga (cm);

NFACE: número de folhas acima da espiga;

NFABE: número de folhas abaixo da espiga;

CHPP: comprimento da haste principal do pendão (cm);

CRLP: comprimento da primeira ramificação lateral do pendão;

NTR: número total de ramificações do pendão;

EST: estatura de planta (cm), medida do nível do solo até o nó da folha bandeira;

INSE: altura de inserção da espiga (cm), medida do nível do solo até o nó da inserção da primeira espiga;

CE: comprimento da espiga (cm);

DE: diâmetro da espiga (cm);

DS: diâmetro do sabugo (cm);

NFE: número de fileiras de grãos por espiga;

NGF: número de grãos por fileira;

PECP: peso da espiga com palha (g), descontados 13 % de umidade;

PESP: peso da espiga sem palha (g), descontados 13 % de umidade;

P100G: peso de 100 grãos (g), descontados 13 % de umidade.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguindo o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + p_i + b_j + e_{ij}$$

em que

Y_{ij} é o valor observado da progênie i no bloco j ;

μ é a média geral do experimento;

p_i é o efeito do bloco b ($b = 1, 2, 3, 4, 5$);

b_j é o efeito da progênie ($p = 1, 2, \dots, 76$);

e_{ij} é o erro associado a observação Y_{ij} .

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 1999). A Tabela 3 apresenta o esquema da análise de variância, com as respectivas esperanças dos quadrados médios e teste F .

TABELA 3. Resumo da análise de variância e esperanças dos quadrados médios. Porto Alegre, RS.

| Causas de variação | GL | QM | E(QM) | F |
|--------------------|------------------|-----|----------------------------|---------|
| Bloco | $b - 1$ | QMB | | QMB/QME |
| Progênie | $p - 1$ | QMP | $\sigma^2_E + b\sigma^2_P$ | QMP/QME |
| Erro | $(b - 1)(p - 1)$ | QME | σ^2_E | - |

GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; E(QM): esperanças dos quadrados médios; F: teste F .

Os intervalos de confiança (IC) foram estimados na linhagem LA67 para todos os caracteres fenotípicos, para identificar, entre os indivíduos da

progênie, aqueles com médias menores que os limites inferiores e com médias maiores que os limites superiores, onde:

$$IC = u \pm QME \times t_{(GL),0,05}$$

em que:

u é a média geral do caráter analisado;

QME é o quadrado médio do erro;

$t_{(GL),0,05}$ é o valor do teste t tabelado considerando os graus de liberdade do caráter em uma probabilidade de 5 %.

Com base nas esperanças matemáticas dos quadrados médios (Tabela 3), foram estimados os seguintes parâmetros genéticos para todos os caracteres:

* Variância genética das progênies ($\sigma^2_{G(P)}$)

$$\sigma^2_{G(P)} = (QMP - QME)/b$$

* Variância fenotípica das progênies ($\sigma^2_{F(P)}$)

$$\sigma^2_{F(P)} = QMP/b$$

* Variância do erro (σ^2_E)

$$\sigma^2_E = QME$$

em que:

* QMP é o quadrado médio de progênies;

* QME é o quadrado médio do erro;

* b é o número de blocos.

A estimativa da herdabilidade (Hallauer & Miranda, 1981) e do coeficiente de variação genética, para todos os caracteres analisados, foi obtida considerando uma progênie de meio-irmãos:

* Coeficiente de herdabilidade das progênies (h^2_P)

$$h^2_P = \sigma^2_{G(P)} / \sigma^2_{F(P)}$$

* Coeficiente de variação genética (CVg)

$$CVg(\%) = 100 \times (\sigma_{G(P)} / u)$$

em que:

* $\sigma_{G(P)}$ é o desvio padrão entre progênies;

* u é a média geral.

As estimativas das correlações fenotípicas ($r_{F(XY)}$) entre os caracteres foram calculadas usando o PROC CORR do Software SAS.

Os caracteres fenotípicos significativos (5 %) na análise de variância foram selecionados para a análise de regressão com os marcadores moleculares que não apresentaram desvios significativos de segregação, verificados através do teste Qui-quadrado.

A associação entre cada marcador e cada caráter foi verificada, individualmente, através da análise de regressão linear simples (PROC REG - Software SAS).

Os marcadores significativos para cada caráter foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, para a detecção do efeito de múltiplos marcadores associados a cada caráter (PROC REG - Software SAS).

A proporção da variância fenotípica explicada por cada marcador foi estimada pelo coeficiente de determinação (R^2), que foi utilizado, no programa Excel, para a confecção dos gráficos.

Foram calculadas as médias genotípicas (MG) de todos os QTLs detectados. Com base nesse cálculo, foi estimado o efeito do QTL (Upadyayula *et al.*, 2006a), onde:

Efeito do QTL = MG da linhagem elite LA67 – MG da variedade crioula Argentino Flint, onde:

* Resultado positivo = linhagem elite LA67 responsável pelo aumento no valor do caráter na progênie.

* Resultado negativo = variedade crioula Argentino Flint responsável pelo aumento no valor do caráter.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção das populações

A partir dos genótipos selecionados, foram desenvolvidas, inicialmente, 20 progênies F1 (Tabela 2). Foi utilizado um número elevado de populações no início do projeto como uma forma de garantir que pelo menos uma delas conseguisse chegar na geração desejada, produzindo a quantidade mínima de sementes necessárias para a análise dos QTLs. Como as variedades crioulas foram selecionadas com base em uma pré-caracterização fenotípica e molecular, qualquer uma poderia ter chegado ao final do trabalho.

Nenhum dos retrocruzamentos das F1 com a linhagem elite LA110 produziu sementes. Por outro lado, todos os retrocruzamentos com a linhagem LA67 produziram. Dessas, somente quatro foram selecionadas para o próximo ciclo de retrocruzamento. A seleção foi realizada objetivando manter, conforme possível, a variabilidade genética inicialmente selecionada. Por essa razão, os caracteres cor e tipo de grão também foram considerados.

As populações de retrocruzamento selecionadas foram:

a) LA67/Argentino Flint: variedade crioula selecionada inicialmente pelo peso do grão, com grãos alaranjados e flint;

b) LA67/Branco: variedade crioula selecionada pelos caracteres estatura de planta, altura de inserção da espiga e peso dos grãos, com grãos brancos e flint;

c) LA67/Cunha: variedade crioula selecionada pelo caráter altura de inserção da espiga, com grãos amarelos e dentados;

d) LA67/Dente de Ouro: variedade crioula selecionada pelos caracteres estatura de planta e altura de inserção da espiga, com grãos alaranjados e dentados.

Essas quatro populações foram submetidas ao segundo ciclo de retrocruzamento com a respectiva linhagem elite LA67 recorrente (Tabela 5), para reconstituir o genótipo da linhagem elite, porém mantendo algumas características da variedade crioula doadora de pólen. No experimento seguinte as quatro populações foram autofecundadas.

Os cinco genótipos parentais envolvidos no desenvolvimento das quatro populações mantidas no experimento, ou seja, a linhagem LA67 e as quatro variedades crioulas (Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro) foram genotipadas com marcadores microssatélites. Essa análise foi realizada visando selecionar, entre as quatro variedades crioulas, a mais divergente, em nível molecular, da linhagem elite LA67. De acordo com Nienhuis *et al.* (1993), análises de distância genética são muito importantes para o melhoramento genético, pois auxiliam na orientação eficiente dos cruzamentos. Quando a distância genética é estimada por marcadores moleculares, a estimativa é mais precisa, pois a influência ambiental que deve ser considerada nas análises fenotípicas, nesse caso, é descartada. Entretanto, a complementação com

análises fenotípicas permite a seleção de genótipos parentais com variabilidade genética específica para os caracteres desejados (Vieira *et al.*, 2005).

Dos 95 locos testados na linhagem LA67 e nas variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro, 23 não amplificaram, 20 foram monomórficos e 53 foram polimórficos (Tabela 4). Aproximadamente 73 % dos locos que amplificaram apresentaram padrão polimórfico. No total, foram identificados 129 alelos, com média de 2,4 alelos por primer, com bandas entre 50 e 350 pb.

TABELA 4. Locos polimórficos identificados entre a linhagem elite LA67 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro. Localização cromossômica (bin), número de alelos por loco e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Porto Alegre, RS.

| Loco | Bin | Nº de alelos | Tamanho (pb) |
|----------|-------|--------------|--------------|
| bnlg1451 | 10.02 | 2 | 120 - 150 |
| bnlg439 | 1.03 | 3 | 200 - 300 |
| mmc006 | 2.00 | 4 | 200 - 240 |
| mmc0401 | 2.05 | 3 | 180 - 220 |
| nc005 | 4.05 | 2 | 150 - 180 |
| phi006 | 4.10 | 2 | 80 - 100 |
| phi011 | 1.09 | 2 | 220 - 250 |
| phi032 | 9.04 | 2 | 230 - 250 |
| phi037 | 1.08 | 3 | 130 - 160 |
| phi065 | 9.03 | 3 | 140 - 180 |
| phi073 | 3.05 | 2 | 170 - 190 |
| phi079 | 4.05 | 2 | 200 - 220 |
| phi081 | 6.05 | 2 | 180 - 220 |
| phi085 | 5.06 | 3 | 250 - 380 |
| umc1018 | 6.00 | 3 | 120 - 140 |
| umc1023 | 6.00 | 2 | 130 - 140 |
| umc1026 | 2.04 | 2 | 130 - 150 |
| umc1034 | 8.02 | 2 | 110 - 180 |
| umc1056 | 5.03 | 2 | 150 - 160 |
| umc1064 | 1.11 | 2 | 150 - 170 |
| umc1094 | 9.05 | 2 | 140 - 155 |
| umc1173 | 4.09 | 2 | 160 - 180 |
| umc1185 | 2.03 | 3 | 100 - 120 |
| umc1197 | 4.10 | 2 | 120 - 150 |
| umc1202 | 8.03 | 2 | 100 - 110 |
| umc1294 | 4.02 | 3 | 160 - 200 |
| umc1359 | 8.00 | 2 | 300 - 350 |

continuação

TABELA 4. Locos polimórficos identificados entre a linhagem elite LA67 e as variedades crioulas Argentino Flint, Branco, Cunha e Dente de Ouro. Localização cromossômica (bin), número de alelos por loco e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Porto Alegre, RS.

| Loco | Bin | Nº de alelos | Tamanho (pb) |
|---------|-------|--------------|--------------|
| umc1363 | 1.01 | 2 | 100 - 130 |
| umc1397 | 1.03 | 3 | 150 - 170 |
| umc1426 | 7.00 | 3 | 140 - 160 |
| umc1466 | 4.08 | 3 | 100 - 120 |
| umc1506 | 10.05 | 2 | 100 - 140 |
| umc1547 | 10.01 | 3 | 70 - 90 |
| umc1555 | 2.03 | 2 | 90 - 110 |
| umc1564 | 5.03 | 2 | 150 - 160 |
| umc1576 | 10.02 | 2 | 50 - 80 |
| umc1594 | 3.09 | 3 | 120 - 160 |
| umc1620 | 4.07 | 2 | 140 - 150 |
| umc1622 | 2.00 | 2 | 70 - 90 |
| umc1627 | 8.03 | 3 | 120 - 170 |
| umc1636 | 9.02 | 2 | 110 - 130 |
| umc1657 | 9.05 | 3 | 120 - 140 |
| umc1702 | 4.05 | 2 | 100 - 180 |
| umc1799 | 7.04 | 3 | 80 - 120 |
| umc2047 | 1.09 | 3 | 150 - 220 |
| umc2084 | 9.01 | 3 | 100 - 150 |
| umc2096 | 1.03 | 2 | 150 - 170 |
| umc2110 | 2.05 | 2 | 180 - 200 |
| umc2150 | 4.01 | 3 | 160 - 200 |
| umc2164 | 5.05 | 3 | 80 - 160 |
| umc2182 | 8.04 | 2 | 180 - 220 |
| umc2302 | 5.04 | 3 | 100 - 140 |
| umc2316 | 6.03 | 2 | 120 - 130 |
| Total | - | 129 | - |
| Média | - | 2,4 | - |

Os dados obtidos através dos locos polimórficos geraram uma matriz de dados (Tabela 5) utilizando o Coeficiente de Nei72. A variedade Argentino Flint apresentou o maior coeficiente de distância genética em relação à linhagem elite LA67.

TABELA 5. Matriz de distância genética gerada pelo Coeficiente de Nei72 (NTSYS). Porto Alegre, RS.

| | LA67 | Dente de Ouro | Argentino Flint | Cunha | Branco |
|-----------------|-------------|---------------|-----------------|-------|--------|
| LA67 | 0,00 | | | | |
| Dente de Ouro | 0,76 | 0,00 | | | |
| Argentino Flint | 0,79 | 0,28 | 0,00 | | |
| Cunha | 0,67 | 0,27 | 0,36 | 0,00 | |
| Branco | 0,77 | 0,31 | 0,28 | 0,40 | 0,00 |

A estimativa da diversidade genética por marcadores moleculares, quando acompanhada de informações fenotípicas, é importante para a identificação de QTLs associados aos caracteres de interesse (Vieira *et al.*, 2005). Com base nisso, a população selecionada para o estudo de QTLs foi a desenvolvida a partir do cruzamento da linhagem elite LA67 com a variedade crioula Argentino Flint, com dois ciclos de retrocruzamento com a linhagem elite LA67 e um ciclo de autofecundação (Figura 9).

O número de famílias que constituíram a população selecionada foi muito baixo (Tabela 6) e, por essa razão, mais um ciclo de autofecundação foi realizado, para aumentar o tamanho da progênie, pois em estudos de QTLs, a progênie deve ser avaliada com o máximo de famílias possível (Ramalho *et al.*, 2001). Nesse experimento, 76 plantas produziram sementes e constituíram, dessa forma, a progênie submetida às análises fenotípicas e moleculares para a identificação dos marcadores associados aos QTLs.



FIGURA 9. Pais e população selecionada. Da esquerda para a direita: linhagem elite LA67, variedade crioula Argentino Flint, população segregante (RC2F2). Porto Alegre, RS. Foto: Paula Wiethölter.

