

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E DA
ORIGEM GENÉTICA EM DUPLO-HAPLÓIDES DE MILHO.**

Mauricio Pires Machado Barbosa
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E DA
ORIGEM GENÉTICA EM DUPLO-HAPLÓIDES DE MILHO.**

Mauricio Pires Machado Barbosa

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Moro

Co-Orientador: Dr. Heyder Diniz Silva

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

JABOTICABAL -SÃO PAULO - BRASIL

Julho – 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAURICIO PIRES MACHADO BARBOSA – nascido em Piracicaba/SP, em dois de junho de mil novecentos e setenta e seis. Engenheiro Agrônomo formado pela ESAPQ/USP em 1998. Mestre em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia em 2002. Contratado pela Monsanto do Brasil em Outubro de 2000 como Melhorista assistente. Entre 2002 e 2005 trabalhou como Melhorista Associado e em 2005 como Melhorista na produção de híbridos e linhagens para as regiões de cerrados com altitude acima de 700 metros dos estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso pela mesma empresa. Em 2007 passou a ser responsável pelas estações de pesquisa de Uberlândia/MG e Santa Helena de Goiás/GO, além da liderança dos times de Patologia de Plantas e Duplo-Haplóides.

À Deus e a meus Familiares Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade.

À Monsanto pelo apoio e fomento.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização do trabalho, reservando-me ao direito de não citar nomes para que não cometa a injustiça de esquecer algum.

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1- Introdução.....	1
2 - Objetivo.....	2
3 - Revisão de Literatura.....	3
3.1 - A cultura do milho.....	3
3.2 - Melhoramento na cultura do milho	4
3.3 - Obtenção de linhagens endogâmicas por meio de autofecundação	5
3.4- Uso de duplo-haplóides no melhoramento genético do milho	6
3.5 - Uso de marcadores moleculares no melhoramento do milho.....	10
3.5.1 - Marcadores moleculares SNP	12
3.5.2 - Desequilíbrio de ligação	13
4) Referências Bibliográficas	18
CAPITULO 2: DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM LINHAGENS ENDOGÂMICAS DE MILHO OBTIDAS POR MÉTODOS CONVENCIONAIS E DUPLO-HAPLÓIDES EM GERMOPLASMA TROPICAL	26
RESUMO	26
ABSTRACT.....	27
1)Introdução.....	28

2)Material e métodos.....	30
3)Resultados e Discussão.....	31
4)Conclusões.....	35
5)Referências Bibliográficas.....	36
CAPITULO 3: INFLUÊNCIA DA ORIGEM GENÉTICA NA PRODUÇÃO DE DUPLO-	
HAPLÓIDES EM MILHO.....	
RESUMO	39
1)Introdução.....	41
2)Material e Métodos.....	43
3)Resultados e Discussão.....	45
3.1) Percentagem Real de Indução (IR%).....	46
3.2) Sobrevivência em Casa de Vegetação (SCV%).....	49
3.3) Porcentagem de plantas macho-férteis (Pol%)	50
3.3) Sobrevivência a campo (FS%),e eficiência de polinização (Ef_Pol%) e número total de linhagens duplo-haplóides produzidas (DHp).	53
4)Conclusões.....	53
5)Referências Bibliográficas.....	54

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1- Introdução

O milho é uma cultura muito importante para a economia mundial, sendo utilizado na indústria de rações, no consumo humano e também como matéria-prima na produção de álcool, óleo, amido, amido modificado, dextrose e xaropes de frutose e *glucose*.

A utilização do milho como grande cultura deu um enorme salto após o início da utilização dos primeiros híbridos duplos, por volta de 1920. O híbrido duplo foi um sucesso e predominou até 1950, quando o híbrido simples passou a dominar o mercado. Antes daquele período, plantavam-se somente variedades. As pesquisas de melhoramento para produção de híbridos no Brasil começaram em 1932; porém, o primeiro híbrido duplo foi lançado somente em 1946, e o primeiro simples, em 1952 (FANCELLI, 1994).

No Brasil, a cultura do milho ocupa o segundo lugar, em área e produção de grãos, sendo superada apenas pela cultura da soja (IBGE, 2009). O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de milho, atrás dos Estados Unidos, que detêm 40% da produção mundial, seguidos pela China. Outros países importantes na produção deste cereal são México, Argentina, Índia, Romênia e África do Sul.

Devido às características da planta de milho, em que o vigor híbrido é importante para atingir produtividades altas, os produtores passaram a ser obrigados a comprar sementes em todo o plantio, o que gerou um grande mercado, altamente competitivo por todo o mundo (GRANER & GODOY, 1967, WHITE & CARLSON, 1999).

Várias metodologias são empregadas no melhoramento genético desta cultura, tais como seleção recorrente, retrocruzamento, produção de linhagens por autofecundação e a utilização de duplo-haplóides.

A obtenção de linhagens duplo-haplóides é uma forma de reduzir tempo e espaço na obtenção de linhagens endogâmicas nos programas de melhoramento de milho. Com o uso desta técnica, pode-se aumentar até três vezes a velocidade em relação aos métodos tradicionais (STRAHWALD & GEIGER, 1988, citados por BORDES et al. 2006). Além disso, a tecnologia permite que o melhorista realize o *test-cross* com linhagens homozigotas em vez de fazê-lo utilizando material que ainda apresenta segregação.

A produção de linhagens duplo-haplóides tem sido utilizada por diversas empresas ao redor do mundo; todavia, ainda é escassa a existência de informações referentes ao comportamento e eficiência na produção deste tipo de material a partir de germoplasma tropical.

2 - Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da origem do agrupamento heterótico de linhagens de milho utilizado no programa de melhoramento da Monsanto do Brasil Ltda. e a eficiência de geração de linhagens duplo-haplóides, analisando os índices de eficiência de cada etapa do processo para a geração de linhagens duplo-haplóides em cada diferente grupo heterótico. Concomitantemente, será comparado o desequilíbrio de ligação entre linhagens duplo-haplóides e linhagens obtidas por meio de autofecundação.

3 - Revisão de Literatura

3.1 - A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) tem sido utilizado pelo homem por milhares de anos. Espigas encontradas em escavações arqueológicas e submetidas a exame por radiocarbono foram datadas de 7.000 anos. Originou-se das Américas, onde por milhares de anos serviu a nações indígenas de diferentes regiões, propiciando o surgimento de inúmeras raças, constituindo assim uma ampla e diversa base genética. Pode ser encontrado material com ciclo de dois meses até outros com ciclo de mais de um ano, variedades com grãos grandes (milho Cuzco), ou minúsculos (milho pinto), material com espigas de 2,5 cm a 45 cm, etc. (FANCELLI, 1983; WHITE & CARLSON, 1999).

Devida a esta grande variabilidade, o milho pode ser classificado em sete grupos, de acordo com a forma e o tamanho do grão: *Indurata*, grãos duros, o endosperma córneo envolvendo o endosperma farináceo; *Indentata*, conhecido como milho mole, caracterizado pela depressão na parte superior, o endosperma córneo envolve somente lateralmente o endosperma farináceo; *Amilácea*, grãos arredondados, opacos, extremamente macios, muito importantes na indústria farinácea; *Everta*, grão extremamente duro, pequeno e de endosperma córneo, há um aumento da pressão interna quando aquecidos e ocorre uma inversão do grão, expondo o amido que resultará na pipoca; *Tunicata*, considerada a mais primitiva das variedades, possui grãos envolvidos total e individualmente por brácteas; *Cerácea*, seu amido (amilopectina) tem composição diferente dos demais, dando característica de cerosa ao grão; *Sacarata*, variedades conhecidas como milho doce, vários genes recessivos estão envolvidos nesse caractere. (FANCELLI, 1983).

KRUG (1966) relata que, antes da chegada dos portugueses ao Brasil, o milho (chamado de “avati”) já era cultivado em clareiras abertas na mata. Naquela época o milho tinha porte elevado, grão mole, espiga fina e coloração variável, dependendo da

tribo que o cultivava. Sua utilização na alimentação era tão importante quanto à mandioca, usado na fabricação de farinha e do “cauim”, uma bebida fermentada (FANCELLI, 1994).

3.2 - Melhoramento na cultura do milho

A busca por material de maior produtividade e que necessitem de menos investimentos nos tratamentos culturais, nas aplicações de fungicidas e de inseticidas, resistência às doenças e na qualidade física e nutricional do produto, são os maiores desafios para os melhoristas de plantas. Na cultura do milho, uma das metodologias mais utilizadas é o emprego da superioridade dos genótipos heterozigotos, aproveitando-se do vigor híbrido.

Até o início dos anos vinte, a produção do milho estava restrita às variedades. No início desta década, surgiram os primeiros híbridos duplos e com isso, diversos estudos passaram a ser conduzidos, viabilizando a produção e a utilização comercial de sementes híbridas (SPRAGUE & DUDLEY, 1988; HALLAUER, 1990). Com o sucesso do híbrido duplo que se estendeu até 1950 e os diversos estudos realizados em melhoramento, o surgimento de híbridos simples deu-se por volta de 1950, passando este tipo de híbrido a dominar o mercado. No Brasil, pesquisas de melhoramento iniciaram-se em 1932, com o lançamento do primeiro híbrido duplo em 1946 e o primeiro híbrido simples, em 1952. As pesquisas de melhoramento para a produção de híbridos no Brasil começaram em 1932; porém, o primeiro híbrido duplo foi lançado somente em 1946, e o primeiro simples, em 1952 (FANCELLI, 1994).

A tecnologia do milho híbrido explora a heterose ou vigor híbrido, oriundo do cruzamento de duas ou mais linhagens homozigotas. Várias tecnologias de obtenção de linhagens tem sido empregadas, como seleção recorrente, retrocruzamento, autofecundações sucessivas e utilização da tecnologia de duplo-haplóides.

3.3 - Obtenção de linhagens endogâmicas por meio de autofecundação

O sucesso para um programa de melhoramento depende do desenvolvimento de linhagens elites para produção dos híbridos. Para isto, vários métodos podem ser utilizados (MIRANDA FILHO & VIÉGAS, 1987).

A principal metodologia, conhecida como padrão, é a utilização de sucessivas autofecundações da população ou da variedade original. Em cada ciclo, os descendentes de todas as plantas, denominados progênies ou famílias, são semeados em linhas. As melhores famílias são selecionadas, então os melhores indivíduos dentro de cada família são novamente autofecundados, repetindo-se o processo por várias vezes até que a homozigose completa seja atingida, o que em geral se consegue no sétimo ciclo (S_7 ou F_8), quando as linhagens chegam aproximadamente a 99,22% de homozigose, caso tenham partido de uma população composta por duas linhagens.

As demais metodologias que se utilizam de autofecundações sucessivas são derivadas desta primeira; como, por exemplo, o método da cova única, em que a diferença em relação ao método descrito anteriormente está em que cada descendente, ou progênie, é representado por uma única cova com três plantas, em vez de uma linha com várias plantas. Este método apresenta a vantagem de utilizar uma menor área plantada, permitindo a exploração de um número maior de progênies na mesma área e, assim, permitindo aplicar uma maior intensidade de seleção.

Um terceiro método, também derivado do método-padrão, é o método genealógico, utilizado nos casos em que a seleção é efetuada dentro de uma população derivada de duas linhagens previamente selecionadas, de acordo com a capacidade combinatória ou características que se buscam selecionar ou combinar na linhagem final, seguindo-se então da aplicação do método padrão.

O método do híbrido críptico consiste na avaliação de famílias de irmãos germanos obtidas através do cruzamento de plantas prolíficas e não endogâmicas. A necessidade do uso de plantas prolíficas reside no fato de que, simultaneamente ao cruzamento, deve-se autofecundar a segunda espiga das plantas. As famílias de irmãos germanos são então avaliadas em ensaios para identificação dos melhores

cruzamentos. Posteriormente, as progênies S_1 correspondentes às melhores combinações são plantadas aos pares e cruzadas para se obter uma nova geração, repetindo-se o processo até que se obtenha a homozigose completa nas linhagens para sua utilização na síntese dos híbridos.

3.4- Uso de duplo-haplóides no melhoramento genético do milho

Uma alternativa disponível para algumas espécies como aveia, trigo, sorgo e milho é a utilização da técnica de haplóides duplicados, ou duplo-haplóides.

A ocorrência natural de haplóides em plantas, derivados de células gametofíticas, tem sido descrita para centenas de espécies de angiospermas (KIMBER & RILEY, 1963; MAGOON & KHANNA, 1963, citados por LASHERMES & BECKERT, 1988). Apesar disto, a ocorrência de haplóides na natureza é rara.

Como forma de reduzir tempo na obtenção de linhagens endogâmicas nos programas de melhoramento de milho, a tecnologia duplo-haplóides tem se mostrado muito interessante. Pode-se aumentar até três vezes a velocidade em relação aos métodos tradicionais (STRAHWALD AND GEIGER, 1988, citados por BORDES et al. 2006). Além de permitir que o *melhorista* realize o *test-cross* com linhagens homozigotas em vez de fazê-lo utilizando-se de material que ainda apresenta segregação.

Plantas haplóides têm o número de cromossomos gametófitos, sendo importantes para realização de análises genéticas, indução de mutação e, particularmente, no melhoramento genético pela produção de plantas homozigotas (PRET'OVÁ, 2006). Porém, para serem utilizadas em programas de melhoramento, há necessidade de produção de haplóides em grande escala.

Haplóides de origem maternal são resultado de uma falha primária na fertilização, causada por uma condição anormal, induzida ou herdada, em gameta masculino ou feminino e subsequente desenvolvimento do óvulo em embrião. (SARKAR E COE 1966).

Vários tratamentos físicos, químicos e fisiológicos podem ser utilizados para induzir a produção de haplóides maternos em milho, sendo utilizado por exemplo o tratamento do pólen por calor ou ainda Irradiação “X”, ou ainda o tratamento dos estigmas com hidrazina maleico (MATHUR et al., 1976; ZUOYU & MIGGUANG, 1984, citados por BECKERT E LASHERMES, 1988) além de polinização tardia dos estigmas (CHASE, 1974).

CHASE (1952) propôs uma metodologia de identificação de haplóides no estágio de plântula, utilizando um sistema de marcadores fenotípicos com uma taxa de ocorrência de haplóides de 0,1%.

O desenvolvimento de uma variedade nomeada como “stock 6” por COE, 1959, que autofecundada produzia frequência de haplóides de 3,2%, abriu possibilidades do uso de polinizadores seletivos para aumentar a frequência de haplóides. Assim, variedades indutoras de haploidia foram desenvolvidas a partir desta variedade (SARKAR et al, 1972; AMAN & SARKAR, 1978). Entretanto, o uso de duplo-haplóides continuou restrito pela dificuldade de geração de linhagens a partir destes haplóides.

LASHERMES & BECKERT, 1988 utilizaram marcadores fenotípicos para identificar haplóides, gene da ausência de lígula e glossy (lg1, lg2 e gl1). Verificaram variação na frequência de indução dependendo do genótipo, podendo variar entre 0,4 e 2,4%. Além disto, desenvolveram novas linhagens indutoras. Produziram e avaliaram 29 linhagens e híbridos de linhagens indutoras com “stock 6”. Registrando que a correlação entre capacidade de indução entre F_2 e F_3 é alta.

CHALYK (1994) avaliou plantas haplóides obtidas por meio do cruzamento com um indutor (ZMS) durante dois anos, em 604 plantas no primeiro ano e em 1030 plantas no segundo. Estimou a fertilidade de plantas haplóides, a frequência de duplo-haplóides espontâneos e comparou as linhagens duplo-haplóides com as linhagens convencionais, concluindo que a maioria das plantas haplóides é macho estéril. Utilizou pólen de plantas convencionais para fertilizar bonecas de plantas haplóides. Todas as plantas apresentaram espigas com grãos, contrariando a tese de CHASE (1969), em que apenas 30% das espigas desenvolveram grãos. Os grãos obtidos foram plantados no ano seguinte e produziram plantas *diploides* normais. A diferença apontada foi a de

que sementes colhidas de plantas haplóides apresentaram crescimento menor nos primeiros estádios de desenvolvimento, contudo não foram observadas diferenças significativas no estágio de florescimento. Encontrou uma taxa de diploidização espontânea entre 3,3 e 3,6%.

Na comparação com as linhagens convencionais, apontou-se que em geral as plantas duplo-haplóides são inferiores em várias características quando comparadas às linhagens convencionais, uma vez que não sofreram seleção visual para sua obtenção, dentre elas, inserção de espiga, largura de folhas, número de nós, tamanho de pendão, diâmetro de espiga e número de espigas. Porém, apresentaram-se favoráveis em termos de melhoramento pois apresentaram capacidade de combinação sendo duas foram superiores às convencionais, seis com desempenho similar e duas com desempenho inferior.

BORDES et al. (1997) propuseram o uso de alelos recessivos do marcador *glossy1*, para a detecção de haplóides após a indução de haploidia pelo indutor FIGH1. Com esta técnica os autores conseguiram produzir haplóides em uma taxa de 0,64%.

CHASE (1969) sugere que a frequência de haplóides é inversamente proporcional à frequência de genes letais e subletais ao longo dos gametas femininos.

Até a década de 90, a baixa eficiência das diferentes técnicas de derivação de duplo-haplóides limitava esta ferramenta como uso de escala em um programa convencional de seleção. Com o desenvolvimento da técnica de indução de gimnogenese *in situ*, tornou-se possível a produção de um grande número de duplo-haplóides. A técnica consiste em cultivo de anteras *in vitro* para produção de haplóides.

A partir de então, diversos trabalhos puderam ser conduzidos utilizando-se de linhagens duplo-haplóides.