TABELA 6. Número de famílias e número de sementes produzidas por família após o primeiro ciclo de autofecundação. Porto Alegre, RS.

| Populações | Número de famílias | Número de sementes/família |
|------------------------------|--------------------|----------------------------|
| RC2F2 – LA67/Argentino Flint | 36 | 1771 |
| RC2F2 – LA67/Branco | 18 | 469 |
| RC2F2 – LA67/Cunha | 14 | 398 |
| RC2F2 – LA67/Dente de Ouro | 9 | 263 |

4.2 Análises moleculares com marcadores microssatélites

Dos 177 locos microssatélites testados na linhagem elite LA67 e na variedade crioula Argentino Flint, 58 não amplificaram, 53 foram monomórficos e 66 foram polimórficos.

O percentual de polimorfismo entre marcadores moleculares é uma função das relações genéticas entre dois genótipos (Upadyayula *et al.*, 2006). Não há conhecimento de nenhuma relação de parentesco existente entre os pais. O genótipo recorrente foi desenvolvido por uma empresa privada na região de Santa Catarina, a partir de sucessivos ciclos de autofecundações, sob intenso controle para evitar contaminações. Já o genótipo doador é caracterizado como uma variedade de polinização aberta, cultivada, em geral, por produtores de pequenas propriedades na região de Canguçu (RS), sem qualquer controle de possíveis contaminações por genótipos com diferentes constituições genéticas. Além disso, deve-se considerar que o genótipo doador é identificado como sendo uma variedade crioula. Essas variedades, por si só, caracterizam-se como sendo portadoras de elevada variabilidade genética.

Considerando somente os locos monomórficos e polimórficos que amplificaram, o percentual de polimorfismo observado foi de, aproximadamente, 55 %, valor superior ao observado para microssatélites em milho, que é de 30 % a 50 % (Wong *et al.*, 2003), quando os genótipos parentais não são relacionados. Esse resultado confirma a heterogeneidade dos materiais parentais.

Dos 66 locos polimórficos identificados na progênie, 32 foram excluídos da análise devido a problemas de amplificação ou alto percentual de dados perdidos quando avaliados na progênie. Sendo assim, as 76 famílias da progênie foram analisadas com 34 locos SSR, abrangendo os 10 cromossomos da espécie (Tabela 7).

Considerando os 34 locos, no total, foram observados 82 alelos, com média de 2,4 alelos por loco e bandas com tamanhos entre 50 e 380 pb.

TABELA 7. Locos microssatélites analisados na progênie. Localização cromossômica dos locos (bin), número de alelos e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb). Porto Alegre, RS.

| Locos | Bin | Nº de alelos | Tamanho (pb) |
|---------|-------|--------------|--------------|
| bnlg439 | 10.01 | 3 | 200 - 300 |
| mmc0401 | 2.05 | 3 | 180 - 220 |
| nc004 | 10.04 | 3 | 150 - 170 |
| nc005 | 4.05 | 2 | 200 - 230 |
| orp1 | 4.05 | 2 | 200 - 300 |
| phi027 | 9.03 | 3 | 150 - 170 |
| phi032 | 9.04 | 2 | 230 - 250 |
| phi034 | 7.02 | 2 | 130 - 150 |
| phi037 | 1.08 | 3 | 130 - 160 |
| phi056 | 1.01 | 2 | 250 - 270 |
| phi062 | 10.04 | 2 | 150 - 170 |
| phi065 | 9.03 | 3 | 140 - 180 |
| phi075 | 6.00 | 2 | 220 - 250 |
| phi080 | 8.08 | 3 | 140 - 160 |
| phi083 | 2.04 | 3 | 130 - 160 |
| phi085 | 5.06 | 3 | 250 - 380 |
| umc1016 | 7.02 | 2 | 100 - 120 |
| umc1020 | 6.05 | 2 | 80 - 100 |
| umc1058 | 4.11 | 2 | 100 - 120 |
| umc1064 | 1.11 | 2 | 150 - 170 |
| umc1094 | 9.05 | 2 | 140 - 155 |
| umc1178 | 6.02 | 2 | 150 - 190 |
| umc1294 | 4.02 | 3 | 160 - 200 |
| umc1309 | 8.05 | 3 | 200 - 230 |
| umc1343 | 8.05 | 2 | 150 - 170 |
| umc1363 | 1.01 | 2 | 100 - 130 |
| umc1397 | 1.03 | 3 | 150 - 170 |
| umc1485 | 2.04 | 2 | 120 - 150 |
| umc1506 | 10.05 | 2 | 100 - 140 |
| umc1576 | 10.02 | 2 | 50 - 80 |
| umc1594 | 3.09 | 3 | 120 - 160 |
| umc1702 | 4.05 | 2 | 100 - 180 |
| umc2047 | 1.09 | 3 | 150 - 220 |
| y1SSR | 6.01 | 2 | 200 - 220 |
| Total | - | 82 | - |
| Média | - | 2,4 | - |

A segregação alélica dos marcadores foi verificada na progênie visando identificar possíveis marcadores com desvios significativos em relação a segregação mendeliana esperada, considerando apenas um loco com alelos segregando de forma independente. A segregação distorcida é definida como um desvio das frequências genótípicas observadas em relação às esperadas, a qual viola as leis de segregação de Mendel (Lu *et al.*, 2002).

Desvios na segregação podem ser provocados por diversos fatores como a ligação com alelos deletérios, tamanho inadequado da amostra (Ribas & Sebbenn, 2004) e alto nível de divergência entre os genótipos parentais (Ferreira, 2006). Em geral, esses locos são descartados dos estudos (Kao *et al.*, 1999), pois podem interferir erroneamente nos resultados. Em estudos de QTLs, nos quais se busca a identificação de marcadores associados a caracteres de interesse, marcadores apresentando desvios na segregação podem produzir falsos positivos.

Os cálculos relacionados com as frequências esperadas foram realizados de acordo com o polimorfismo observado entre os genótipos parentais e considerando uma progênie desenvolvida com dois ciclos de retrocruzamentos e dois ciclos de autofecundações. Entre os 36 locos polimórficos analisados, foram observados sete diferentes padrões polimórficos entre os genótipos parentais (Tabela 8), ou seja, alguns primers apresentaram o mesmo padrão (exemplo: para os locos umc1094, umc1363, umc1702, umc1506 e umc1485, LA67 apresentou o genótipo BB e Argentino Flint o genótipo AB). As frequências observadas foram quantificadas e o teste Qui-quadrado aplicado.

TABELA 8. Segregação esperada dos locos microssatélites em cada geração, conforme o genótipo dos pais (linhagem elite LA67 e variedade crioula Argentino Flint - AFlint). Porto Alegre, RS.

| Genótipo | | % esperado | | | |
|--------------|----|------------|-------|-------|-------|
| | | F1 | RC1F1 | RC2F1 | RC2F2 |
| LA67 | BB | 1/2 | 3/4 | 1/8 | 29/32 |
| AFlint | AB | 1/2 | 1/4 | 7/8 | 2/32 |
| Recombinante | AA | - | - | - | 1/32 |

continuação

TABELA 8. Segregação esperada dos locos microssatélites em cada geração, conforme o genótipo dos pais (linhagem elite LA67 e variedade crioula Argentino Flint - AFlint). Porto Alegre, RS.

| Genótipo | | % esperado | | | |
|--------------|----|------------|-------|-------|--------|
| | | F1 | RC1F1 | RC2F1 | RC2F2 |
| LA67 | BB | - | 1/2 | 3/4 | 26/32 |
| AFlint | AC | - | - | - | - |
| Recombinante | AB | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 2/32 |
| Recombinante | BC | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 2/32 |
| Recombinante | AA | - | - | - | 1/32 |
| Recombinante | CC | - | - | - | 1/32 |
| LA67 | BC | 1/4 | 3/8 | 14/32 | 28/128 |
| AFlint | AC | 1/4 | 1/8 | 2/32 | 4/128 |
| Recombinante | AB | 1/4 | 1/8 | 2/32 | 4/128 |
| Recombinante | CC | 1/4 | 2/8 | 8/32 | 48/128 |
| Recombinante | BB | - | 1/8 | 6/32 | 40/128 |
| Recombinante | AA | - | - | - | 4/128 |
| LA67 | AA | - | 1/2 | 6/8 | 26/32 |
| AFlint | BC | - | - | - | - |
| Recombinante | AB | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 2/32 |
| Recombinante | AC | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 2/32 |
| Recombinante | BB | - | - | - | 1/32 |
| Recombinante | CC | - | - | - | 1/32 |
| LA67 | AA | 1/2 | 3/4 | 7/8 | 29/32 |
| AFlint | AB | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 2/32 |
| Recombinante | BB | - | - | - | 1/32 |
| LA67 | BB | - | 1/2 | 3/4 | 13/16 |
| AFlint | AA | - | - | - | 1/16 |
| Recombinante | AB | 1 | 1/2 | 3/4 | 2/16 |
| LA67 | AA | - | 1/2 | 3/4 | 13/16 |
| AFlint | BB | - | - | - | 1/16 |
| Recombinante | AB | 1 | 1/2 | 1/4 | 2/16 |

Conforme observado na Tabela 9, não foram observados desvios significativos na segregação e a herança mendeliana foi confirmada para todos os locos analisados. Sendo assim, todos os marcadores foram selecionados para o estudo visando a identificação de QTLs associados aos caracteres fenotípicos.

TABELA 9. Teste Qui-quadrado para análise de segregação dos locos microssatélites. Porto Alegre, RS.

| Locos | GL | X_{calc} | $X_{\text{tab}(0,05)}$ | Observação |
|-----------|----|-------------------|------------------------|------------|
| bnlg439 | 5 | 4,173 | 11,07 | ns |
| mmc0401 | 5 | 0,0000 | 11,07 | ns |
| nc004 | 4 | 0,0400 | 9,49 | ns |
| orp1 | 2 | 0,0000 | 5,99 | ns |
| phi027 | 5 | 0,0000 | 11,07 | ns |
| phi032 | 2 | 0,01 | 5,99 | ns |
| phi034 | 2 | 0,04 | 5,99 | ns |
| phi037 | 4 | 0,00 | 9,49 | ns |
| phi056 | 2 | 0,00 | 5,99 | ns |
| phi062 | 2 | 0,00 | 5,99 | ns |
| phi065 | 4 | 0,01 | 9,49 | ns |
| phi075 | 2 | 0,35 | 5,99 | ns |
| phi080 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| phi083 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| phi085 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| umc1016 | 2 | 0,54 | 5,99 | ns |
| umc1020 | 2 | 0,44 | 5,99 | ns |
| umc1058 | 2 | 0,39 | 5,99 | ns |
| umc1064 | 2 | 0,14 | 5,99 | ns |
| umc1094 | 2 | 0,24 | 5,99 | ns |
| umc1178 | 2 | 0,05 | 5,99 | ns |
| umc1294 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| umc1309 | 4 | 0,00 | 9,49 | ns |
| umc1343 | 2 | 0,00 | 5,99 | ns |
| umc1363 | 2 | 0,44 | 5,99 | ns |
| umc1397 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| umc1485 | 2 | 0,00 | 5,99 | ns |
| umc1506 | 2 | 0,00 | 5,99 | ns |
| umc1576 | 2 | 0,00 | 5,99 | ns |
| umc1594 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| umc1702 | 2 | 0,02 | 5,99 | ns |
| umc2047 | 5 | 0,00 | 11,07 | ns |
| y1SSR | 2 | 0,13 | 5,99 | ns |
| zmRR1-PCR | 2 | 0,31 | 5,99 | ns |

GL: graus de liberdade; X_{calc} : valor calculado; $X_{\text{tab}(0,05)}$: valor tabelado; ns: não significativo.

4.3 Análises fenotípicas

As análises morfológicas são fundamentais para o estudo dos caracteres quantitativos. Esses caracteres, que são controlados por vários locos de pequeno efeito, sob ação do ambiente, não se distinguem em classes como os caracteres qualitativos, o que torna difícil a sua análise seguindo os critérios

mendelianos. Levando em consideração que os caracteres mais importantes, como o rendimento de grãos, tem herança quantitativa (Srdic *et al.*, 2007), as análises fenotípicas tornam-se indispensáveis para qualquer programa de melhoramento genético. Além disso, através delas, a variabilidade genética de uma população pode ser identificada e, dessa forma, selecionada quando de interesse.

Os genótipos parentais (LA67 e Argentino Flint) foram avaliados em relação aos 24 caracteres fenotípicos determinados. Apenas os caracteres intervalo no florescimento, estatura, inserção da espiga, diâmetro do internódio e diâmetro do sabugo apresentaram diferenças significativas na análise de variância (Tabela 10), indicando que, em geral, a linhagem elite LA67 e a variedade crioula Argentino Flint não eram fenotipicamente muito diferentes, considerando os demais caracteres. Entretanto, conforme descrito anteriormente, a análise molecular indicou um alto percentual de locos polimórficos (55 %). Segundo Carvalho *et al.* (2002), genótipos geneticamente dissimilares (SSR), porém com fenótipos similares e superiores para os caracteres de interesse, podem apresentar locos gênicos distintos controlando o mesmo caráter. Esses locos, quando reunidos, podem dar origem a uma progênie segregante transgressiva para o caráter sob seleção, devido a ação de genes complementares.