Linhagens duplo-haplóides obtidas por meio de cultura de anteras foram comparadas por MURIGNEUX et al. (1993) com linhagens obtidas de descendente de semente única (SSD), em relação a caracteres quantitativos e marcadores RFLP (Fragmentos de restrição de comprimento polimórfico), para analisar a descrição da frequência alélica parental e as frações de recombinação. Utilizaram oitenta e uma

linhagens SSD e cento e vinte DHs, da mesma família S_0 . Os parentais foram utilizados como controle. Também concluíram que a altura de espigas é maior em DHs. Mas algumas características foram positivas, como área foliar e número de folhas. Apontou que DH e SSD podem diferir em associações gênicas quando os genes estão ligados ou muito próximos (fração de recombinação menor que 20%).

Linhagens DH foram avaliadas e comparadas com S_1 por BORDES et al. (2006). Os autores apontaram que, em teoria, num programa de seleção recorrente, o uso de DHs pode aumentar o ganho genético por unidade de tempo, devido ao aumento da variância genética entre unidades testadas que lidera o aumento da herdabilidade. Compararam dois programas de seleção recorrente, durante quatro anos, utilizando DHs e famílias S_1 . Mostraram que em dois ciclos a vantagem é das S_1 e que no terceiro são equivalentes. A vantagem com DHs é o *test-cross* já realizado com linhagens terminadas e totalmente homozigóticas.

STRAHWALD AND GEIGER (1988) mostraram que, com o uso de estações de inverno, a vantagem do ganho de ciclo para produção de DH em relação à seleção recorrente é perdido. Encontraram que a variância genética foi de quase o dobro em DH (44,3) comparada à S_1 (22,1) no primeiro ciclo; e que a variância da interação com o ambiente também foi de quase o dobro em S_1 (41,8) comparado aos DH (22). O ganho genético predito em um ciclo em DH foi de 8,2 contra 4,8 em S_1 , porém o segundo ciclo em S_1 foi de 5,8, elevando-se ao total de 10,6, 30% superior aos DH. O Ganho genético realizado no ciclo de DH foi de 6,6% e de S_1 foi de 7% nos dois ciclos. Assim, em um ciclo de quatro anos, DH ficaria em 1,6 e S_1 em 1,8. Por ano, o ganho em DH é mais eficiente. No segundo ano do ciclo de S_1 apresentou-se um grande ganho e, nos demais, abaixo de DH.

LONGIN et al. (2007) determinaram o número ótimo de famílias S_1 , linhagens DH e locais de teste em dois diferentes esquemas de melhoramento. Compararam o ganho por seleção máximo atingível em ambos. Investigaram as limitações no corrente método de produção de DHs e fizeram considerações sobre orçamento, componentes de variância e tempo de produção de DHs contra famílias S_1 . Concluíram que o melhor custo está em cruzar S_1 s com um testador. Neste esquema, as S_1 são cruzadas com

um testador e as sementes remanescentes são cruzadas com um indutor. As famílias selecionadas após o *test-cross* são duplicadas e as linhagens selecionadas são cruzadas novamente com um testador.

A produção de linhagens duplo-haplóides tem sido utilizada por diversas empresas ao redor do mundo; porém, ainda é escassa a existência de informações referentes ao comportamento e à eficiência na produção deste tipo de material a partir de germoplasma tropical.

3.5 - Uso de marcadores moleculares no melhoramento do milho

Várias características, como produtividade, resistência à acidez do solo, acúmulo de matéria seca, produção de biomassa e resistência quantitativa às doenças, não apresentam classes fenóticas distintas como as propostas pela primeira lei de Mendel, isto é, apresentam uma variação contínua, sendo denominados então caracteres quantitativos.

Devido à natureza da variação dos caracteres quantitativos, seu estudo deve começar pela distribuição de frequências originadas pelo caráter quando observado certo número de indivíduos. Esta distribuição é caracterizada por parâmetros estatísticos como média, variância, covariâncias e correlações (SILVA, 2001).

FISHER (1918) forneceu as bases para o surgimento da genética quantitativa, mostrando que os achados biométricos não apenas podiam ser facilmente interpretados, mas também que alguns casos exigiam virtualmente uma interpretação em termos dos fatores de Mendel, os já então conhecidos genes, e cujos portadores eram reconhecidamente cromossomos.

Os genes ou locos cromossômicos que controlam uma determinada característica quantitativa são denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Segundo FALCONER & MACKAY (1996), um QTL é um segmento de cromossomo que afeta uma determinada característica, não sendo necessariamente um único gene.

Pouco progresso no estudo de QTLs e na identificação de marcadores ligados a eles foi conseguido até meados dos anos 80, principalmente porque os marcadores utilizados neste período eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, como nanismo, grupo sanguíneo, cor de pétalas, etc., que são marcadores pouco polimórficos e que não cobrem todo o genoma, além de não serem seletivamente neutros.

A partir década de 90, foi realizado enorme e rápido progresso nas técnicas de marcadores moleculares. Estas ferramentas são importantes por apresentarem grande quantidade de polimorfismo, não sendo afetadas por variações ambientais nem pelo estágio fenológico de desenvolvimento da planta.

De acordo com MILACH (1998), os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, os de hibridação e os de amplificação do DNA. Entre os marcadores baseados em hibridação estão o RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), minissatélites ou VNTR (*Variable number of tandem repeats*). Já os baseados em amplificação do DNA incluem marcadores do tipo RAPD (*Random amplified of polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence characterized amplified regions*), STS (*Sequence tagged sites*), microssatélites ou SSR (*Single sequence repeats*), AFLPs (*Amplified fragment length polymorphism*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Para muitas espécies, incluindo o milho, o número de marcadores polimórficos é agora suficiente para a construção de mapas densos, fato este que permite localizar QTLs individuais. Uma vez que a associação marcador-QTL foi detectada, elas podem ser utilizadas para prever valores de ganho genético (MOREAU et al., 2000).

Marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar genótipos úteis para inclusão em programas de melhoramento e também progênies de interesse para estudos futuros. Porém, o custo da Seleção Assistida por Marcadores é uma limitação quando comparada com o melhoramento dirigido por seleção fenotípica. Na maioria das espécies de plantas, marcadores do tipo microssatélites são ainda os mais utilizados, porém o desenvolvimento deste tipo de marcadores é dispendioso e complexo. Desta maneira marcadores do tipo SNP tem se mostrado interessantes para

todos os propósitos do uso da tecnologia de marcadores moleculares em melhoramento.

3.5.1 - Marcadores moleculares SNP

Devido ao grande polimorfismo encontrado no milho, marcadores SNP têm mostrado-se uma poderosa ferramenta em todas as aplicações do uso de marcadores moleculares, incluindo construção de mapas de ligação de alta resolução, mapeamento de característica, diagnose genética, análise genética de estrutura de populações, análises filogenéticas, etc. Enquanto o polimorfismo apresentado por marcadores tipo SSRs mostram-se excelentes marcadores, devido a seu multialelismo, eles podem não ser suficientemente frequentes para estudos de associação. Tamanho da homoplasia dos alelos SSR, além da reversão alélica, pode ser também um problema em algumas aplicações (VIARD et al.1998, ESTOUP et al. 1995).

SNPs são a mais comum forma de variação de sequência entre indivíduos da mesma espécie. SNP é a posição de um único par de base no DNA genômico no qual sequencias alternativas diferentes (alelos) existem em indivíduos normais de algumas populações, onde o alelo menos freqüente tem abundancia de um por cento ou maior (BROOKES, 1999)

Novos SNPs são continuamente gerados entre cada célula dos organismos, porém a maioria é removida através da ação de reparação de DNA durante a replicação e somente aquelas mutações de base que escapam à este processo tornam-se SNPs (KUNKEL & ERIE, 2005).

Uma vez que a mutação é a fonte de todos SNPs, numa população específica, o número de SNPs reflete a taxa de mutação de replicação, o número de gerações que separam a população do seu parente mais próximo e o número de progenitores independentes da população. O número e distribuição de SNPs são também influenciados pela pressão de seleção passada e presente aplicada à população incluindo qualquer afunilamento que esta tenha sofrido. Conseqüentemente, enquanto

mutações ocorrem amplamente em frequências similares na maioria de espécies, o número de SNPs presentes em uma dada população irá representar variações consideráveis e a frequência de SNPs então deve variar em cada espécie além de variar em relação à região do genoma (BARKER et al. 2008).

Por este motivo, a tarefa de descobrimento de SNPs em populações pequenas selecionadas, como por exemplo, espécies cultivadas, requerem maior esforço do que a descoberta de SNPs em populações naturais com seleção limitada.

A intensificação no uso de SNPs foi alimentada pela explosão do número de sequencias expressas identificadas (*Expressed sequence tags* ESTs) disponíveis em vários bancos de dados e esta tendência deve ser continuada no futuro (VARSHNEY et al., 2004)

3.5.2 - Desequilíbrio de ligação

Linhagens endogâmicas de milho representam uma fonte fundamental para estudos em genética e melhoramento. Além de linhagens de milho serem extensivamente utilizadas na produção de híbridos para produção comercial do grão (TROYER, 2001), estas também são fundamentais para estudos de diversidade genética, incluindo o desenvolvimento de mapas de ligação (BURR et al., 1988), mapeamento de QTLs (AUSTIN, 2001), estudo de evolução molecular (CHING et al., 2002), genética do desenvolvimento (FOWLER & FREELING, 1996) e genética fisiológica (CROSBIE et al., 1978). THORNSBERRY et al. (2001) realizaram a primeira análise de associação fenótipo-genótipo em espécies de plantas.

Para que um determinado marcador molecular possa ser utilizado em um programa de melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores moleculares, é necessário que a população esteja em desequilíbrio de ligação; senão, a probabilidade de ocorrência de determinada classe de marcador seria independente da segregação dos alelos dos QTLs em questão. De acordo com a lei de equilíbrio de

Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação é definido como qualquer desvio nas frequências alélicas esperadas sob cruzamentos ao acaso (SILVA, 2001).

WEIR (1996) propôs a medida de desequilíbrio de ligação como sendo:

$$D_{MQ} = P_{MQ} - P_M * P_Q$$

Em que P_{MQ} é a frequência do gameta MQ, e P_M e P_Q as frequências dos alelos M e Q respectivamente. O estimador de máxima verossimilhança é:

$$\hat{D}_{MQ} = P_{MQ} - P_M * P_Q$$

De onde pode ser obtido diretamente das frequências, tendo:

$$E[D_{MQ}] = \frac{2n - 1}{2n} D_{MQ}$$

E

$$\text{Var}[D_{MQ}] = \frac{1}{2n} [P_M(1 - P_M)P_Q(1 - P_Q) + (1 - 2P_M)(1 - 2P_Q)D_{MQ} - D_{MQ}^2]$$

Sendo “n” o número de indivíduos.

Para o teste de hipótese H_0 , pode-se utilizar da estatística Qui-quadrado em que $H_0: D_{MQ} = 0$ (ausência de desequilíbrio) pode ser obtida elevando-se ao quadrado a variável “z”:

$$z = \frac{D_{MQ} - E[D_{MQ}]}{\sqrt{\text{Var}[D_{MQ}]}}$$

A qual, sob H_0 é:

$$\hat{A}_{MQ}^2 = z^2 = \frac{2nD_{MQ}}{P_M(1-P_M)P_Q(1-P_Q)}$$

O quadrado do coeficiente de correlação de Pearson entre dois locos relaciona-se ao DL por meio da expressão:

$$r^2 = \frac{D^2}{p_{A1}(1-p_{A1})p_{B1}(1-p_{B1})}$$

Em que P_{A1} é a probabilidade de ocorrência do Alelo A1, e P_{B1} é a probabilidade de ocorrência do alelo B1.

A amplitude do coeficiente de desequilíbrio gamético é dependente das frequências alélicas dos dois locos:

$$\min[P_M(1-P_Q); (1-P_M)P_Q] > D_{MQ} > -1: \max[P_M P_Q; (1-P_M)(1-P_Q)]:$$

Estudos de associação baseados em desequilíbrio de ligação (DL) poderão prover alta resolução para identificação de genes que podem contribuir com variação fenotípica (REMINGTON et al., 2001). Em estudos genéticos de planta, populações segregantes e linhagens recombinantes têm sido utilizadas com sucesso no mapeamento de QTLs para regiões de 10 a 30 cM (ALPERT & TANSKLEY, 1996; STRUBER et al., 1999). Além disso, a extensão e distribuição do DL são de importância fundamental para os mapas de associação.

A resolução dos estudos de associação em uma amostra-teste depende da estrutura do DL ao longo do genoma. O DL ou a correlação entre alelos em diferentes posições é geralmente dependente do histórico da recombinação entre os locos polimórficos, que é função da distância entre eles. Apesar disto, fatores como erosão

genética, seleção dentro das populações e mistura de populações podem também causar DL entre marcadores e características (FALCONER & MACKAY, 1996).

Devido a múltiplos fatores afetando o DL, sua estrutura genômica em uma cultura particular de plantas deve ser determinada empiricamente antes que os estudos de associação possam ser aplicados. Em milho, por exemplo, seleção divergente para características adaptativas, como tempo de maturação em diferentes regiões, podem ter criado DL através de regiões cromossômicas, que contêm genes maiores para estas características.

A aplicabilidade e a resolução para os mapas de associação dependem da extensão e estrutura do DL dentro da população sob consideração. Grandes diferenças entre a genética de populações humanas e de plantas são esperadas devido ao cruzamento aleatório ser predominante em humanos, enquanto em plantas há uma grande ocorrência de autofecundação. Além disto, o tamanho das populações de plantas é geralmente menor e sofre forte pressão de seleção. Em adição, mapas de associação requerem conhecimento detalhado sobre genética e relações filogenéticas do material estudado devido à desconsideração da estrutura da população, que pode causar associações ilegítimas (STICH et al., 2005).

O conhecimento de mapas de associação é a base para a seleção assistida por marcadores (*Marker assisted selection* - MAS). Para isso, as associações locos-característica devem permanecer estáveis através de gerações (STROMBERG et al., 1994). Apesar de associações locos características ambiente-específicas poderem ser variáveis, associações locos-características também devem ter repetibilidade através de ambientes similares.

A identificação de associação entre marcadores-QTL pode ser feita por regressão múltipla de um fenótipo no tipo de marcador e na seleção de indivíduos em um índice, combinando fenótipo e valor molecular predito com marcadores (LANDE & THOMPSON, 1990). A eficiência deste método de seleção assistida por marcadores, relativa à seleção fenotípica puramente, tem sido amplamente estudada, principalmente no caso de populações derivadas de cruzamentos de duas linhagens endogâmicas (LANDE & THOMPSON, 1990; LUO et al., 1997; MOREAU et al., 1998).

Em adição, entender DL e como ele está relacionado com marcadores como por exemplo SNPs individuais, pode ser útil para delineamento de experimentos de “genotipagem” e identificação de quantos SNPs são necessários para cobrir uma região particular do genoma.

Alguns pesquisadores argumentam que o processo drástico de endogamia, aliado à ausência de seleção durante o processo provocado pelo uso da técnica de DH, reduz as chances de recombinações maiores em populações DH quando comparadas com populações convencionais. Estes maiores “blocos de ligação” seriam caracterizados por maiores valores de DL (DL mais forte) entre os locos.

Linhagens tropicais e subtropicais possuem grande número de alelos e uma maior diversidade de genes que as temperadas, entre as quais o grupo *Stiff Stalk* que possui, em média, a maior divergência em relação ao outros grupos (LIU et al, 2003).

4) Referências Bibliográficas

ALPERT, K.B., TANSKLEY, S.D., High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: A major fruit weight quantitative locus in tomato, **Proceedures of Natural Academic Sciences**, v. 92, p. 15503-15507, 1996.

AMAN, M.A.; SARKAR, K.R. Selection for haploidy inducing potential in maize. **Indian Journal of Genetics**, v. 38 p. 452-457, 1978.

AUSTIN, D.F., LEE, M., VELDBOOM, L.R., Genetic mapping in maize with hybrid progeny across testers and generations: plant height and flowering, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 163-176, 2001.

BARKER, G.; BATLEY, J.; O'SULLIVAN, H., EDWARDS K.J., EDWARDS, D., Redundancy based detection of sequence polymorphisms in expressed sequence tag data using auto SNP, **Bioinformatics**, v. 19, p. 421-422, 2003.

BORDES, J.; R. DUMAS DE VAULX, A.; LAPIERRE, A.; POLLACSECK, M. Haplo-diploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding, **Agronomie**, v. 17, p. 291–297, 1997.

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled haploid versus S_1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1063-1072, 2006.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs, **Gene**, v. 234, p. 177-186, 1999.

CHASE, S.S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal** v. 44, p. 263-267, 1952.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize, **Botanical Review**, v. 35, p. 117-167, 1969.

CHASE, S.S. Utilization of haploids in plant breeding: Breeding diploid species. In K.J. Kasha (ed.) **Procedures of the First International Symposium on Haploids**, Guelph, ON, 1974 Canada. 10–14 June 1974. Univ. of Guelph, Guelph, ON, Canada.

CHALYK, S.T. Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding, **Euphytica**, v. 79 p. 13–18, 1994.

CROSBIE, T.M., MOCK, J.J., PEARCE, R., Inheritance of photosynthesis in a diallel among eight maize inbred lines from Iowa Stiff Stalk Synthetic, **Euphytica**, v. 27, p. 657-664, 1978.

ESTOUP, A.; TAILIEZ, C.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. Size homoplasmy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae), **Mol. Biol. Evol**, v. 12, p. 1074-1084, 1995.