TABELA 10. Resumo da análise de variância (QME) dos caracteres fenotípicos avaliados nos pais, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, entre os meses de janeiro e junho de 2008. Porto Alegre, RS.

| Causas de variação | NDEE (dias) | NDEP (dias) | NDLP (dias) | IF (dias) | NTR | CHPP (cm) | CRLP (cm) | EST (cm) | INSE (cm) | NI | CI (cm) | DI (cm) |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------|-----------|-----------|----------|-----------|-------|---------|---------|
| Pais | 4,50 | 10,00 | 0,10 | 12.19** | 84,10 | 28,90 | 4,22 | 7344,10* | 2822,40* | 6,40 | 15,13 | 2,12* |
| Repetição | 15,82 | 20,65 | 26,65 | 11.30 | 10,40 | 35,90 | 16,15 | 978,35 | 343,15 | 0,35 | 11,48 | 2,82 |
| Resíduo | 7,5 | 18,25 | 11,85 | 6.90 | 19,60 | 3,90 | 4,60 | 351,85 | 320,15 | 2,15 | 7,60 | 0,19 |
| LA67 ¹ | 62,00 | 56,20 | 60,00 | 2 | 13,40 | 26,60 | 20,80 | 192,80 | 78,40 | 12,60 | 13,80 | 1,68 |
| AFLINT ² | 64,00 | 58,20 | 61,00 | 3 | 19,20 | 30,00 | 22,10 | 247,00 | 112,00 | 14,20 | 16,26 | 2,60 |
| CV (%) | 4,46 | 7,47 | 5,61 | 6850.70 | 27,16 | 6,98 | 10,00 | 8,53 | 18,79 | 10,94 | 18,35 | 20,42 |

| Causas de variação | NFACE | NFABE | CFIE (cm) | LFIE (cm) | CE (cm) | DE (cm) | DS (cm) | NFE | NGF | PECP (g) | PESP (g) | P100G (g) |
|---------------------|-------|-------|-----------|-----------|---------|---------|---------|-------|--------|----------|----------|-----------|
| Pais | 1,60 | 0,90 | 247,53 | 0,06 | 13,00 | 0,55 | 1,05** | 24,50 | 112,50 | 121,10 | 63,96 | 13,93 |
| Repetição | 0,75 | 0,50 | 160,23 | 1,54 | 5,32 | 0,13 | 0,02 | 3,17 | 25,82 | 2744,97 | 1518,81 | 28,41 |
| Resíduo | 0,35 | 0,40 | 82,20 | 0,50 | 4,35 | 0,06 | 0,02 | 4,5 | 25,50 | 541,18 | 585,71 | 8,85 |
| LA67 ¹ | 5,60 | 6,20 | 70,00 | 7,44 | 10,18 | 4,04 | 3,02 | 13,40 | 16,20 | 89,08 | 68,05 | 22,83 |
| AFLINT ² | 6,40 | 6,80 | 85,46 | 7,60 | 13,50 | 3,62 | 2,32 | 10,50 | 24,50 | 82,13 | 74,82 | 26,10 |
| CV (%) | 9,86 | 9,37 | 11,54 | 9,42 | 17,89 | 6,59 | 5,78 | 17,51 | 25,39 | 27,17 | 31,85 | 12,25 |

* Significativo a 5 %; ** significativo a 1 %; ¹ média da linhagem LA67; ² média da variedade crioula Argentino Flint; NDEE: número de dias para a emissão dos estigmas; NDEP: número de dias para a emissão do pendão; NDLP: número de dias para a liberação dos grãos de pólen; IF: intervalo de florescimento; NTR: número total de ramificações do pendão; CHPP: comprimento da haste principal do pendão; CRLP: comprimento da primeira ramificação lateral do pendão; EST: estatura; INSE: altura de inserção da espiga; NI: número de internódios; CI: comprimento do internódio; DI: diâmetro do internódio; NFACE: número de folhas acima da espiga; NFABE: número de folhas abaixo da espiga; CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga; LFIE: largura da folha de inserção da espiga; CE: comprimento da espiga; DE: diâmetro da espiga; DS: diâmetro do sabugo; NFE: número de fileiras de grãos por espiga; NGF: número de grãos por fileira; PECP: peso da espiga com palha; PESP: peso da espiga sem palha; P100G: peso de 100 grãos.

Na análise de variância das 76 famílias que constituíram a progênie (Tabela 11), 15 dos 24 caracteres fenotípicos avaliados foram significativos, ou seja, diversos caracteres que não apresentaram diferenças significativas entre a linhagem elite LA67 e a variedade crioula Argentino Flint (genótipos parentais), apresentaram na progênie, indicando que houve a formação de uma progênie com genótipos transgressivos.

Em geral, os caracteres mostraram um padrão de distribuição contínua em torno da média. O coeficiente de variação é utilizado para indicar o nível de precisão com que os caracteres são estimados. Os coeficientes de variação experimental apresentaram, em geral, valores reduzidos para a maioria dos caracteres (Tabela 11), indicando, dessa forma, boa precisão experimental.

TABELA 11. Resumo da análise de variância (QME) dos caracteres fenotípicos avaliados na progênie RC2F3, em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, entre os meses de janeiro e junho de 2008. Porto Alegre, RS.

| Causas de variação | NDEE (dias) | NDEP (dias) | NDLP (dias) | IF (dias) | NTR | CHPP (cm) | CRLP (cm) | EST (cm) | INSE (cm) | NI | CI (cm) | DI (cm) |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|-------|---------|---------|
| Genótipo | 22,52** | 16,07 | 16,14* | 12,19** | 14,68** | 21,70 | 15,74 | 628,16** | 300,31** | 1,82 | 6,20 | 0,30 |
| Repetição | 271,52 | 231,00 | 187,30 | 11,30 | 14,64 | 257,08 | 45,47 | 7904,70 | 2807,02 | 12,82 | 20,44 | 7,64 |
| Resíduo | 13,33 | 16,37 | 10,61 | 6,90 | 6,96 | 17,51 | 12,71 | 371,53 | 128,87 | 0,86 | 4,67 | 0,32 |
| Progênie ¹ | 62,30 | 58,27 | 62,25 | 0,00 | 14,81 | 25,42 | 19,03 | 196,40 | 84,60 | 12,74 | 14,31 | 1,82 |
| LA67 ² | 62,00 | 56,20 | 60,00 | 2,00 | 13,40 | 26,60 | 20,80 | 192,80 | 78,40 | 12,60 | 13,80 | 1,68 |
| AFLINT ³ | 64,00 | 58,20 | 61,00 | 3,00 | 19,20 | 30,00 | 22,10 | 247,00 | 112,00 | 14,20 | 16,26 | 2,60 |
| Geral ⁴ | 62,33 | 58,30 | 62,28 | 0,05 | 14,77 | 25,33 | 18,95 | 195,66 | 84,26 | 12,72 | 14,28 | 1,81 |
| CV (%) | 5,86 | 6,93 | 5,23 | 6850,70 | 17,87 | 16,52 | 18,81 | 9,85 | 13,47 | 7,31 | 15,13 | 31,27 |

| Causas de variação | NFACE | NFABE | CFIE (cm) | LFIE (cm) | CE (cm) | DE (cm) | DS (cm) | NFE | NGF | PECP (g) | PESP (g) | P100G (g) |
|-----------------------|--------|--------|-----------|-----------|---------|---------|---------|--------|---------|----------|----------|-----------|
| Genótipo | 0,88** | 1,77** | 69,62** | 2,08** | 5,26** | 0,15 | 0,21 | 3,61** | 24,79** | 630,51** | 2052,31 | 22,44** |
| Repetição | 1,34 | 27,56 | 213,31 | 1,92 | 10,20 | 2,91 | 3,58 | 1,63 | 53,60 | 4661,46 | 2912,86 | 257,67 |
| Resíduo | 0,47 | 1,01 | 47,50 | 0,66 | 2,71 | 0,14 | 0,25 | 2,11 | 11,95 | 363,87 | 1844,90 | 11,96 |
| Progênie ¹ | 5,37 | 6,20 | 74,50 | 7,55 | 11,31 | 3,72 | 2,63 | 11,93 | 17,51 | 78,90 | 77,43 | 21,94 |
| LA67 ² | 5,60 | 6,20 | 70,00 | 7,44 | 10,18 | 4,04 | 3,02 | 13,40 | 16,20 | 89,08 | 68,05 | 22,83 |
| AFLINT ² | 6,40 | 6,80 | 85,46 | 7,60 | 13,50 | 3,62 | 2,32 | 10,50 | 24,50 | 82,13 | 74,82 | 26,10 |
| Geral ⁴ | 3,37 | 6,19 | 74,39 | 7,55 | 11,30 | 3,72 | 2,63 | 11,92 | 17,44 | 78,69 | 67,83 | 21,87 |
| CV (%) | 12,88 | 16,26 | 9,26 | 10,80 | 14,56 | 10,11 | 19,16 | 12,17 | 19,81 | 24,24 | 63,33 | 15,81 |

* Significativo a 5 %; ** significativo a 1 %; ¹ média da Progênie; ² média da linhagem LA67; ³ média da variedade crioula Argentino Flint; ⁴ média geral; NDEE: número de dias para a emissão dos estigmas; NDEP: número de dias para a emissão do pendão; NDLP: número de dias para a liberação dos grãos de pólen; IF: intervalo de florescimento; NTR: número total de ramificações do pendão; CHPP: comprimento da haste principal do pendão; CRLP: comprimento da primeira ramificação lateral do pendão; EST: estatura; INSE: altura de inserção da espiga; NI: número de internódios; CI: comprimento do internódio; DI: diâmetro do internódio; NFACE: número de folhas acima da espiga; NFABE: número de folhas abaixo da espiga; CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga; LFIE: largura da folha de inserção da espiga; CE: comprimento da espiga; DE: diâmetro da espiga; DS: diâmetro do sabugo; NFE: número de fileiras de grãos por espiga; NGF: número de grãos por fileira; PECP: peso da espiga com palha; PESP: peso da espiga sem palha; P100G: peso de 100 grãos.

Em relação aos caracteres envolvidos com o florescimento, foi observada média de 62,33 dias para a emissão do estigma, 58,30 dias para a emissão do pendão e 62,28 dias para a liberação dos grãos de pólen. O caráter intervalo no florescimento apresentou média igual a zero, indicando que, em geral, não foram constatadas grandes diferenças entre o florescimento feminino e masculino. Os resultados encontrados estão de acordo com outros trabalhos (Silva, 2002; Alves, 2006), indicando coerência nos dados.

Quanto às características do pendão, o caráter número total de ramificações do pendão apresentou média de 14,8, semelhante a encontrada por Sabadin (2008) de 15,0. O caráter comprimento da haste principal do pendão apresentou média de 25,3 cm e o caráter comprimento da primeira ramificação lateral do pendão apresentou média de 18,9 cm.

Para os caracteres estatura de planta e altura de inserção da espiga, as médias observadas na progênie foram de 195,7 cm e 84,3 cm, respectivamente. Resultados similares foram encontrados por Silva (2002) e Sabadin (2008). Para os caracteres relacionados ao internódio, foram encontradas médias de 12,7 para o caráter número de internódios, 14,3 para o caráter comprimento do internódio e 1,8 cm para o caráter diâmetro do internódio.

Para o número de folhas acima da espiga foi observada média de 3,35, para número de folhas abaixo da espiga a média foi de 6,19, para comprimento da folha de inserção da espiga a média foi de 74,39 cm e para a largura da folha de inserção da espiga a média observada foi de 7,55 cm.

Em relação aos caracteres relacionados com a produtividade, a média observada para o caráter comprimento da espiga foi de 11,30 cm e para o

caráter diâmetro da espiga 3,72 cm. Para o caráter diâmetro do sabugo a média constatada foi de 2,63 cm, para o caráter número de fileiras de grãos por espiga a média foi de 11,92 e para o caráter número de grãos por fileira a média observada foi de 17,44. Para o peso da espiga com palha a média observada foi de 78,69 gramas, para o peso da espiga sem palha a média foi de 67,83 gramas e para o caráter peso de 100 grãos a média observada foi de 21,87 gramas. Resultados similares foram encontrados por Sabadin (2008), que encontrou médias de 13,8 cm para comprimento da espiga, 3,8 cm para diâmetro da espiga, 11,3 para número de fileiras e 28,6 para número de grãos.

4.3.1 Identificação de famílias com genótipos transgressivos

Foram estimados os intervalos de confiança (IC) na linhagem elite LA67, para a identificação de segregação transgressiva na progênie, para todos os caracteres significativos na análise de variância (Tabela 12). Nessa análise, para cada característica, considerou-se que as famílias com médias menores ao IC inferior e com médias maiores ao IC superior da linhagem LA67, representariam famílias com genótipos recombinantes (novos alelos em homozigose e/ou novas combinações alélicas). O objetivo principal dessa análise foi o de verificar a natureza da variabilidade introgridida, identificando as famílias com fenótipos diferenciados e destacando aquelas melhores que a linhagem elite LA67 (original). Os caracteres foram analisados individualmente.

Segregação transgressiva foi observada para os caracteres número de fileiras de grãos por espiga, número total de ramificações do pendão, peso de 100 grãos, número de internódios, comprimento da espiga, comprimento da folha de inserção da espiga, número de dias para a emissão do estigma,

número de dias para a liberação dos grãos de pólen, inserção da espiga, largura da folha de inserção da espiga, número de folhas abaixo da espiga, número de folhas acima da espiga e estatura de planta.

Para o caráter número de fileiras de grãos por espiga, foram observadas cinco famílias com médias menores que o IC inferior da linhagem elite LA67. Porém, somente famílias com médias maiores seriam desejadas para esse caráter, que está diretamente relacionado com o rendimento de grãos.

Para o número total de ramificações, foram observadas 14 famílias com médias maiores que o IC superior da linhagem elite LA67. Entretanto, devido ao alto consumo de fotoassimilados durante o desenvolvimento do pendão (Sangoi *et al.*, 2002), o melhoramento genético vem buscando desenvolver genótipos com número menor de ramificações.

TABELA 12. Estimativa do intervalo de confiança (IC) inferior (INF) e superior (SUP) na linhagem elite LA67 e identificação das famílias (de 1 a 76) com médias menores ao IC-INF da linhagem e maiores ao IC-SUP da linhagem, nos caracteres fenotípicos analisados. Porto Alegre, RS.

| | IC da linhagem LA67 | | Famílias com médias menores que o IC-INF e maiores que o IC-SUP da linhagem LA67 | |
|-------|---------------------|--------|--|---|
| | INF | SUP | Menores que IC INF | Maiores que IC SUP |
| NFE | 10,41 | 16,39 | 8, 20, 36, 53, 76 | - |
| NTR | 11,14 | 15,66 | - | 9, 16, 17, 30, 33, 36, 45, 46, 47, 48, 57, 62, 64, 65 |
| P100G | 19,80 | 25,85 | 3, 10, 16, 17, 24, 48, 50, 51, 54, 56, 57, 61, 64 | 27, 29, 36, 45, 47 |
| PECP | 25,34 | 152,84 | - | - |
| NI | 11,49 | 13,71 | - | 12, 17, 66 |
| NGF | 9,10 | 23,30 | - | - |
| CE | 7,05 | 13,31 | - | 8, 15, 43, 44 |

continuação

TABELA 12. Estimativa do intervalo de confiança (IC) inferior (INF) e superior (SUP) na linhagem elite LA67 e identificação das famílias (de 1 a 76) com médias menores ao IC-INF da linhagem e maiores ao IC-SUP da linhagem, nos caracteres fenotípicos analisados. Porto Alegre, RS.

| | IC da linhagem LA67 | | Famílias com médias menores que o IC-INF e maiores que o IC-SUP da linhagem LA67 | |
|-------|---------------------|--------|--|---|
| | INF | SUP | Menores que IC INF | Maiores que IC SUP |
| CFIE | 53,81 | 86,19 | - | 45 |
| NDEE | 57,54 | 64,86 | 20, 68 | 8, 9, 10, 26, 30, 53, 54 |
| NDLP | 58,16 | 64,64 | 46 | 8, 10, 13, 24, 53, 54, 75, 76 |
| INSE | 59,19 | 97,61 | - | 8, 12, 28, 32, 38, 50, 56, 70 |
| LFIE | 6,83 | 8,05 | 13, 30, 32, 54, 59, 60, 61, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 76 | 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 20, 23, 27, 29, 40, 43, 44, 47, 49, 57, 62, 64, 65, 66, 70, 71, 72 |
| NFABE | 5,16 | 7,24 | - | 4, 32, 56, 58 |
| NFACE | 4,92 | 6,28 | - | 9, 66 |
| EST | 169,15 | 216,45 | - | 10, 28, 32, 38, 70 |

NFE: número de fileiras de grãos por espiga; NTR: número total de ramificações do pendão; P100G: peso de 100 grãos; PECP: peso da espiga com palha; NI: número de internódios; NGF: número de grãos por fileira; CE: comprimento da espiga; NDEE: número de dias para a emissão dos estigmas; NDLP: número de dias para a liberação dos grãos de pólen; INSE: altura de inserção da espiga; CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga; LFIE: largura da folha de inserção da espiga; NFABE: número de folhas abaixo da espiga; NFACE: número de folhas acima da espiga; EST: estatura.

O caráter peso de 100 grãos apresentou cinco famílias com médias maiores que o IC superior da linhagem elite LA67, indicando que alguns alelos favoráveis ao aumento na produção podem ter sido incorporados nesses indivíduos. Entretanto, 13 famílias apresentaram médias menores que o IC inferior da linhagem. Esse resultado era esperado devido ao conhecimento prévio de que, em geral, as variedades crioulas são menos produtivas que os materiais melhorados. Porém, a baixa produção característica dessas variedades não significa que elas não possuam alelos favoráveis ao aumento

da produção, significa apenas que, no genoma onde naturalmente se encontram, a expressão desses alelos pode não ser estimulada. Entretanto, é possível que, em uma outra constituição genética, sob novas combinações alélicas e até mesmo sob novos estímulos (outros promotores, por exemplo), a expressão do caráter com o qual está envolvido possa ser diferenciada. O mesmo pode ser considerado em relação ao caráter comprimento da espiga, que também está relacionado com o rendimento de grãos, para o qual quatro famílias apresentaram médias maiores que o IC superior da linhagem elite LA67.

Os caracteres estatura de planta e altura de inserção da espiga apresentaram, respectivamente, cinco e oito famílias com médias maiores que o IC superior da linhagem elite LA67. Na Tabela 12 pode-se observar que as médias da variedade crioula Argentino Flint, para ambos caracteres, são muito maiores que as apresentadas na linhagem elite LA67. Por essa razão, era esperado encontrar algumas famílias na progênie com médias superiores as encontradas na linhagem elite LA67, devido a possível incorporação de alguns alelos da variedade crioula Argentino Flint.

O caráter número de internódios apresentou três famílias com médias maiores que o IC superior da linhagem elite LA67. Como o número de internódios está relacionado com a estatura da planta, é possível que o aumento no número de internódios, nessas famílias, também tenha ocorrido pela incorporação de alelos específicos da variedade crioula Argentino Flint.

O caráter largura da folha de inserção da espiga apresentou a maior quantidade de famílias com segregação transgressiva, com 14 famílias com médias menores que o IC inferior e 26 famílias com médias maiores que o IC

superior da linhagem elite LA67. Como o tamanho das folhas também é um caráter no qual o melhoramento genético vem trabalhando para que seja reduzido, as famílias da progênie que foram selecionadas por apresentarem médias menores que o IC inferior da linhagem elite LA67 seriam altamente desejáveis para a seleção.

Em relação aos caracteres relacionados com o ciclo, tanto o caráter número de dias para a emissão do estigma quanto o caráter número de dias para a liberação dos grãos de pólen, apresentaram famílias com segregação transgressiva nas duas classes fora do IC da linhagem elite LA67, onde o primeiro caráter apresentou duas famílias com médias menores que o IC inferior da linhagem elite e sete famílias com médias maiores que o IC superior da linhagem e o segundo apresentou uma única família com média menor que o IC inferior e oito famílias com médias maiores que o IC superior da linhagem elite LA67.

Os caracteres peso da espiga com palha e número de grãos por fileira não apresentaram famílias com segregação transgressiva, indicando que, possivelmente, nenhum dos alelos oriundos da variedade crioula Argentino Flint estariam agindo sob esses caracteres na progênie em geral.

Sendo assim, esses resultados indicam que a introgressão de alelos da variedade crioula Argentino Flint na linhagem elite LA67 resultou em uma progênie com variabilidade para diversos caracteres, mas apenas identificou segregação transgressiva favorável ao melhoramento para os caracteres relacionados com o ciclo, largura da folha de inserção da espiga, peso de 100 grãos e comprimento da espiga. As famílias que se mantiveram dentro do intervalo de confiança da linhagem elite LA67 foram consideradas como

similares a ela, ou seja, se a introgressão de alelos da variedade crioula Argentino Flint ocorreu, provavelmente, ela foi perdida durante os retrocruzamentos. Dessa forma, o genoma da linhagem elite LA67 teria sido reconstituído e os alelos oriundos da variedade crioula Argentino Flint, eliminados durante os retrocruzamentos. As famílias que apresentaram segregação transgressiva poderiam ser, dessa forma, aquelas onde a introgressão de alelos da variedade crioula Argentino Flint ocorreu e permaneceu.

Li *et al.* (2008), analisando famílias desenvolvidas a partir do cruzamento de uma linhagem elite de milho pipoca com uma linhagem de milho dentado, com dois ciclos de retrocruzamentos com a linhagem de milho pipoca, observou segregação transgressiva para os caracteres estatura de planta, inserção da espiga, número de folhas abaixo da espiga e comprimento do pendão.

4.3.2 Parâmetros genéticos

Através das análises fenotípicas, foi possível estimar as variâncias genéticas e ambientais e a herdabilidade dos caracteres.

Em todos os caracteres analisados, os valores das estimativas de ambiente foram sempre maiores que os valores genéticos (Tabela 13). Os caracteres número de dias para a emissão do pendão, diâmetro do sabugo e diâmetro do internódio apresentaram valores negativos de variância genética e, conseqüentemente, de herdabilidade, que por definição não existe, sendo considerados, dessa forma, como iguais a zero.

TABELA 13. Estimativa dos parâmetros de variância genética (σ^2_G), de variância ambiental (σ^2_E), fenotípica (σ^2_F), herdabilidade (h^2) e coeficiente de variação genética (CVg) para os caracteres fenotípicos avaliados na progênie RC2F3. Porto Alegre, RS.

| Parâmetros | NDEE | NDEP | NDLP | IF | NTR | CHPP | CRLP | EST | INSE | NI | CI | DI |
|--------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| σ^2_G | 1,84 | 0,00 | 1,11 | 1,06 | 1,54 | 0,84 | 0,61 | 51,32 | 34,29 | 0,19 | 0,31 | 0,000 |
| σ^2_E | 13,33 | 16,37 | 10,61 | 6,90 | 6,96 | 17,51 | 12,71 | 371,53 | 128,87 | 0,86 | 4,67 | 0,320 |
| σ^2_F | 4,50 | 3,21 | 3,23 | 2,44 | 2,94 | 4,34 | 3,15 | 125,63 | 60,06 | 0,36 | 1,24 | 0,006 |
| h^2 (%) | 41,00 | 0,00 | 34,00 | 43,00 | 53,00 | 19,00 | 19,00 | 41,00 | 57,00 | 52,00 | 25,00 | 0,000 |
| CVg (%) | 2,18 | 0,00 | 1,69 | 6982,84 | 8,40 | 3,62 | 4,12 | 3,66 | 6,95 | 3,43 | 3,90 | 0,000 |

| Parâmetros | NFACE | NFABE | CFIE | LFIE | CE | DE | DS | NFE | NGF | PECP | PESP | P100G |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|-------|
| σ^2_G | 0,08 | 0,15 | 4,42 | 0,28 | 0,51 | 0,001 | 0,000 | 0,30 | 2,60 | 53,33 | 41,48 | 2,10 |
| σ^2_E | 0,47 | 1,01 | 47,50 | 0,66 | 2,71 | 0,140 | 0,250 | 2,11 | 11,95 | 363,87 | 1844,90 | 11,96 |
| σ^2_F | 0,18 | 0,35 | 13,92 | 0,41 | 1,05 | 0,030 | 0,004 | 0,72 | 4,96 | 126,10 | 410,46 | 4,49 |
| h^2 (%) | 46,00 | 43,00 | 32,00 | 68,00 | 49,00 | 5,000 | 0,000 | 42,00 | 52,00 | 42,00 | 10,00 | 47,00 |
| CVg (%) | 5,29 | 6,26 | 2,83 | 7,01 | 6,31 | 0,850 | 0,000 | 4,59 | 9,24 | 9,28 | 9,49 | 6,63 |

NDEE: número de dias para a emissão dos estigmas; NDEP: número de dias para a emissão do pendão; NDLP: número de dias para a liberação dos grãos de pólen; IF: intervalo de florescimento; NTR: número total de ramificações do pendão; CHPP: comprimento da haste principal do pendão; CRLP: comprimento da primeira ramificação lateral do pendão; EST: estatura; INSE: altura de inserção da espiga; NI: número de internódios; CI: comprimento do internódio; DI: diâmetro do internódio; NFACE: número de folhas acima da espiga; NFABE: número de folhas abaixo da espiga; CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga; LFIE: largura da folha de inserção da espiga; CE: comprimento da espiga; DE: diâmetro da espiga; DS: diâmetro do sabugo; NFE: número de fileiras de grãos por espiga; NGF: número de grãos por fileira; PECP: peso da espiga com palha; PESP: peso da espiga sem palha; P100G: peso de 100 grãos.

É importante salientar que para que a seleção de indivíduos geneticamente superiores seja eficiente, deve haver suficiente variação genotípica na população original e a herdabilidade do caráter em questão deve ser alta. De um modo geral, quando a herdabilidade é superior a 50 %, ela é considerada alta (Bueno *et al.*, 2001).

Os valores de herdabilidade estimados variaram entre zero e 68 %. A herdabilidade foi estimada em 41 % para estatura e 57 % para inserção da espiga. Esses valores são próximos aos encontrados por Santos (2008), em milho, porém foram inferiores aos encontrados por Silva *et al.* (2001), Silva (2002), Sibov *et al.* (2003) e Li *et al.* (2008). Em geral, estatura e inserção da espiga apresentam valores elevados de herdabilidade (Austin e Lee, 1996; Li *et al.*, 2007a).

Para o caráter comprimento do internódio, o valor estimado para a herdabilidade foi de baixa magnitude (25 %) e para número de internódios foi de alta magnitude (52 %). O caráter largura da folha de inserção da espiga apresentou a maior herdabilidade entre os caracteres analisados (68 %). Para comprimento da folha de inserção da espiga, a herdabilidade foi estimada em 32 %, para número de folhas acima da espiga em 46 % e para número de folhas abaixo da espiga em 43 %, valor inferior ao encontrado por Li *et al.* (2008), de 78 %.

Para os caracteres do florescimento, a herdabilidade estimada para o número de dias para a liberação do pólen foi de 34 % e a estimada para a emissão do estigma de 41 %. Esses valores foram inferiores aos obtidos por (Silva, 2002), que encontrou estimativas para esses caracteres de 82 % e 83 %, respectivamente. Para os caracteres do pendão, a herdabilidade foi

estimada em 19 % para comprimento da primeira ramificação lateral do pendão, 19 % para comprimento da haste principal do pendão e 53 % para número total de ramificações do pendão.

Em relação aos caracteres relacionados com a produtividade, a herdabilidade foi estimada em 49 % para comprimento da espiga. Ross *et al.* (2006) e Bento (2006) encontraram valores superiores para esse caráter, de 65 % e 90 %, respectivamente. Entretanto, existem relatos com valores muito variáveis encontrados para esse caráter, com valores entre 20 e 90 % (Veldboom & Lee, 1994; Malvar *et al.*, 1996; Austin & Lee, 1998; Aguiar 2003). A variação encontrada para o comprimento da espiga, provavelmente, é consequência da população estudada e do desenho experimental adotado em cada trabalho.

A estimativa da herdabilidade para o diâmetro da espiga foi de apenas 5 %, indicando que esse caráter foi muito afetado pelo ambiente. Esse valor foi muito inferior ao encontrado por Veldboom & Lee (1994) e Bento (2006), que estimaram em 92 % a herdabilidade para esse caráter, porém mais próximo ao encontrado por Li *et al.* (2008), que estimou a herdabilidade desse caráter em 28 %, em uma população de retrocruzamento entre milho pipoca e milho dentado.

A estimativa de herdabilidade encontrada para o número de fileiras por espiga foi de 42 %. Para esse caráter, foram descritos valores entre 57 % e 94 % (Beavis *et al.*, 1994; Malvar *et al.*, 1996; Bento, 2006; Ross *et al.*, 2006). A herdabilidade para o número de grãos por fileira foi de 52 %, 47 % para peso de 100 grãos, 42 % para peso da espiga com palha e 10 % para peso da espiga sem palha. Para o número de grãos por fileira, foram encontrados

valores de, aproximadamente, 70 % (Beavis *et al.*, 1994; Aguiar, 2003). Raposo & Ramalho (2004) encontraram valores entre 22 % e 57 % para o caráter peso da espiga sem palha, em seis populações estudadas.

No presente trabalho, as estimativas de herdabilidade obtidas, em geral, foram bastante variáveis, com valores baixos, intermediários e altos. Alguns caracteres apresentaram estimativas inferiores quando comparados com outros trabalhos. Entretanto, a comparação entre as estimativas obtidas em populações diferentes é muito subjetiva, devido à falta de padronização dos métodos de estimação. Além disso, segundo Sibov *et al.* (2003), baixos valores de herdabilidade também podem ser explicados pela ausência de variabilidade genética para o caráter. Em geral, os caracteres fenotípicos que apresentaram os valores mais baixos de herdabilidade (Tabela 18) não apresentaram diferenças significativas na progênie (Tabela 12).