FALCONER, D.S. & MACKAY, T.F.C. (1996) **Introduction to Quantitative Genetics**, Longman, Harlow, England, 4th edition, 1996, 496p.

FANCELLI, A.L.; LIMA, U.A. **Produção, pré-processamento e transformação agro-industrial**. São Paulo, Secretaria da ciência e tecnologia, (extensão agro-industrial, 5), 1983, 112p.

FANCELLI, A.L. **Tecnologia da produção do milho para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP, (Cursos agrozootécnicos), 1994, 222p.

FISHER, R.A. The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburg**, v.52, p. 399-433, 1918.

FOWLER, J.E., FREELING, M., Genetic analysis of mutations that alter cell fates in maize leaves: dominant *Liguleless* mutations, *Developmental Genetics*, v. 18, p. 198-222, 1996.

GRANER, E.A. ; GODOY, C. **Cultura da fazenda brasileira**, 4.ed. São Paulo: Melhoramento, 1967. p.384-409.

GRIFFING, B. Efficiency changes due to use of doubled haploids in recurrent selection method, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 46, p. 367-386, 1975.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbreed lines, **Maydica**, Bergamo, v.35, n.1, p.1-16, 1990.

IBGE. Web Site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://web.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. 12 de abril de 2009.

KUNKEL, T.A.; ERIE, D.A. DNA mismatch repair, **Annual Review of Biochemistry**. V. 74, p. 681-710, 2005.

KRUG, C.A.; CANAGIN, A.; JUNQUEIRA, A.A.B.; BRIEGER, F.B.; et al. **Cultura e adubação do milho**, São Paulo: Instituto brasileiro de potassa, 1966, 541p.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits, **Genetics**, v. 124, p. 743-756, 1990.

LASHERMES, P.; AND M. BECKERT. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 405–410, 1988.

LIU, K.; GOODMAN, M.; M. S.; SMITH, J.S.; BUCKLER, E.; D. J.; Genetic Structure Among Maize inbred lines as inferred from DNA Microsatellites, **Genetics**; v. 165, p. 2117-2128, 2003.

LONGIN, C. F. H, UTZ, H. F.; REIF, J. C.; WEGENAST, T.; WOLFGANG , S. MELCHINGER, A. E. Hybrid maize breeding with doubled haploids: III. Efficiency of early testing prior to doubled haploid production in two-stage selection for testcross performance. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, p. 519-527, 2007.

LUO, Z.W., THOMPSON, R.; WOOLLIAMS, J.A. A population different testers and independent population sample in maize reveals low power of QTL detection and large biases in estimates of QTL effects. **Genetics** v. 149 p. 383-403, 1997.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho Híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. Ed. Campinas. Fundação Cargill. 1987. p. 277-340.

MOREAU, L.; CHARCOSSET, A.; HOSPITAL, F.; GALLAIS, A. Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. **Genetics**, v. 148, p. 1353-1365, 1998.

MOREAU, L.; LEMARIÉ, S.; CHARCOSSET, A.; GALLAIS, A. Economic efficiency of one cycle of Marker-assisted selection, **Crop Sciences**, v. 40, p. 329-337, 2000.

MURIGNEUX, A. BAUD, S.; BECKERT, M. 1993. Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. 2. Comparison with single-seed-descent lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 278-287, 1993.

PRET'OVÁ, A.; OBERT, B.; BARTOSOVÁ, Z. Haploid formation in maize, barley, flax, and potato, **Protoplasma**, v. 228, p. 107-114, 2006.

REMYNTOON, D.V.; THORNSBERRY, J. M.; MATSUOKA, Y.; WILSON, L.M.; WHITT, S.R.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.M.; BUCLER IV, E. S. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome, **Proceedings of the Natural Academy Sciences**, v. 20, p. 11479-11484, 2001.

SARKAR K. R.; COE E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize, **Genetics**, v. 54, p. 453-464, 1966.

SARKAR K.R.; SUDHA PANKE, SACHAN J. K . S. Development of maternal-haploidy-inducer lines in maize, **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 42, p. 781-186, 1972.

SILVA, H.D. **Aspectos Biométricos na detecção de QTLs (“Quantitative Trait Loci”) em espécies cultivadas**. Originalmente apresentada como Tese de Doutorado, ESALQ/USP, 2001.

SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. 986p.

STROMBERG, L.D.L DUDLEY, J.W.; RUFENER, G.K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize. **Crop Science**, v. 34, p. 1221-1225, 1994.

STRUBER, C.W., POLACCO, M.. SENIOR, M.L. **Synergy of Empirical Breeding, Marker-Assisted Selection, and Genomics to Increase Crop Yield Potential**. **Crop. Sci**, v. 39, p. 1571-1583, 1999.

STICH, B; MELCHINGER, A.E.; FRISCH, M.; MAURER, H.P.; HECKENBERGER, M.; REIF, J.C. Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 723-730, 2005.

THORNSBERRY, J.M., GOODMAN, M.M., DOEBLEY, J., KRESOVICH, S., NIELSEN, D., BUCKLER, E.S.I., Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time, **Nature Genetics**, v. 28, p. 286-289, 2001.

TROYER, A.F., Temperate corn, in: **Speciaty Corns**, edited by HALLAUER, A., CRC Press, Boca Raton, Flórida, pp. 393-466, 2001.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E., Genic microsatellite markers in plants: features and applications, **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 48-55, 2004.

VIARD, F.; FRANCK, P.; DUBOIS, M.P.; ESTOUP, A.; JARNE, P. Variation of Microsatellite size homoplasy acroo electromorphhs, loci, and populations in three invertebrate species, **Journal of Molecular Evolution.**, v. 47, p. 42-51, 1998.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

WHITE, D. G. ; CARSON, M.L. History of Corn, In: WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. Minnesota: APS Press, 1999, 77P.

CAPITULO 2: DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO EM LINHAGENS ENDOGÂMICAS DE MILHO OBTIDAS POR MÉTODOS CONVENCIONAIS E DUPLO-HAPLÓIDES EM GERMOPLASMA TROPICAL

RESUMO

Estudos de associação baseados em desequilíbrio de ligação (DL) são importantes ferramentas para construção de mapas de ligação e utilização em programas de melhoramento assistidos por marcadores. Em geral, são utilizadas populações *segregantes* ou linhagens isogênicas para composição destes programas. Com o objetivo de comparar o desequilíbrio de ligação em linhagens duplo-haplóides (DH) e linhagens obtidas por meio de autofecundação, duzentas e quarenta e cinco linhagens – cento e setenta e cinco convencionais e setenta DHs – foram submetidas à análise de marcadores do tipo *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), utilizando-se mil duzentos e trinta e quatro marcadores distribuídos pelos dez cromossomos. O resultado da regressão entre as distâncias mostrou um R^2 de 0,6546 para linhagens duplo-haplóides e uma equação de tendência logarítmica, sendo $y = -0,024\ln(x) + 0,159$. Para as linhagens convencionais, o R^2 foi de 0,5727, com a equação que explica a tendência, sendo $y = -0,008\ln(x) + 0,0659$. Os dados de DL foram analisados individualmente, por cromossomo; e, assim como na análise conjunta, individualmente, todos os cromossomos tiveram o mesmo comportamento quando se comparam o DL de linhagens DH e os convencionais, sendo que os valores de DL nas linhagens DH foram em geral mais altos que nas convencionais. Os resultados indicam que, para a obtenção de linhagens DH, a recombinação ocorre em blocos maiores quando comparado com as linhagens convencionais.

Palavras-chave: linhagens duplo-haplóide, desequilíbrio de ligação, SNP, produção de linhagens, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Association studies based on linkage disequilibrium (LD) are important tools for linkage maps construction and to use in marker-assisted breeding programs. Typically, segregating populations or isogenic lines are used to compose them. With objective of compare the linkage disequilibrium on double haploid lines (DH) and lines obtained by self pollination (Conventional), two hundred and forty five inbred lines, where one hundred seventy five conventional and seventy DHs where submitted to the analysis of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) molecular markers, using one thousand two hundred and thirty four markers random distributed over the ten chromosomes. The regression output among the distances showed R^2 of 0.6546 for double haploids lines and one logarithmic trend equation, being $y = -0.024\ln(x) + 0.159$ For conventional lines, R^2 was 0.5727, with an equation that explains the trend, being $y = -0.008\ln(x) + 0.0659$. LD data were analyzed by chromosomes individually and as such in the joint analysis, all individual chromosomes showed the same patternr when comparing the LD of DH lines versus conventional lines, being the LD of DH lines generally higher that the conventional lines. Results show that to obtain DH lines the recombination occurs in larger blocks when compared against the conventional lines.

Keywords: doubled haploid lines, linkage disequilibrium, SNP, inbred line production, molecular markers.