Também deve ser considerado que a herdabilidade não é uma medida fixa, e pode variar sob diferentes condições que podem envolver tanto o genótipo, os parâmetros meteorológicos da safra e o local, ou seja, a herdabilidade estimada considerando a variância fenotípica num ambiente amplo é diferente daquela estimada num ambiente mais homogêneo. Sendo assim, o ideal é obter a estimativa da herdabilidade de determinado caráter para o ambiente no qual a seleção é praticada, considerando a variância fenotípica da unidade utilizada na seleção (Bueno *et al.*, 2001).

As chances de obtenção de sucesso na seleção dos caracteres que apresentaram valores de herdabilidade altos, tais como número total de ramificações do pendão (53 %), inserção da espiga (57 %), número de internódios (52 %), largura da folha de inserção da espiga (68 %) e número de

grãos por fileira (52 %) são grandes nessa população. Já naqueles caracteres onde a herdabilidade foi muito baixa, a seleção torna-se muito complicada, provavelmente, por serem muito influenciados pelo ambiente. Para esses caracteres, o ideal é que a seleção seja feita de maneira indireta, selecionando caracteres de alta herdabilidade correlacionados a esses com valores muito baixos.

4.3.3 Correlações entre caracteres fenotípicos

Estudos envolvendo a identificação de caracteres correlacionados têm sido realizados há muitas décadas em milho. Conforme descrito por Sprague & Eberhart (1977), correlações significativas positivas e negativas entre caracteres fenotípicos de interesse agrônômico foram detalhadamente descritas por Jenkins ainda no início do século passado (1929). Desde então, a identificação de associações entre esses caracteres têm tido um grande valor prático, por possibilitar a seleção indireta de caracteres importantes de baixa herdabilidade ou de difícil seleção. Sendo assim, a eficiência desse tipo de seleção depende da correlação entre os caracteres e da alta herdabilidade do caráter selecionado (Falconer, 1987).

Na progênie, foram observadas diversas correlações significativas positivas e negativas entre vários caracteres analisados, com valores variando de muito baixos a muito altos (Tabela 14). Os valores mais elevados foram observados entre os caracteres número de dias para a emissão do estigma e número de dias para a liberação do pendão (0,76), diâmetro da espiga e diâmetro do sabugo (0,73), estatura e inserção (0,68), comprimento do internódio e estatura (0,66), número de dias para a emissão do pendão e

número de dias para a liberação do pólen (0,62) e comprimento do internódio e inserção (0,62).

TABELA 14. Coeficientes de correlação observados na progênie (os valores em negrito foram significativos a 5 %). Porto Alegre, RS.

| | NEP | NEE | NLP | IF | CI | NI | DI | CFIE | LFIE | NFC | NFB | CHP | CRP | NTR | EST | INS | CE | DE | DS | NFE | NGF | PEC | PES | P100 | |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|------|--|
| NEP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NEE | 0,54 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NLP | 0,62 | 0,76 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IF | 0,01 | 0,51 | -0,17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CI | -0,02 | 0,05 | 0,02 | 0,05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NI | -0,09 | 0,02 | 0,02 | -0,00 | 0,24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DI | 0,15 | 0,16 | 0,15 | 0,04 | -0,18 | -0,26 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CFIE | 0,03 | 0,14 | 0,07 | 0,11 | 0,43 | 0,29 | -0,07 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LFIE | 0,01 | -0,11 | -0,12 | -0,01 | -0,00 | 0,17 | 0,00 | -0,05 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NFC | 0,11 | 0,22 | 0,18 | 0,09 | -0,15 | 0,22 | 0,30 | -0,07 | 0,02 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NFB | -0,22 | -0,22 | -0,17 | -0,11 | 0,14 | 0,38 | -0,34 | -0,01 | -0,01 | -0,25 | | | | | | | | | | | | | | | |
| CHP | -0,01 | -0,06 | -0,15 | 0,09 | 0,01 | 0,11 | 0,09 | 0,23 | 0,08 | 0,03 | -0,05 | | | | | | | | | | | | | | |
| CRL | -0,02 | -0,04 | -0,07 | 0,05 | 0,05 | 0,11 | 0,02 | 0,28 | -0,02 | 0,04 | 0,01 | 0,58 | | | | | | | | | | | | | |
| NTR | -0,04 | 0,01 | -0,03 | 0,06 | -0,06 | 0,14 | -0,03 | 0,08 | 0,10 | -0,11 | 0,16 | 0,06 | 0,06 | | | | | | | | | | | | |
| EST | -0,10 | -0,07 | -0,08 | -0,01 | 0,66 | 0,50 | -0,22 | 0,49 | 0,06 | -0,08 | 0,22 | 0,16 | 0,20 | 0,07 | | | | | | | | | | | |
| INS | -0,00 | 0,02 | 0,07 | -0,06 | 0,62 | 0,49 | -0,23 | 0,43 | 0,11 | -0,26 | 0,36 | 0,10 | 0,10 | 0,04 | 0,68 | | | | | | | | | | |
| CE | -0,06 | -0,18 | -0,06 | -0,19 | -0,01 | 0,22 | 0,06 | 0,06 | 0,12 | 0,04 | 0,15 | -0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,12 | 0,19 | | | | | | | | | |
| DE | -0,25 | -0,34 | -0,36 | -0,04 | 0,18 | 0,19 | -0,23 | 0,14 | 0,11 | -0,12 | 0,25 | 0,00 | 0,04 | 0,04 | 0,30 | 0,23 | 0,24 | | | | | | | | |
| DS | -0,15 | -0,20 | -0,22 | -0,00 | 0,24 | 0,16 | -0,30 | 0,21 | 0,03 | -0,20 | 0,24 | -0,08 | 0,04 | 0,06 | 0,26 | 0,25 | 0,10 | 0,73 | | | | | | | |
| NFE | -0,11 | -0,16 | -0,22 | 0,05 | -0,08 | 0,11 | -0,06 | 0,03 | 0,15 | 0,04 | 0,04 | 0,08 | 0,06 | 0,07 | 0,03 | -0,11 | -0,02 | 0,30 | 0,20 | | | | | | |
| NGF | -0,09 | -0,34 | -0,17 | -0,28 | -0,04 | 0,09 | -0,07 | -0,04 | 0,18 | -0,17 | 0,12 | 0,04 | 0,04 | 0,06 | 0,06 | 0,11 | 0,51 | 0,33 | 0,19 | 0,11 | | | | | |
| PEC | -0,23 | -0,41 | -0,37 | -0,13 | 0,03 | 0,14 | 0,09 | 0,13 | 0,25 | -0,02 | 0,06 | 0,11 | 0,15 | 0,02 | 0,24 | 0,15 | 0,58 | 0,54 | 0,35 | 0,27 | 0,52 | | | | |
| PES | -0,06 | -0,15 | -0,11 | -0,08 | -0,02 | 0,05 | 0,02 | 0,07 | 0,13 | -0,01 | -0,08 | 0,06 | 0,08 | -0,02 | 0,07 | -0,00 | 0,18 | 0,25 | 0,14 | 0,13 | 0,27 | 0,45 | | | |
| P100 | -0,31 | -0,39 | -0,42 | -0,03 | 0,12 | 0,07 | -0,08 | 0,10 | 0,12 | -0,05 | 0,17 | 0,09 | 0,01 | -0,06 | 0,23 | 0,22 | 0,15 | 0,40 | 0,23 | -0,12 | -0,01 | 0,48 | 0,17 | | |

NEP: número de dias para a emissão do pendão; NEE: número de dias para a emissão do estigma; NLP: número de dias para a liberação dos grãos de pólen; IF: intervalo no florescimento; CI: comprimento do internódio; NI: número de internódios; DI: diâmetro do internódio; CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga; LFIE: largura da folha de inserção da espiga; NFC: número de folhas acima da espiga; NFB: número de folhas abaixo da espiga; CHP: comprimento da haste principal do pendão; CRL: comprimento da primeira ramificação lateral do pendão; NTR: número total de ramificações do pendão; EST: estatura de planta; INSE: inserção da espiga; CE: comprimento da espiga; DE: diâmetro da espiga; DS: diâmetro do sabugo; NFE: número de fileiras de grãos por espiga; NGF: número de grãos por fileira; PEC: peso da espiga com palha; PES: peso da espiga sem palha; P100: peso de 100 grãos.

Valores intermediários do coeficiente de correlação foram observados entre os caracteres comprimento da folha e estatura (0,49), número de internódios e inserção (0,49), peso da espiga com palha e peso de 100 grãos (0,48), peso da espiga com palha e peso da espiga sem palha (0,45), comprimento da folha e inserção (0,43) e comprimento da folha e comprimento do internódio (0,43), peso de 100 grãos e número de dias para a liberação do pólen (-0,42), peso da espiga com palha e número de dias para a emissão dos estigmas (-0,41) enquanto que os menores valores foram observados entre largura da folha e comprimento do internódio (-0,00069) e inserção e número de dias para a emissão do pendão (-0,00085).

Os caracteres relacionados com os componentes de produção (peso de 100 grãos, peso da espiga sem palha e com palha, número de grãos por fileira e número de fileiras de grãos, diâmetro da espiga, do sabugo e comprimento da espiga) apresentaram, na sua maioria, correlações significativas positivas entre si, confirmando que esses caracteres, em geral, são correlacionados entre si e contribuem significativamente com a produção de grãos (Ottaviano & Camussi, 1981).

As análises de correlação são importantes também, quando elas identificam associações menos óbvias. Um exemplo de uma excelente aplicação relaciona-se com o caráter número total de ramificações do pendão e os caracteres relacionados com a produtividade. Quando a correlação é negativa e significativa, ao selecionar as plantas mais produtivas, indiretamente as plantas com um menor número de ramificações serão selecionadas. Dessa maneira, todo o trabalho relacionado com identificação das plantas com o menor número de ramificações torna-se desnecessário. Apesar desse tipo de

correlação ser observada com uma certa frequência (Jiang *et al.*, 1999; Mickelson *et al.*, 2002), a correlação significativa entre esses caracteres não foi observada nesse trabalho.

Por outro lado, os componentes da produção apresentaram correlações negativas com os envolvidos com o florescimento (número de dias para a emissão dos estigmas, número de dias para a emissão do pendão e intervalo no florescimento). Entre todas as combinações possíveis (cada caráter relacionado com o rendimento de grãos, em relação a cada caráter relacionado com o florescimento), somente cinco das 24 combinações não foram significativas a 5 %. O maior valor foi observado entre peso de 100 grãos e número de dias para a liberação do pólen (-0,42) e o menor entre comprimento da espiga e número de dias para a emissão do pendão (-0,0006). Correlações significativas negativas entre caracteres relacionados com a produtividade e com o florescimento são encontradas com frequência na espécie (Sprague & Eberhart, 1977; Silva *et al.*, 2001; Câmara, 2006), indicando que a seleção para o aumento do número de grãos poderia resultar na redução do ciclo, o que seria altamente desejável.

Em geral, os programas de melhoramento genético não se detêm na melhoria de um ou de poucos caracteres, mas sim no aprimoramento de um conjunto de caracteres no mesmo genótipo de interesse. Sendo assim, as pesquisas envolvidas na identificação de caracteres correlacionados são altamente desejáveis para o desenvolvimento de genótipos superiores.

4.4 Identificação de QTLs associados aos caracteres fenotípicos

Foram identificados 19 locos microssatélites distribuídos em nove, dos dez cromossomos da espécie, significativamente associados com 11 caracteres fenotípicos. Para cada caráter, foram observados entre um e cinco QTLs, totalizando 29 QTLs identificados (Tabela 15).

TABELA 15. Caracteres fenotípicos associados com locos microssatélites, localização cromossômica do loco (bin), efeito do QTL e percentual da variância fenotípica explicada por cada loco (R^2). Porto Alegre, RS.

| Caráter | Locos | Bin | Efeito do QTL | R^2 (%) |
|---------|-----------|-------|---------------|--------------------------|
| INSE | bnlg439 | 1.03 | -0,98 | 8,00 |
| NI | bnlg439 | 1.03 | 0,20 | 8,00 |
| CFIE | phi075 | 6.00 | -2,5 | 7,00 |
| NFABE | y1SSR | 6.01 | -0,71 | 10,00 |
| LFIE | phi032 | 9.04 | -1,82 | 12,44 |
| | umc1594 | 3.09 | -11,21 | 11,57 |
| | phi062 | 10.04 | 0,47 | 10,28 |
| | umc1506 | 10.05 | 0,83 | 10,15 |
| | phi037 | 1.08 | -0,41 | 7,77 |
| | | | | $R^2_{final} = 35,16 \%$ |
| NFACE | umc1094 | 9.05 | 0,31 | 15,98 |
| | umc1294 | 4.02 | -0,42 | 5,44 |
| | phi083 | 2.04 | -0,47 | 3,46 |
| | | | | $R^2_{final} = 29,62 \%$ |
| NDLP | zmRR1_PCR | 2.01 | -2,06 | 13,35 |
| | umc1294 | 4.02 | -0,45 | 12,75 |
| | | | | $R^2_{final} = 20,59 \%$ |
| NTR | umc1064 | 1.11 | -4,49 | 26,48 |
| | zmRR1_PCR | 2.01 | -0,17 | 9,70 |
| | umc2047 | 1.09 | -1,24 | 3,98 |
| | | | | $R^2_{final} = 32,99 \%$ |
| NFE | umc1016 | 7.02 | 0,14 | 19,59 |
| | zmRR1_PCR | 2.01 | 0,74 | 17,94 |
| | umc1576 | 10.02 | -0,39 | 7,32 |
| | umc1594 | 3.09 | 1,37 | 6,91 |
| | | | | $R^2_{final} = 32,03 \%$ |

continuação

TABELA 15. Caracteres fenotípicos associados com locos microssatélites, localização cromossômica do loco (bin), efeito do QTL e percentual da variância fenotípica explicada por cada loco (R^2). Porto Alegre, RS.

| Caráter | Locos | Bin | Efeito do QTL | R^2 (%) |
|---------|---------|-------|---------------|--------------------------|
| CE | umc1178 | 6.02 | -0,18 | 12,45 |
| | umc1506 | 10.05 | 0,34 | 11,96 |
| | umc1576 | 10.02 | 0,39 | 1,81 |
| | | | | $R^2_{final} = 19,58 \%$ |
| NGF | nc004 | 4.03 | -7,29 | 18,66 |
| | phi085 | 5.06 | -2,04 | 7,65 |
| | umc1576 | 10.02 | 0,8 | 3,75 |
| | umc1016 | 7.02 | -3,68 | 3,05 |
| | umc1506 | 10.05 | 0,99 | 0,02 |
| | | | | $R^2_{final} = 36,63 \%$ |

R^2_{final} : % da variância fenotípica explicada por todos os marcadores que foram significativos para o mesmo caráter; INSE: altura de inserção da espiga; NI: número de internódios; CFIE: comprimento da folha de inserção da espiga; NFABE: número de folhas abaixo da espiga; LFIE: largura da folha de inserção da espiga; NFACE: número de folhas acima da espiga; NDLP: número de dias para a liberação dos grãos de pólen; NTR: número total de ramificações do pendão; NFE: número de fileiras de grãos por espiga; CE: comprimento da espiga; NGF: número de grãos por fileira.