1) Introdução

Um programa de melhoramento de milho tem como objetivo a obtenção de híbridos comerciais, fundamentando-se na obtenção de linhagens homozigotas que serão posteriormente cruzadas para obtenção do produto comercial. Tais linhagens podem ser obtidas via autofecundações sucessivas, aqui também designadas como método convencional, ou por meio da técnica de duplo-haplóides (DH). Esta última baseia-se na produção de sementes haplóides maternas por meio da indução, utilizando-se um macho com deficiência em um dos núcleos polínicos, gerando assim um endosperma triplóide e o embrião haplóide. Estas sementes são posteriormente tratadas com agentes que duplicam o genoma, obtendo, em apenas uma geração, indivíduos cem por cento homozigotos.

O avanço no desenvolvimento de marcadores moleculares polimórficos em diversas espécies, incluindo o milho, possibilitou a construção de mapas de ligação densos, fato que permitiu estudos para localização de QTLs (*Quantitative Trait Loci* – Loco de Característica Quantitativa) individuais. Uma vez que a associação marcador-QTL foi detectada, ela pode ser utilizada para prever valores de ganho genético (MOREAU et al., 2000).

O uso de um determinado marcador molecular em um programa de melhoramento assistido por marcadores é viabilizado quando a população se encontra em desequilíbrio de ligação. Desta forma, a probabilidade de ocorrência de determinadas classes de marcadores é independente da segregação dos alelos dos QTLs em questão. De acordo com a lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação é qualquer desvio nas frequências alélicas esperadas em cruzamentos ao acaso (SILVA, 2001).

Estudos de associação, baseados em desequilíbrio de ligação (DL), podem prover alta resolução para a identificação de genes que podem contribuir com variação fenotípica (REMINGTON et al., 2001). Em estudos genéticos de planta, populações *segregantes* e linhagens recombinantes são utilizadas com sucesso no mapeamento

de QTLs para regiões de 10 a 30 cM (ALPERT & TANSKLEY, 1996; Struber et al., 1999). Também a extensão e a distribuição do DL são de importância fundamental para os mapas de associação.

FALCONER & MACKAY (1996) mencionam que a resolução dos estudos de associação em uma amostra-teste depende da estrutura do DL ao longo do genoma. Os autores afirmam também que o DL, ou a correlação entre alelos em diferentes posições, é geralmente dependente do histórico da recombinação entre os locos polimórficos. Dos fatores que podem causar DL entre marcadores e característica encontram-se erosão genética, seleção dentro das populações e mistura de populações.

O conhecimento de mapas de associação é a base para a seleção assistida por marcadores (MAS). Para isto, as associações locos-característica devem permanecer estáveis através de gerações (STROMBERG et al., 1994). Apesar de associações locos-características ambiente-específicas poderem ser variáveis, associações locos-características também devem ter repetibilidade através de ambientes similares.

A identificação de associação entre marcador-QTL pode ser feita por meio de regressão múltipla de um fenótipo no tipo de marcador, para selecionar indivíduos em um índice combinando fenótipo e valor molecular predito com marcadores (LANDE & THOMPSON, 1990). A eficiência deste método de seleção assistida por marcadores, relativa à seleção fenotípica puramente, tem sido amplamente estudada, principalmente no caso de populações derivadas de cruzamentos de duas linhagens endogâmicas (LANDE & Thompson, 1990; LUO et al., 1997; MOREAU et al., 1998).

Devido ao grande polimorfismo encontrado no genoma do milho, o uso de marcadores do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) tem se mostrado uma excelente ferramenta para programas de seleção assistida, construção de mapas de ligação, identificação de QTLs, diagnose genética, análise genética de estrutura de populações, análises filogenéticas, etc. Em comparação aos comumente utilizados SSRs e SNPs bialélicos, apresentam menor polimorfismo, pois a heterozigose

esperada é menor; mas atingem o mesmo nível de informação de marcadores RFLPs quando haplótipos são considerados, em vez de SNPs individuais (CHING et al., 2002).

Alguns pesquisadores argumentam que o processo drástico de endogamia, aliado à ausência de seleção durante o processo provocado pelo uso da técnica de DH, reduz as chances de recombinações maiores em populações DH quando comparadas com populações convencionais. Estes maiores “blocos de ligação” seriam caracterizados por maiores valores de DL (DL mais forte) entre os locos.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estimar o DL entre marcadores SNPs em linhagens endogâmicas, obtidas via metodologia convencional e DH.

2) Material e métodos

Foram avaliadas duzentas e quarenta e cinco linhagens endogâmicas de milho, das quais cento e setenta e cinco foram obtidas por meio de autofecundação (Conv) e setenta, por meio de tecnologia de duplo-haplóides (DH). Estas linhagens pertencem ao programa de melhoramento da Monsanto Co. Foram genotipadas no laboratório de marcadores moleculares em Ankeny, IA, EUA, utilizando mil duzentos e trinta e quatro marcadores do tipo “Single Nucleotide Polimorfism” (SNP). Os genótipos das linhagens, para cada loco, foram codificados em 0, 1 e 2, de acordo com o número de cópias de cada alelo, para confecção das matrizes de análises. Uma linhagem elite do programa norte-americano da empresa foi utilizada como padrão para codificação das demais.

A distância entre cada marcador em um dado cromossomo foi determinada e estas distâncias foram comparadas com a distância entre eles na linhagem padrão. Foi utilizado o valor inteiro mais próximo entre a diferença da distância entre os marcadores na linhagem em questão e a distância na linhagem padrão. A média das diferenças das distâncias foi calculada por marcador dentro das linhagens convencional

e DH e, então, foi realizada uma regressão linear em que a queda do DL (*LDD*) foi calculada.

O DL entre dois locos foi estimado como o quadrado do coeficiente de correlação entre os dois locos ($DL = r^2$).

O DL esperado em uma geração F_2 foi calculado como sendo $F_2 e =$

$$e = \frac{1-C}{2} - 0,25, \text{ em que } C \text{ é } \frac{1}{2} (1 - e^{-2d}), \text{ e } d \text{ é a distância, em centimorgans (cM),}$$

entre os marcadores, de acordo com LUO, 1997.

A curva de queda do DL pode ser descrita por um modelo exponencial. Para ajuste deste modelo, optou-se pela linearização dele por meio de uma transformação logarítmica. Assim ajustou-se o modelo $\ln(y) = a + b \ln(x)$, em que “y” é a estimativa do desequilíbrio de ligação entre dois marcadores e “x”, a distância entre eles em cM. Neste modelo, a constante “a” representa o valor inicial do DL (DL para dois marcadores separados a 1 cM) e a constante “b” representa o valor de queda do DL (*LDD*).

3) Resultados e Discussão

A quantidade de marcadores utilizados para cada cromossomo de 1 a 10 foi sequencialmente 191, 119, 143, 145, 130, 104, 126, 105, 97 e 74. A distância máxima entre os marcadores foi de 256,5; 191,5; 219,2; 194,2; 184,9; 146; 173,2; 169,9; 153,2 e 123,3 cM para os cromossomos de 1 a 10, sendo as distâncias médias de 1,34; 1,61; 1,53; 1,34; 1,42; 1,4; 1,37; 1,62; 1,58 e 1,67 cM respectivamente.

Na Figura 1 encontram-se sumarizados os valores de desequilíbrio de ligação entre dois locos, em função da distância entre eles, para linhagens DH, linhagens convencionais e os valores teóricos esperados para uma geração F_2 .

A linha de tendência logarítmica da regressão do DL das linhagens DH foi $y=0,024\ln(x)+0,159$, com R^2 de 0,6546, enquanto que para as linhagens convencionais, a equação que explica a tendência foi $y=0,008\ln(x)+0,0659$ com R^2 de 0,5727.

A Tabela 1 apresenta os dados das equações da linha de tendência logarítmica das distâncias para cada cromossomo. As correlações variaram, em linhagens DH, de 0,4702 no cromossomo 9 até 0,8433 no cromossomo 3. Em linhagens convencionais, o R^2 variou entre 0,085 no cromossomo 10 e 0,6192 no cromossomo 4.

Tabela 1: Equações e R^2 calculados para cada cromossomo.

		DH		Conv	
	Marcadores	Equação	R^2	Equação	R^2
Cr1	191	$y = -0,025\ln(x) + 0,1614$	0,7679	$y = -0,009\ln(x) + 0,0664$	0,5459
Cr2	119	$y = -0,029\ln(x) + 0,1704$	0,7753	$y = -0,007\ln(x) + 0,0559$	0,3176
Cr3	143	$y = -0,028\ln(x) + 0,1653$	0,8433	$y = -0,009\ln(x) + 0,0669$	0,4463
Cr4	145	$y = -0,03\ln(x) + 0,1863$	0,7986	$y = -0,012\ln(x) + 0,0813$	0,6192
Cr5	130	$y = -0,033\ln(x) + 0,2068$	0,7773	$y = -0,011\ln(x) + 0,0785$	0,5014
Cr6	104	$y = -0,03\ln(x) + 0,1726$	0,7907	$y = -0,008\ln(x) + 0,0629$	0,3787
Cr7	126	$y = -0,024\ln(x) + 0,1542$	0,5833	$y = -0,006\ln(x) + 0,0499$	0,3396
Cr8	105	$y = -0,03\ln(x) + 0,1856$	0,5782	$y = -0,018\ln(x) + 0,108$	0,6071
Cr9	97	$y = -0,029\ln(x) + 0,1796$	0,4702	$y = -0,013\ln(x) + 0,0888$	0,3888
Cr10	74	$y = -0,037\ln(x) + 0,1955$	0,6874	$y = -0,004\ln(x) + 0,0456$	0,085

Cr1 a 10, Grupos de ligação do genoma;

Marcadores: Número de marcadores utilizados em cada grupo de ligação

Equação: Equações obtidas em a partir dos marcadores utilizados em cada grupo de ligação em linhagens duplo-haplóides (DH) e linhages obtidas por autofecundação (Conv)

R^2 Coeficiente de correlação da reta.