4.4.1 Inserção da espiga e número de internódios

Foi identificado um QTL relacionado com a inserção da espiga, associado ao loco bnlg439, localizado no cromossomo um (Tabela 15). A proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL foi de 8 %. A comparação de resultados entre trabalhos diferentes é muito complicada devido a vários fatores como diferenças na metodologia aplicada, no tamanho, no tipo de populações estudadas e na falta de marcadores em comum (Beavis *et al.*, 1994; Lee, 1995). Entretanto, em estudos envolvendo a detecção de QTLs, é importante verificar se os locais e os efeitos estimados de um QTL detectado em uma população podem ser observados em outras populações (Lee, 1995).

Vários outros QTLs já foram identificados para o mesmo caráter, em regiões muito próximas ao loco bnlg439, tais como associados aos locos bnlg1014 (bin 1.01) (Enoki *et al.*, 2006), umc2227 (bin 1.04) (Li *et al.*, 2007a; Li *et al.* 2008) e bnlg0615 - phi0037 (1.07 - 1.08) (Sibov *et al.*, 2003). O percentual

da variação fenotípica explicada por esses locos foi de 6,2 % para bnlg1014, 15,02 % e 6,63 % para umc2227 e 3,73 % para bnlg0615 - phi0037. Provavelmente, a região onde esses locos SSR estão inseridos no cromossomo seja uma região controladora desse caráter e, possivelmente, podem existir outros locos, ainda não identificados nessa mesma região, associados a QTLs atuando sobre o caráter inserção da espiga. O valor negativo encontrado na verificação do efeito do QTL (-0,98) (Tabela 15) indicou que a variedade crioula seria a portadora do alelo que elevou o valor do caráter inserção da espiga, ou seja, o alelo de interesse, responsável pela diminuição da altura de inserção da espiga, teve origem na linhagem elite LA67, indicando que, para esse caráter, não houve introgressão alélica de interesse da variedade crioula Argentino Flint na linhagem elite LA67.

Tendo em vista que, em milho, estatura e altura de inserção da espiga estão diretamente relacionados com a tolerância ao acamamento e ainda que estatura se correlaciona positivamente com o peso do grão, uma estratégia interessante seria fazer o controle do acamamento apenas através da altura de inserção, porém mantendo a planta mais alta (Li *et al.*, 2007).

Diversos QTLs já foram identificados tanto para estatura quanto para inserção da espiga (Beavis *et al.*, 1994; Veldboom *et al.*, 1994; Austin & Lee, 1996; Flint-Garcia *et al.*, 2003; Lan & Chu, 2005). Lan & Chu (2005) sugeriram que existiriam QTLs que controlariam esses caracteres de forma independente. Entretanto, de acordo com Li *et al.* (2007a), é muito difícil melhorar a resistência ao acamamento a partir da inserção, mantendo a estatura mais alta, pois um caráter interfere diretamente no outro, o que, freqüentemente, é observado em estudos de correlação.

O número de internódios, que está diretamente relacionado com estatura e inserção também apresentou um QTL significativo para mesmo marcador, indicando que, provavelmente, essa região constitui um grupo de QTLs que controlam esses caracteres.

4.4.2 Caracteres relacionados à folha

Os caracteres relacionados à folha que apresentaram associações significativas com os locos SSR foram comprimento e largura da folha de inserção da espiga e número de folhas acima e abaixo da espiga.

Foram identificados, no total, dez QTLs associados aos quatro caracteres da folha (Tabela 15), sendo o loco phi075 (bin 6.00) associado ao caráter comprimento da folha de inserção da espiga, os locos phi032 (bin 9.04), umc1594 (bin 3.09), phi062 (bin 10.04), umc1506 (bin 10.05) e phi037 (bin 1.08) associados ao caráter largura da folha de inserção da espiga, os locos umc1094 (bin 9.05), umc1294 (bin 4.02) e phi083 (bin 2.04) associados ao número de folhas acima da espiga e o loco y1SSR (bin 6.01) associado ao número de folhas abaixo da espiga.

Quando analisados conjuntamente, os QTLs envolvidos com a largura da folha de inserção da espiga explicaram 35,16 % da variação e os QTLs envolvidos com o número de folhas acima da espiga explicaram 29,62 % da variação fenotípica observada.

Li *et al.* (2008) encontrou QTLs associados ao número de folhas acima da espiga nos cromossomos 2, 3, 5 e 6, sendo apenas um loco no cromossomo 2 (bin 2.01), explicando 8,62 % da variação fenotípica do caráter.

Conforme dito anteriormente, quantidade e tamanho de folhas são caracteres que estão diretamente relacionados com o índice de área foliar (Winkler, 2006), o qual está diretamente relacionado com maior capacidade fotossintética. Entretanto, sob altas densidades (o que é desejado pelo melhoramento, pois resulta no aumento do rendimento de grãos), a quantidade de luz é diminuída e, conseqüentemente, o desenvolvimento das ramificações laterais é suprimido, podendo levar a esterilidade feminina (Sangoi *et al.*, 2002). Sendo assim, a seleção de genótipos com essas características é fundamental para o melhoramento genético.

Entre os dez QTLs identificados, três apresentaram valores positivos quanto ao efeito dos QTLs e sete valores negativos, indicando que a maior parte dos alelos responsáveis pelo aumento no valor dos caracteres teve origem na variedade crioula, ou seja, a maior parte dos alelos de interesse, responsáveis pela diminuição nos valores desses caracteres estão presentes na linhagem elite, e são conseqüência direta do melhoramento aplicado sobre esse material.

Um exemplo do progresso obtido com o melhoramento em relação ao comprimento da folha pode ser verificado no trabalho de Sangoi *et al.* (2002), que compararam híbridos de milho lançados nas décadas de 60 e 80 com um híbrido cultivado atualmente. Os híbridos da década de 60 e 80 apresentaram, respectivamente, médias de 81 e 86 cm. Já no híbrido cultivado atualmente, a média verificada foi de 73 cm. Comparando com os dados obtidos nesse trabalho (Tabela 15), a média obtida com a linhagem elite LA67 foi de 70 cm. Já a obtida com a variedade crioula Argentino Flint foi de 85,46 cm,

confirmando o progresso obtido na linhagem elite LA67, através do melhoramento, em relação a esse caráter.

4.4.3 Ciclo

Quanto ao florescimento, foram identificados dois QTL significativamente associados ao número de dias para a liberação dos grãos de pólen. O marcador ZmRR1_PCR, localizado no cromossomo dois, explicou 13,35 % da variação fenotípica observada, e o marcador umc1294, localizado no cromossomo quatro, 12,75 %. Quando analisados conjuntamente, foram responsáveis por 20,59 % da variação fenotípica observada.

Na avaliação dos efeitos dos QTLs, os dois marcadores apresentaram valores negativos (-2,06 e -0,45), indicando que a variedade crioula foi a portadora dos alelos responsáveis pelo aumento no valor do caráter, ou seja, pelo aumento no período necessário para que o florescimento masculino aconteça.

Contudo, o aumento no ciclo não é um caráter desejado pelo melhoramento da espécie (Enoki *et al.*, 2006). Por essa razão, o alelo da variedade crioula, provavelmente, não seria selecionado, pois o desenvolvimento de variedades com ciclo reduzido tem sido um dos grandes objetivos dos programas de melhoramento da espécie, principalmente nas regiões mais frias (Beavis *et al.*, 1994). É interessante destacar que o período para o florescimento é um caráter altamente variável (Flint-Garcia *et al.*, 2006) e apresenta padrões de herança quantitativa com uma distribuição contínua do valor fenotípico em progênies segregantes (Enoki *et al.*, 2006).

Em geral, marcadores moleculares têm sido utilizados eficientemente para detectar associações com QTLs relacionados a esse caráter (Beavis *et al.*, 1994). A partir de uma análise em 55 estudos envolvendo a detecção de QTLs, concluiu-se que um total de 62 QTLs estão, provavelmente, envolvidos com a variação dos caracteres relacionados ao florescimento (Chardon *et al.*, 2004). Entretanto, apenas quatro ou cinco são, em geral, detectados por população.

Sendo assim, a identificação de marcadores associados aos QTLs envolvidos com a redução do ciclo será de grande utilidade para os programas de melhoramento da espécie, principalmente para aqueles que se dedicam a desenvolver variedades adaptadas as regiões mais frias (Enoki *et al.*, 2002; Rebourg *et al.*, 2003), pois o processo de introdução do caráter poderá ocorrer de forma mais rápida sob seleção assistida. Apesar de já terem sido identificados diversos QTLs para esse caráter, é importante destacar que os estudos de QTLs são direcionados para as populações nas quais eles são identificados, não podendo ser generalizados e aplicados com eficiência em quaisquer populações na espécie.

Conforme citado anteriormente, é importante verificar informações obtidas em outros trabalhos. Foi observado que outros QTLs para o mesmo caráter já haviam sido identificados em regiões cromossômicas próximas às encontradas nesse estudo. Para esse caráter, QTLs já foram identificados no bin 2.08 (Szalma *et al.*, 2007), 2.03 e 2.08 (Câmara, 2006). No cromossomo quatro, já foram identificados QTLs nos bins 4.00 e 4.08 (Szalma *et al.*, 2007) e 4.06 e 4.10 (Câmara, 2006). Provavelmente, essas regiões, em ambos cromossomos, constituam grupos de QTLs relacionados ao florescimento.

Esses resultados indicam que os QTLs identificados nesse trabalho poderão contribuir com as investigações relacionadas com o florescimento masculino em estudos realizados em outras populações.

4.4.4 Ramificações do pendão

Em relação ao número total de ramificações do pendão, foram encontradas associações significativas com três marcadores, localizados nos cromossomos um (com dois QTLs) e dois. As contribuições para a variação fenotípica variaram entre 3,98 % a 26,48 % e quando analisados conjuntamente, explicaram 32,99 % da variação fenotípica do caráter.

No presente trabalho, os três QTLs identificados quanto ao tamanho do pendão, nos cromossomos um (bins 1.09 e 1.11) e dois (2.01), apresentaram efeito negativo, indicando que os alelos responsáveis pelo aumento no valor do caráter pertenceram a variedade crioula. Outros trabalhos identificaram QTLs em regiões muito próximas daquelas encontradas nesse trabalho, com relatos de QTLs nos bins 1.06 e 2.03 (Li *et al.*, 2008) e 1.08 e 2.03 (Sabadin, 2008), 1.00, 1.02, 1.05, 1.06, 2.02, 2.03, 2.06, 2.07 e 2.08 (Câmara, 2006) e 1.02, 2.02, 2.05 e 2.07 (Mickelson *et al.*, 2002).

Esses resultados indicam que os cromossomos um e dois, provavelmente, apresentam regiões relacionadas com o controle no tamanho do pendão.

4.4.5 Componentes do rendimento de grãos

Os últimos três caracteres que apresentaram QTLs associados são relacionados com a produtividade. Os componentes da produção estão entre os caracteres mais importantes em um programa de melhoramento.

Foram identificados quatro QTLs para o caráter número de fileiras de grãos por espiga, com proporções variando entre 6,91 % e 19,59 %. Quando analisados em conjunto, esses caracteres foram responsáveis por 32,03 % da variação fenotípica do caráter. O número de fileiras de grãos é determinado precocemente no período de diferenciação da espiga. Em geral, os genótipos melhorados apresentam maior número de grãos por espiga em função do menor abortamento de flores.

Entre os quatro QTLs identificados para o caráter número de fileiras de grãos por espiga, apenas um (umc1576) apresentou valor negativo (-0,39) para o efeito do QTL, sendo esse o único alelo responsável pelo aumento no valor do caráter que teve origem na variedade crioula. Os demais tiveram origem na linhagem elite LA67. Para os demais locos, os valores observados foram positivos, indicando que os alelos que aumentaram o número de fileiras por espiga tiveram origem na linhagem. Apesar da variedade crioula produzir espigas com menor quantidade de fileiras de grãos em relação a linhagem elite, novamente a variedade crioula demonstrou possuir variabilidade para melhorar esse caráter.

Foram identificados QTLs nos bins 2.01, 3.09, 7.02 e 10.02. Quanto a concordância com outros trabalhos realizados, diversos QTLs já foram identificados para esse caráter em regiões muito próximas às encontradas nesse trabalho, tais como nos bins 2.02 e 7.04 (Ross *et al.*, 2006), 2.02, 2.09,

7.02, 7.03 e 10.03 (Sabadin, 2008), 2.05, 2.07, 2.08, 3.09 (Bento, 2006), 3.07 e 10.01 (Upadyayula *et al.*, 2006a). Esses resultados indicam que os locais onde os QTLs foram identificados representam, provavelmente, regiões controlando esse caráter.

Três QTLs foram associados significativamente com o comprimento da espiga. Esses QTLs, localizados nos cromossomos seis (umc1178) e dez (umc1506 e umc1576) explicaram entre 1,81 % e 12 % da variação fenotípica do caráter e, quando avaliados conjuntamente, os três marcadores explicaram 19,58 % da variação fenotípica do caráter. Upadyayula *et al.* (2006a) identificou QTLs em regiões próximas às observadas nesse trabalho, tais como nos cromossomos seis e dez (bin 6.07 e 10.02).

Quanto ao efeito dos QTLs, os dois QTLs localizados no cromossomo dez (10.02 e 10.05) apresentaram valores positivos, enquanto que o QTL localizado no cromossomo seis (6.02) apresentou valor negativo indicando que o alelo responsável pelo aumento no valor do caráter, presente nesse cromossomo, teve origem na variedade crioula Argentino Flint.

O rendimento de grãos é o principal objetivo do melhoramento genético, e, em milho, está diretamente associado às variações no número de grãos por espiga que, por sua vez, depende das taxas de crescimento durante o florescimento. Se o desenvolvimento das ramificações laterais em primórdios da espiga for atrasado, o número final de grãos poderá ser prejudicado (Sangoi *et al.*, 2002).

Foram identificados cinco QTLs associados com o número de grãos por espiga, localizados nos cromossomos 4, 5, 7 e 10 (com dois QTLs). As proporções da variação fenotípica explicada por esses QTLs variaram entre

0,02 e 18,66 %. Quando analisados conjuntamente, os QTLs foram capazes de explicar 36,63 % da variação fenotípica do caráter. Quanto ao efeito dos QTLs, dois locos apresentaram valores positivos e três negativos, indicando que tanto a linhagem quanto a variedade crioula portavam alelos com potencial para aumentar o valor do caráter.

Outros QTLs foram identificados em regiões muito próximas às encontradas nesse trabalho, tais como nos bins 4.03, 5.03 (Bento, 2006), 5.03, 10.04 (Sabadin, 2008), 4.09 (Upadyayula *et al.*, 2006b) indicando, novamente, que os locais onde os QTLs foram identificados poderiam constituir regiões com QTLs controlando esse caráter.

De um modo geral, os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os obtidos em trabalhos realizados anteriormente. Todos os QTLs identificados nessa população foram localizados em regiões previamente identificadas para o mesmo caráter. As diferenças encontradas foram principalmente em relação aos locos utilizados. Em nenhum dos trabalhos analisados, os mesmos locos foram identificados associados aos mesmos caracteres. Porém, esse fato não indica que houve inconsistência nos dados, pois deve ser considerado que esse tipo de estudo é realizado em populações específicas, com constituições genéticas diferentes, devido aos diferentes genótipos parentais utilizados. Conforme Upadyayula *et al.* (2006b), além dos diferentes genótipos parentais utilizados na construção das populações, também deve ser considerado que a epistasia pode modular o efeito de um QTL em função da sua constituição genética.

As progênies, em geral, são construídas imitando um “bottleneck”, onde apenas os genes oriundos dos genótipos parentais estão presentes e a

variância observada na progênie é consequência direta da segregação dos alelos paternos. Sendo assim, a incongruência observada em relação aos locos, quando diferentes experimentos são comparados, não os torna menos informativos (Tang *et al.* 2005), pois o cruzamento dos dados obtidos em diferentes estudos pode fornecer informações preliminares a respeito da expressão dos QTLs nas populações em geral.

Muitos marcadores associaram-se a caracteres múltiplos, como por exemplo, o marcador bnlg439, que foi significativamente associado com os caracteres inserção da espiga e número de internódios, os quais apresentaram correlações fenotípicas significativas e positivas entre si.

Resultados similares foram encontrados entre os caracteres número de grãos por fileira e comprimento da espiga, número de grãos por fileira e largura da folha, comprimento da espiga e largura da folha, número de grãos por fileira e comprimento da espiga, número de fileiras por espiga e largura da folha, número de grãos por fileira e dias para a liberação do pólen e número de folhas acima da espiga e dias para a liberação do pólen, os quais apresentaram correlações significativas entre si. Esses resultados poderiam indicar que um único gene poderia atuar sobre esses caracteres, com efeito pleiotrópico, ou então, que existiria um grupo de genes proximalmente ligados (Upadyayula *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2008).

Esses fatos confirmam que QTLs normalmente são localizados em grupos que contém genes que controlam o desenvolvimento (Khavkin & Coe, 1998) e que os QTL identificados nesse estudo podem representar regiões que são comuns a várias populações, o que é muito importante para o melhoramento genético (Sibov *et al.*, 2003).

Conforme detalhado anteriormente, foram identificados, nesse trabalho, 29 QTLs associados a caracteres agronômicos de interesse na espécie. Todos os QTLs identificados foram localizados em regiões cromossômicas próximas a outros QTLs identificados para os mesmos caracteres.

Os QTLs identificados nesse trabalho poderão ser utilizados em programas que utilizem a seleção assistida como estratégia de introgressão e seleção de genótipos superiores.

4.5 Introgressão alélica da variedade crioula na linhagem elite

A linhagem elite LA67 é caracterizada como sendo um material elite no programa ao qual pertence (Agroeste), desenvolvido sob forte ação do melhoramento genético. A variedade crioula Argentino Flint, por sua vez, é caracterizada como sendo um material que sofreu pouca ou nenhuma ação do melhoramento. Em geral, os materiais melhorados são agronomicamente superiores às variedades crioulas. A vantagem das variedades crioulas em relação aos materiais melhorados é a garantia da manutenção da variabilidade genética. Por essa razão esses materiais são tão importantes para os programas de melhoramento que, freqüentemente, necessitam de variabilidade para introgridir nos seus materiais.

No presente trabalho, foram identificados 29 QTLs para 11 caracteres fenotípicos (Tabela 15). Quando analisado o efeito dos QTLs, ou seja, a origem parental do alelo que levou ao aumento ou à diminuição no valor dos caracteres na progênie, observou-se que a maioria dos alelos favoráveis foram transmitidos pela linhagem elite LA67. Entretanto, foram identificados cinco QTLs com alelos favoráveis relacionados com alguns componentes do

rendimento que foram transmitidos para a progênie pela variedade crioula Argentino Flint, sendo um dos QTLs responsável pelo aumento no número de fileiras de grãos por espiga (umc1576), um responsável pelo aumento no comprimento da espiga (umc1178) e três responsáveis pelo aumento no número de grãos por fileira (nc004, phi085 e umc1016). As proporções da variação fenotípica observada por esses QTLs foram de 7,32 %, 12,45 %, 18,66 %, 7,65 % e 3,05 %, respectivamente.

Esses resultados demonstram que foi possível transferir alelos superiores da variedade crioula Argentino Flint para a linhagem elite LA67, indicando que a estratégia da técnica de AB-QTL, assim como tem sido utilizada com sucesso em tomate (Tanksley *et al.*, 1996), trigo (Huang *et al.*, 2003), arroz (Xiao *et al.*, 1998) e cevada (Pillen *et al.*, 2003), também pode ser utilizada com sucesso na introgressão de alelos superiores de variedades crioulas em materiais elite de milho.

5 CONCLUSÕES

A variedade crioula Argentino Flint foi a que apresentou a maior variabilidade genética em relação à linhagem elite LA67.

Foram identificados 29 QTLs na progênie de retrocruzamento desenvolvida entre a linhagem elite LA67 e a variedade crioula Argentino Flint. Os QTLs identificados foram relacionados a arquitetura de planta, ciclo e componentes do rendimento.

Todos os QTLs identificados nesse trabalho foram localizados em regiões cromossômicas próximas a outros QTLs previamente identificados e mapeados para os mesmos caracteres, indicando que, provavelmente, esses QTLs estão inseridos em regiões compostas por vários locos controladores dos respectivos caracteres.

Foram identificados pelo menos cinco alelos superiores introgrididos da variedade crioula Argentino Flint na linhagem elite LA67, relacionados a caracteres que contribuem com o rendimento, indicando que a variabilidade genética das variedades crioulas pode ser aproveitada no melhoramento genético e transferida com sucesso para os materiais elite através da técnica de AB-QTL.

Os QTLs identificados poderão ser utilizados na seleção assistida em programas de melhoramento genético de milho.

Outros caracteres, tais como resistência a doenças, tolerância a estresses ambientais e componentes do grão poderiam ser investigados nas variedades crioulas, para que a variabilidade genética desses materiais possa ser amplamente empregada no melhoramento genético da espécie, através da introgressão de alelos superiores nos materiais elite dos programas de melhoramento genético de milho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Estrutura dos cromossomos do milho. In: Paterniani, E.; Viégas, G. P. (Eds.) **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 81-102.

AGUIAR, A. M. **Uso do delineamento III com marcadores moleculares para a análise genética da produção de grãos e seus componentes em milho**. 2003. 127 f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 3. ed. New York: J. Wiley, 1960. 485 p.

ALMEIDA, C. C. S. **Análise citogenética e molecular em milho (*Zea mays* subsp. *mays*), teosinto, *Zea mays* subsp. *mexicana* e em seus híbridos**. 2003. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

ALVES, G. F. **Relações entre seleção de testadores de milho e suas divergências genéticas**. 2006. 145 f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ANDRADE, R. V. *et al.* Avaliação de acessos de milho crioulo coletados na região central do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, [s.n.], p. 67-74, 2002.

AUSTIN, D. F.; LEE, M. Comparative mapping in F_{2:3} and F_{6:7} generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 92, n.7, p. 817-826, 1996.

AZAR, C.; MATHER, D. E.; HAMILTON, R. I. Maize landraces of the St. Lawrence-Great Lakes region of North America. **Euphytica**, Dordrecht, v. 98, n. 3, p. 141-148, 1997.

BABU, R. *et al.* Mapping QTLs for popping ability in a popcorn cross. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 7, p. 1392-1399, 2006.

BALINT-KURTI, P. J. *et al.* Precise mapping of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight, caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O, and flowering time using advanced intercross maize lines. **Genetics**, Baltimore, v. 176, n. 1, p. 645-657, 2007.

BAUMGARTEN, A. M. *et al.* Mapping QTLs contributing to *Ustilago maydis* resistance in specific plant tissues of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, n. 7, p. 1229-1238, 2007.

BEAVIS, W. D. *et al.* Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F₄ progeny from maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 882-896, 1994.

BENTO, D. A. V. **Mapeamento de QTLs para a produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical**. 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma Press, 2002. 369 p.

BLANC, G. *et al.* Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 2, p. 206-224, 2006.

BROWN, W. L.; GOODMAN, M. M. **Corn and corn improvement**. Madison: America Society of Agronomy, 1977, p. 49-88.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

CAETANO-PEREIRA, C. M. *et al.* Spontaneous chromosome fragmentation in maize microsporocytes. **Cytologia**, Tokio, v. 60, [s.n.], p. 297-301, 1995.

CÂMARA, T. M. M. **Mapeamento de QTLs de caracteres relacionados a tolerância ao estresse hídrico em milho tropical**. 2006. 177 f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CAMUSSI, A. 1979. Numerical taxonomy of italian populations of maize based on quantitative traits. **Maydica**, Bergamo, v. 24, n. 3, p. 161-174, 1979.

CARVALHO, F. I. F. *et al.* **Estimativas e implicações da herdabilidade como estratégia de seleção**. Pelotas: Editora da UFPEL, 2002. 107 p.

CHANG, M. T.; NEUFFER, M. G. Maize microsporogenesis. **Genome**, Toronto, v. 32, n. 2, p. 232-243, 1989.

CHARDON, F. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. **Genetics**, Baltimore, v. 168, n. 4, p. 2169–2185, 2004.

CHARDON, F. Mapping of a spontaneous mutation for early flowering time in maize highlights contrasting allelic series at two-linked QTL on chromosome 8. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 1, p. 1-11, 2005.

COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, Dordrecht, v. 142, p. 169-196, 2005.

DEFANI-SCOARIZE, M. A.; PAGLIARINI, M. S.; AGUIAR, C. G. Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). **The Nucleous**, Calcutta, v. 39, [s.n.], p. 10-18, 1996.

DOEBLEY, J. F.; STEC, A.; HUBBARD, L. The evolution of apical dominance in maize. **Nature**, London, v. 386, n. 6624, p. 485-488, 1997.

DONG, Y. B.; LI, Y. L.; NIU, S. Z. QTL analysis of starch content in maize kernels using the trisomic inheritance of the endosperm model. **Yi Chuan**, [S. I.], v. 28, n. 11, p. 1401-1406, 2006.

EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Baltimore, v. 116, n. 1, p. 113-125, 1987.

ENOKI, H.; SATO, H.; KOINUMA, K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 104, n. 8, p. 1270-1277, 2002.

ENOKI, H.; MIKI, K.; KOINUMA, K. Mapping of quantitative trait loci associated with early flowering of a northern flint maize (*Zea mays* L.) inbred line. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 3-4, p. 515-523, 2006.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. Harlow: Longman Science and Technology, 1996.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético - moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: McGraw-Hill, 1987. 536 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FERREIRA, A. **Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares com distorção de segregação gamética e genotípica**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, [s.n.] p. 357-374, 2003.

FLINT-GARCIA, S. A. *et al.* Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. **Plant Journal**, Oxon, v. 44, n. 6, p. 1054-1064, 2005.

GALINAT, W. C. The origin of corn. In: SPRAGUE, G. F. (Ed). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1977. 47 p.

GALINAT, W.C. Evolution of corn. In: SPARKS, D. L. **Advances in agronomy**. London: Academic Press, 1992. 403 p.

GALLAIS, A.; MOREAU, L.; CHARCOSSET, A. Detection of marker–QTL associations by studying change in marker frequencies with selection. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 114, n. 4, p. 669-681, 2007.

GAUT, B. S. *et al.* Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 13, p. 7008-7015, 2000.

GETHI, J. G. *et al.* SSR variation in important U.S. maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 951-957, 2002.

GOLUBOVSKAYA, I. N. Genetic control of meiosis. **International Review Cytology**, Nova York, v. 58, [s.n.], p. 247, 1979.

GOODMAN, M. M. A brief survey of the races of maize and current attempts to infer racial relationships. In: WALDEN, D. B. **Maize Breeding and Genetics**, New York, p. 143-158, 1978.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2 ed. Ames: Iowa States University Press, 1988. 468 p.

JIANG, C. *et al.* Genetic analysis of adaptation differences between highland and lowland tropical maize using molecular markers. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 99, n. 7-8, p.1106-1119, 1999.

KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v. 152, n. 3, p. 1023-1216. 1999.

KHASKIN, E.; COE, E. H. The major quantitative trait loci for plant stature, development and yield are general manifestations of developmental gene clusters. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 72, [s.n.], p. 60–66, 1998.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.

KRAKOWSKY, M. D.; LEE, M.; GARAY, L. Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 5, p. 821-830, 2006.