As correlações entre a linha de tendência e os dados também foram mais altas com as linhagens DHs, de 0,6546; enquanto para as linhagens convencionais foi de 0,5727. Analisando separadamente as distâncias por cromossomos, temos que, para DHs, a correlação entre a linha de tendência logarítmica e os dados são de 0,7679, 0,7753, 0,8433, 0,7986, 0,7773, 0,7907, 0,5833, 0,5782, 0,4702 e 0,6874, para os

cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente. Para as linhagens convencionais, as correlações entre os dados e a linha de tendência logarítmica foram: 0,5459, 0,3176, 0,4463, 0,6192, 0,5014, 0,3787, 0,3396, 0,6071, 0,3888 e 0,085, para os cromossomos de 1 a 10, respectivamente.

HENDRICK (1987) menciona que uma importante característica da medida do desequilíbrio gamético é o fato de ele ser independente ou muito próximo da independência das frequências alélicas. À medida que é mais dependente de frequências alélicas, não será apropriado para comparações entre amostras ou locos com diferentes frequências alélicas.

Observa-se na Figura 1 que as estimativas do DL entre dois locos decaem à medida que a distância entre eles aumenta. Esta queda é que chamamos *Linkage Disequilibrium Decay* (*LDD* Queda do Desequilíbrio de Ligação). O *LDD* observado para as linhagens DHs e Conv. é mais acentuado em distâncias menores que 40 cM e mais lento a partir deste ponto até 80 cM, quando comparados aos valores teóricos de uma população F_2 . Em linhagens convencionais, o *LDD* inicia-se em 0,07 e chega a 0,04, em 40 cM, e se estabiliza neste patamar.

A *LDD* é também citada por HENDRICK (1987) como outra propriedade importante da medida de desequilíbrio, indicada pela medida em uma população infinita ou muito grande. Assume-se, por simplicidade, que alguns fatores como limitação da população ou hibridização de duas populações geram algum desequilíbrio e, então, a queda do desequilíbrio é somente a função da recombinação entre os dois locos.

Comparando-se as equações das retas para cada cromossomo, apresentadas na Tabela 1 com os dados apresentados na Figura 1, verifica-se que os valores máximos de DL para as linhagens DH (0,159) e Conv (0,0659), estimados pelas equações, estão bem concordantes com os observados. As estimativas de *LDD* nestes dois modelos foram 0,024 para as DH e 0,008 para as convencionais, o que mostra um *LDD* mais acentuado nas linhagens DHs quando comparadas às convencionais. Contudo, apesar do mais forte *LDD* nas linhagens DH, elas sempre apresentaram um DL mais forte que as Conv, para uma mesma distância entre marcadores.

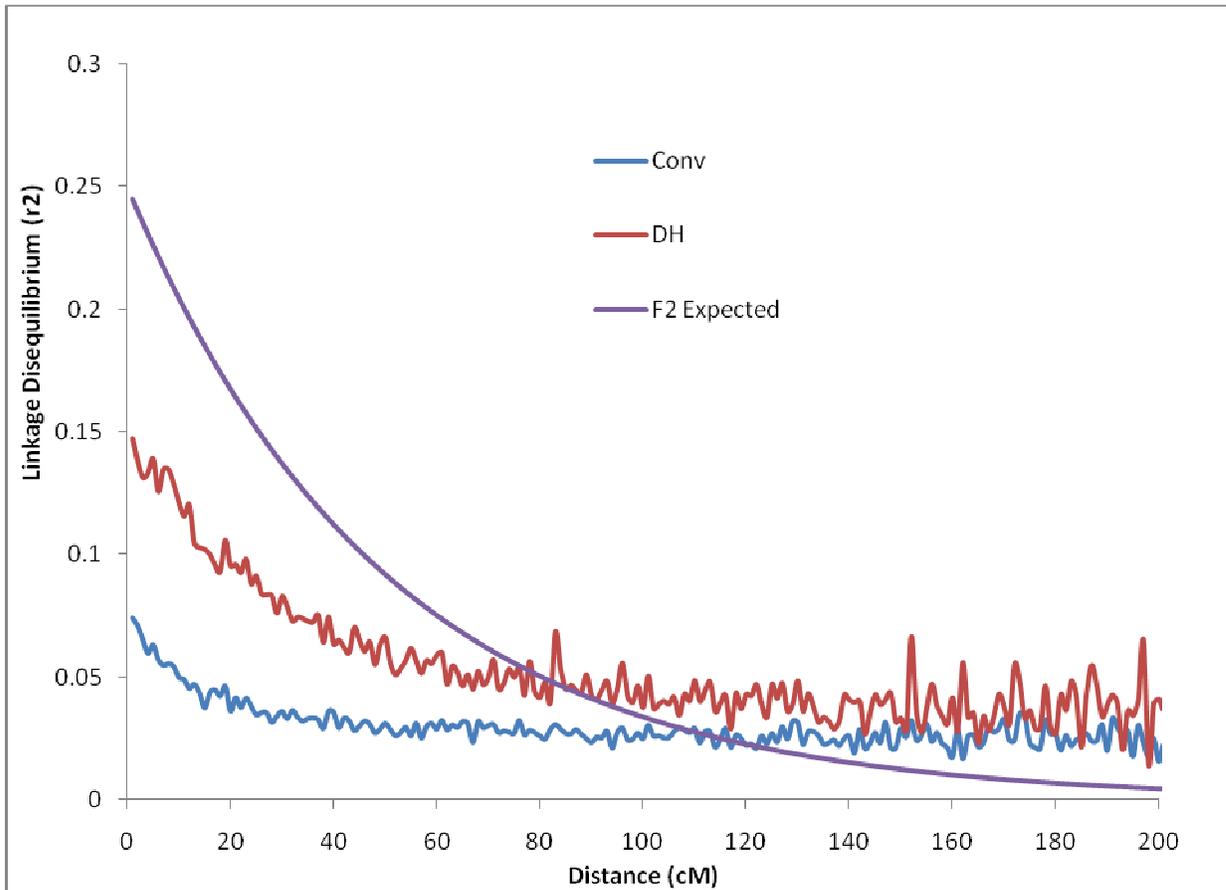


Figura 1: Desequilíbrio de ligação entre dois locos em função da distância entre eles.

Conv – Linhagens obtidas por autofecundação

DH – linhagens obtidas por tecnologia duplo-haplóides

F2 Expected – Curva do desequilíbrio de ligação teórico esperado em uma população F_2 .

Os dados de DL comparativos entre as linhagens DH e as convencionais indicam que, em todos os cromossomos, o r^2 das linhagens DH é maior que das linhagens convencionais, assim como na análise de todos os marcadores. Isto sugere que, com a utilização de linhagens DH, a segregação ocorre em blocos maiores, resultando em um maior número de genes, corroborando com os resultados demonstrados por BERNARDO, 2009, o qual sugere que linhagens DH podem herdar blocos gênicos inteiros sem haver ocorrido recombinação, sugerindo ainda que no

processo de obtenção de linhagens DH, utilize-se populações F_2 em vez de F_1 no processo de indução, pois há maior probabilidade de ocorrência de recombinação.

GUPTA et al. (2005) citam que vários fatores influenciam o DL, incluindo nível de homozigose (*inbreeding*), tamanho de população reduzido, distância genética entre linhagens, subdivisão de população, taxas de recombinação baixas e seleção natural e artificial. O autor menciona também que alguns outros fatores que direcionam a um aumento/desrupção no DL, incluem “outcrossing”, altas taxas de recombinação e elevadas taxas de mutação. Alguns outros fatores podem aumentar ou diminuir o DL, ou aumentar o DL entre alguns pares de alelos e diminuir entre outros pares. A mutação irá romper o DL entre pares, envolvendo alelos mutantes. De modo similar, rearranjos genômicos podem romper o DL entre genes separados pelo rearranjo, mas podem aumentar entre novas recombinações gênicas nas adjacências dos pontos de quebra, pela supressão do local de recombinação. Outros fatores que afetam o DL incluem estrutura da população e a conversão gênica.