LI, Y. *et al.* The genetics relationships among plant-height traits found using multiple trait QTL mapping of a dent corn and popcorn cross. **Genome**, Toronto, v. 50, n. 4, p. 357-364, 2007a.

LI, Y. L. *et al.* Identification of trait-improving quantitative trait loci for grain yield components from a dent corn inbred line in an advanced backcross BC2F2 population and comparison with its F_{2:3} population in popcorn. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 115, n. 1, p. 129-140, 2007b.

LI, Y. L. *et al.* Identification of agronomically favorable quantitative trait loci alleles from a dent corn inbred Dan232 using advanced backcross QTL analysis and comparison with the F_{2:3} population in popcorn. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2008.

LIMA, M. L. A. *et al.* Mapping QTL for grain yield and plant traits in a tropical maize population. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 17, n. 3, p. 227–239, 2006.

LIU, K. *et al.* Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, Baltimore, v. 165, n. 4, p. 2117-2128, 2003.

LOVE, R. M. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 14 p. (Circular, 74).

LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v. 103, n. 3, p. 613-617, 2001.

LU, H.; ROMERO-SEVERSON, J.; BERNARDO, R. Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, n. 4, p. 622-628, 2002.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980 p.

MALVAR, R. A. *et al.* Estimates of genetics variance in two spanish populations of maize. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 291-295, 1996.

MANGELSDORF, P. C. **Corn, its origin, evolution and improvement.** Massachusetts : Harvard University Press, 1974. 262 p.

MATSUOKA, Y. *et al.* Microsatellites in *Zea* – variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 104, [s.n.], p. 436-450, 2002.

MESQUITA, A. G. G.; GUIMARÃES, C. T.; PARENTONI, S. N.; PAIVA, E. Recuperação do genitor recorrente em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores microsatélites. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 275-285, 2005.

MESSMER, M. M. *et al.* Relationships among early European maize inbreds. 2. Comparison of pedigree and RFLP data. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 5, p. 944-950, 1993.

MCCLINTOCK, B. A cytological and genetical study of triploid maize. **Genetics**, Baltimore, v. 14, n. 2, p. 180-222, 1929.

MCCLINTOCK, B. The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, Heidelberg, v. 19, n. 2, p. 191-237, 1933.

MICKELSON, S. M. Quantitative trait loci controlling leaf and tassel traits in a B73 x MO17 population of maize. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 6, p. 1902-1909, 2002.

MIHALJEVIC, R.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E. No Evidence for epistasis in hybrid and per se performance of elite european flint maize inbreds from generation means and QTL analyses. **Crop Science**, Madison, v. 45, n. 6, p. 2605-2613, 2005.

MURRAY, M; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Stanford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NASS L. L.; PELLICANO, I. J.; VALOIS, A. C. C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, [s.n.], p. 983-988, 1993.

NIENHUIS, J. *et al.* Genetic similarity among *Brassica oleracea* genotypes as measured by restriction fragment length polymorphisms. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 2, p. 298-303, 1993.

OMOIGUI, L. O. *et al.* Genetic gains from cycles of full-sib recurrent selection for low nitrogen tolerance in a tropical maize population. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 3-4, p. 497-505, 2006.

OTTAVIANO, E.; CAMUSSI, A. Phenotypic and genetic relationships between yield components in maize. **Euphytica**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 601–609, 1981.

PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. **Races of maize in Brazil and adjacent areas**. Mexico: Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo. 1978. 95 p.

PATERNIANI, E. Diversidade genética e raças de milho no Brasil. In: SOARES, A. C. *et al.* **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185 p.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento de milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817 p.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 4, p. 2101-2103, 2001.

POGGIO, L. *et al.* Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1021-1027, 2000.

POEHLMAN, J. M.; SLEPER, D. A. **Breeding field crops**. Iowa: Iowa State University Press, 1995. 494 p.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; SANTOS, J. B. **Melhoramento de espécies autógamas**. In: Recursos genéticos e melhoramento. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1183 p.

REBOURG, C. *et al.* Maize introduction into Europe: the history reviewed in the light of molecular data. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 106, n. 5, p. 895-903, 2003.

REIF, J. C. *et al.* Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germoplasm by SSR markers. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 6, p. 326-334, 2004.

REIF, J. C. *et al.* Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 113, [s.n.], p. 177-185, 2006.

REYMOND, M.; MULLER, B.; TARDIEU, F. Dealing with the genotype environment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2461-2472, 2006.

RHOADES, M. M. The cytogenetics of maize. In: SPRAGUE, G. F. **Corn and corn improvement**. New York: Academic Press, p. 123-219, 1955.

RIBAS, L. A.; SEBBENN, A. M. Herança e desequilíbrio de ligação em sete locos isoenzimáticos de *Cecropia pachystachya*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 111-119, 2004.

RODER, M. S. *et al.* A microsatellite map of wheat. **Genetics**, Austin, v. 149, n. 4, p. 2007-2023, 1998.

RODRIGUEZ-GARAY, B.; BARROW, J. R. Pollen selection for heat tolerance in cotton. **Crop Science**, Madison, v. 28, n. 5, p. 857-859, 1988.

ROSS, A. J.; HALLAUER, A. R.; LEE, M. Genetic analysis of traits correlated with maize ear length. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 2, p. 301-313, 2006.

RUSSEL, W. A.; HALLAUER, A. R. Corn. In: FEHR, W. R.; HADLEY, H. H. **Hybridization of crop plants**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. 766 p.

SABADIN, P. K. **Mapeamento de QTL's e base genética da correlação entre caracteres em uma população de milho tropical**. 2008. 89 f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SACHAN, J. K. S.; NATH, Y. Interracial differences in mechanical properties of the cob in relation to knob composition. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Columbia, v. 68, p. 68-69, 1994.

SALGADO, K. C. P. C.; VON PINHO, E. V. R.; GUIMARÃES, C. T.; VON PINHO, R. G.; FERREIRA, C. A. Mapeamento de QTLs associados com a tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Resumos...** Sete Lagoas: ABMS, 2006.

SALVI, S. *et al.* Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Bologna, v. 104, n. 27, p. 11376-11381, 2007.

SANGOI, L. *et al.* Bases morfofisiológicas para maior tolerância dos híbridos modernos de milho a altas densidades de plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 101-110, 2002.

SANTOS, M. F. **Mapeamento de QTLs em testecrosses de milho com diferentes testadores e níveis de acidez do solo**. 2008. 167 f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SARI-GORLA, M. Sporophytic response to pollen selection for Alachlor tolerance in maize. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 88, n. 6-7, p. 812-817, 1994.

SENIOR, M. L. *et al.* Simple sequence repeat markers develop from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 6, p. 1676-1683, 1996.

SERENO, M. J. C. M; MORAES-FERNANDES, M. I. B; ZANETTINI, M. H. B. Effect of pesticides, fungal diseases and pest on meiotic behavior of wheat. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 593-609, 1981.

SHI, Y. G. *et al.* Mapping CMS-S restorers gene Rf_3 with RFLP and RAPD. **Acta Agronomica Sinica**, St. Louis, v. 23, [s.n.], p.1-6, 1997.

SIBOV, S. T. *et al.* Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas**, Lund, v. 139, n. 2, p.107-115, 2003.

SILVA, A. R. **Análise genética de caracteres quantitativos em milho com o delineamento III e marcadores moleculares**. 2002. 143 f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SPRAGUE, G. F.; EBERHART, S. A. Corn breeding. In: Madison: American Society of Agronomy, 1977. 774 p.

SRDIC, J.; PAJIC, Z.; DRINIC-MLADENOVIC, S. Inheritance of maize grain yield components. **Maydica**, Bergamo, v. 52, n. 3, p. 261-264, 2007.

Corn and corn improvement

SZALMA, S. J. *et al.* QTL mapping with near-isogenic lines in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, n. 7, p. 1211-1228, 2007.

TAKAHASHI, C. *et al.* Genomic relationships between maize and its wild relatives. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 6, p. 1201-1207, 1999.

TANG, J. H. *et al.* Genetic analyses and mapping of a new thermo-sensitive genic male sterile gene in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 1, p. 11-15, 2006.

TANKSLEY, S. D.; NELSON, J. C. Advanced backcrosses QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into the elite breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 2, p. 191-203, 1996.

TARAMINO, G.; TINGEY, S.V. SSR (Simple Sequence Repeats) for maize germoplasm analysis. **Maize Genetics Conference Abstracts**, Lake Geneva, v. 37, n. 55, p. 48, 1995.

TEIXEIRA, F. F. *et al.* Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 59-67, 2002.

TERRA, T. F. **Análises citogenéticas e moleculares em populações de milho (*Zea mays* L.), teosinto (*Zea mexicana*) e em híbridos entre as duas espécies**. 2004. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

THODAY, J. M. Location of polygenes. **Nature**, London, v. 191, n. 478, p. 368-370, 1961.

UPADYAYULA, N. *et al.* Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence architecture. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 4, p. 592-606, 2006a.

UPADYAYULA, N. *et al.* Quantitative trait loci analysis of phenotypic traits and principal components of maize tassel inflorescence architecture. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 8, p. 1395-1407, 2006b.

VARGAS, M. *et al.* Mapping QTL and QTL x environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least square methods. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 112, n. 6, p. 1009-1023, 2006.

VELDBOOM, L. R.; LEE, M. Molecular-marked facilitated studies of morphological traits in maize. II: Determination of QTLs for grain yield and yield components. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 89, n. 4, p. 451-458, 1994.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica aplicada ao fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

VIEIRA, E. A. *et al.* Emprego de modelos gráficos na seleção de genitores de milho para hibridização e mapeamento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 986-994, 2005.

VLADUTU, C.; MCLAUGHLIN, J.; PHILLIPS, R. L. Fine mapping and characterization of linked quantitative trait loci involved in the transition of the maize apical meristem from vegetative to generative structures. **Genetics**, Baltimore, v. 153, n. 2, p. 993-1007, 1999.

WANG, R. L. *et al.* The limits of selection during maize domestication. **Nature**, London, v. 398, n. 6724, p. 236-239, 1999.

WANG, X. *et al.* A mixture model approach to the mapping of QTL controlling endosperm traits with bulked samples. **Genetica**, Dordrecht, v. 132, n. 1, p. 59-70, 2007.

WARBURTON, M. L. *et al.* Genetic diversity in CIMMYT nontemperate maize germplasm: landraces, open pollinated varieties, and inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 2, p. 617-624, 2008.

WESTERBERGH, A.; DOEBLEY, J. Quantitative trait loci controlling phenotypes related to the perennial versus annual habit in wild relatives of maize. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 7, p. 1544-1553, 2004.

WESTERBERGH, A.; DOEBLEY, J. Morphological traits defining species differences in wild relatives of maize are controlled by multiple quantitative trait loci. **Evolution**, Lawrence, v. 56, n. 2, p. 273-283, 2002.

WHITE, S. E.; DOEBLEY, J. F. Of genes and genomes and the origin of maize. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 327-332, 1998.

WIETHÖLTER, P. **Análise da variabilidade genética em genótipos de milho crioulo (*Zea mays ssp. mays*)**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

WINKLER, L. **Melhoramento genético de plantas por meio de ideotipos**, 2006. 7 p. (Informativo Fundacep, 2).

WONG, J. C. *et al.* QTL associated with accumulation of tocopherols in maize. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 6, p. 2257-2266, 2003.

XIAO, W. *et al.* Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 115, n. 4, p. 501-508, 2007.

YU, J. *et al.* Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. **Genetics**, Baltimore, v. 178, n. 1, p. 539-551, 2008.

ZAMIR, D.; GADISH, I. Pollen selection for low temperature adaptation in tomato. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 74, n. 5, p. 545-548, 1987.

ZHANG, F.; WAN, X. Q.; PAN, G. T. QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in maize. 1. Map construction with microsatellite and AFLP markers. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2006.

ZHU, J. *et al.* Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 113, n. 1, p. 1-10, 2006.

APÊNDICE 1. Substrato utilizado nos experimentos desenvolvidos em casa de vegetação.

Composição:

- 25 % de casca de *Pinus*
- 25 % de casca de arroz
- 50 % de lodo aeróbico
- pH 5,8
- compostado por 18 meses

Policultura Rosa

RS 040, Km 23

Águas Claras/Viamão, RS

(51) 3250.5543 (51) 9985.8330

www.policulturarosa.com.br

APÊNDICE 2. Programa Touchdown utilizado no termociclador para amplificações dos microssatélites. Porto Alegre, RS.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tempo (minutos) | Etapa | Temperatura (°C) | Tempo (minutos) |
|-------|--------------------------|-----------------|-------|-----------------------------|-----------------|
| 1 | 94 | 5 | 22 | 94 | 1 |
| 2 | 94 | 1 | 23 | 59 | 1 |
| 3 | 64 | 1 | 24 | 72 | 1 |
| 4 | 72 | 1 | 25 | Repetir 1 vez – passo 22 | |
| 5 | Repetir 1 vez - passo 2 | | 26 | 94 | 1 |
| 6 | 94 | 1 | 27 | 58 | 1 |
| 7 | 63 | 1 | 28 | 72 | 1 |
| 8 | 72 | 1 | 29 | Repetir 1 vez – passo 26 | |
| 9 | Repetir 1 vez - passo 6 | | 30 | 94 | 1 |
| 10 | 94 | 1 | 31 | 57 | 1 |
| 11 | 62 | 1 | 32 | 72 | 1 |
| 12 | 72 | 1 | 33 | Repetir 1 vez – passo 30 | |
| 13 | Repetir 1 vez - passo 10 | | 34 | 94 | 1 |
| 14 | 94 | 1 | 35 | 56 | 1 |
| 15 | 61 | 1 | 36 | 72 | 1 |
| 16 | 72 | 1 | 37 | Repetir 1 vez – passo 34 | |
| 17 | Repetir 1 vez - passo 14 | | 38 | 94 | 1 |
| 18 | 94 | 1 | 39 | 55 | 1 |
| 19 | 60 | 1 | 40 | 72 | 1 |
| 20 | 72 | 1 | 41 | Repetir 31 vezes - passo 38 | |
| 21 | Repetir 1 vez - passo 18 | | 42 | 72 | 5 |



APÊNDICE 3. Experimento perdido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, em Eldorado do Sul (RS). A) detalhe (seta) do buraco criado pelo animal; B) Uma das várias “tocas” na área experimental; C) linha onde sobrou apenas uma planta (círculo). Porto Alegre, RS. Fotos: Paula Wiethölter.