4) Conclusões

- Linhagens duplo-haplóides apresentam blocos de ligação maiores, quando comparadas às linhagens convencionais.
- A queda no desequilíbrio de ligação em linhagens duplo-haplóides foi mais intensa que em linhagens convencionais.

5) Referências Bibliográficas

ALPERT, K.B.; TANKSLEY, S.D. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. **Proceedings of the Natural Academy Sciences**. USA. v. 93, p. 15503-15507, 1996

BERNARDO, R. Should maize doubled haplóides be induced among F₁ or F₂ plants?, **Theoretical and Applied Genetics**, <http://www.springerlink.com/content/c88115734270161k/>, 26 de abril de 2009.

FALCONER, D.S. & MACKAY, T.F.C., 1996, **Introduction to Quantitative Genetics**, Longman, Harlow, England, 4th edition.

GUPTA, P. K.; RUSTGI, S.; KULWAL, P. L. (1987) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects, **Plant Molecular Biology**, v. 57, 461-485, 1987.

HENDRICK, P.W. (1987) Gametic disequilibrium measures: Proceed with caution, **Genetics**, v. 117, p. 331-341, 1987

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits, **Genetics**, 124:743-756, 1990.

LUO, Z.W., THOMPSON, R.; WOOLLIAMS, J.A. A population different testers and independent population sample in maize reveals low power of QTL detection and large biases in estimates of QTL effects. **Genetics** v. 149 p. 383-403, 1997.

MOREAU, L.; CHARCOSSET, A.; HOSPITAL, F.; GALLAIS, A. Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. **Genetics**, v. 148, p. 1353-1365, 1998.

MOREAU, L.; LEMARIÉ, S.; CHARCOSSET, A.; GALLAIS, A. Economic efficiency of one cycle of Marker-assisted selection, **Crop Science**, v. 40, p. 329-337, 2000.

REMLINGTON, D.V.; THORNSBERRY, J. M.; MATSUOKA, Y.; WILSON, L.M.; WHITT, S.R.; DOEBLEY, J.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.M.; BUCLER IV, E. S. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome, **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 20, p. 11479-11484, 2001.

SILVA, H.D. **Aspectos Biométricos na detecção de QTLs (“Quantitative Trait Loci”) em espécies cultivadas**. Originalmente apresentada como Tese de Doutorado, ESALQ/USP, 2001.

STROMBERG, L.D.L DUDLEY, J.W.; RUFENER, G.K. Comparing conventional early generation selection with molecular marker assisted selection in maize. **Crop Science.**, v. 34, p. 1221-1225, 1994.

CAPITULO 3: INFLUÊNCIA DA ORIGEM GENÉTICA NA PRODUÇÃO DE DUPLO-HAPLÓIDES EM MILHO

RESUMO

Duzentos e vinte e cinco populações foram geradas a partir do cruzamento de vinte e cinco linhagens-elite, respeitando o grupo heterótico aos quais as mesmas pertenciam. As populações foram classificadas em Dentadas tropicais, *Flints* tropicas e Temperadas/Tropicais. Três ciclos de indução foram conduzidos, com diferentes populações compostas com as mesmas vinte e cinco linhagens escolhidas cruzadas entre si e com outras do mesmo padrão heterótico. As sementes haplóides foram submetidas a tratamento de duplicação cromossômica e após passar por período de aclimação em casa de vegetação, foram levadas a campo onde foram conduzidas, polinizadas, e suas espigas colhidas. Foram determinadas as variáveis porcentagem real de indução, sobrevivência em casa de vegetação, sobrevivência a campo, porcentagem de plantas polinizadas, eficiência de polinização e número de espigas colhidas. Houve diferenças significativas entre o comportamento dos grupos heteróticos em relação à porcentagem de indução, porcentagem de plantas macho-férteis, sobrevivência em casa de vegetação e porcentagem de polinizações sucedidas. Houve também interação significativa entre grupos heteróticos e ciclo de produção para as variáveis porcentagem de indução e porcentagem de plantas macho férteis. Não houve diferenças significativas para a variável sobrevivência a campo. Conclui-se que a origem genética das populações influencia na habilidade de produzir linhagens duplo-haplóides.

Palavras-chave: Duplo haplóides, haplodiplóides, haplóides *in vivo*, haplóides em milho, produção de linhagens duplo-haplóides,

.ABSTRACT

Two hundred and twenty five populations were generated using twenty five elite inbred lines, always respecting the heterotic pattern of each one. They were classified as Tropical Dent, Tropical *Flint* and Temperate/Tropical. Three induction seasons were conducted, with populations originated from crosses with the twenty five selected lines and others from the same heterotic pool. The haploid kernels were submitted on a chromosome doubling treatment and planted under shade-house. After two weeks, they were transplanted to the field and conducted, pollinated and ears were harvested. It was estimated the real induction percentage, shade-house survival, pollination efficiency and number of harvest ears. There were statistical differences within heterotic patterns for real induction percentage, pollinated plants, shade-house survival and pollination efficiency. No statistical difference was noticed on percentage of field plants survival. Also significant interaction was observed on real induction percentage and planting season and percentage of pollinated plants and season. Data drives to understand that are difference on ability of maize on double haploid techniques to be successfully depending on its background.

Keywords: Doubled haploids, haplodiploids, In vivo haploids, haploids maize, double haploid lines production.

1) Introdução

O sucesso de um programa de melhoramento para produção de híbridos comerciais de milho está na obtenção de linhagens endogâmicas elite. Para tanto, o método padrão utilizado para este fim é por meio de sucessivas autofecundações. A tecnologia de duplo-haplóides apresenta-se como uma alternativa viável, por meio da qual se obtêm linhagens homozigotas instantaneamente após o cruzamento das populações com uma linhagem indutora de haploidia e tratamento de duplicação cromossômica com agentes químicos. Além do ganho de tempo, outra vantagem é a utilização de menor área experimental nos campos de melhoramento, e também a possibilidade de se realizar os cruzamentos teste com uma linhagem terminada e não com uma progênie segregante F_3 ou F_4 .

A obtenção de linhagens duplo-haplóides é uma forma de reduzir tempo e espaço na obtenção de linhagens endogâmicas nos programas de melhoramento de milho. Pode-se aumentar em até três vezes a velocidade de um programa de melhoramento, em relação aos métodos tradicionais (STRAHWALD & GEIGER, 1988, citados por BORDES et al. 2006).

Haplóides de origem maternal são resultantes de uma falha primária na fertilização, causada por uma condição anormal, induzida ou herdada, num gameta masculino ou feminino e subsequente desenvolvimento do óvulo em embrião. (SARKAR e COE 1966).

Alguns tratamentos como tratamento de pólen com calor ou com raio "X" ou ainda o tratamento dos estigmas com hidrazina maleica, tem sido utilizados para a produção de haplóides maternais em milho (MATHUR et al. 1976, ZUOYU & MIGGUANG, 1984, respectivamente, citados por LASHERMES & BECKERT, 1988). CHASE, 1974 demonstrou que o atraso na polinização também pode produzir grãos haplóides.

Até a década de 90, a baixa eficiência das diferentes técnicas de derivação de duplo haplóides limitava esta ferramenta como uso em escala em um programa convencional de seleção. Com o desenvolvimento da técnica de indução de giminogenese *in situ*, tornou-se possível a produção de um grande número de duplo-haplóides. A técnica consiste em cultivo de anteras *in vitro* para produção de haplóides.

A partir de então, diversos trabalhos puderam ser conduzidos utilizando-se linhagens duplo-haplóides.

A viabilidade da produção de linhagens duplo-haplóides se deu com o desenvolvimento de indução de haplóides maternos (DEIMLING et al. 1997, CHALYK, 1999) com subsequente duplicação cromossômica utilizando-se colchicina (DEIMLING et al. 1997), dessa maneira, pôde-se aplicar a tecnologia de produção de linhagens duplo-haplóides em escalas que atende a um programa de melhoramento comercial.

Com a utilização desta tecnologia é possível garantir a pureza genética das linhagens desenvolvidas, visto que todas as plantas geradas são obtidas a partir de uma única semente haplóide que foi duplicada, originando uma linha pura, proporcionando assim maior qualidade das avaliações iniciais dos híbridos.

Desta forma, o presente trabalho visa determinar a influência da origem genética das populações na eficiência de produção de linhagens obtidas pela tecnologia de duplo-haplóides.

2) Material e Métodos

A pesquisa foi realizada nas dependências da fazenda experimental da Monsanto do Brasil Ltda. em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil, Referenciada com latitude 18° 56' 47''S, longitude 48° 09' 16''W e altitude 870m

Vinte e cinco linhagens elite do programa de melhoramento genético da Monsanto do Brasil, sendo seis classificadas como dentadas tropicais (TD) originadas de populações Tuxpeño/Tuxpan, dez classificadas como grãos duros tropicais (TF) originadas de populações Eto/Cateto/Flint Caribeño e nove classificadas como Tropicais/Temperadas (TT) originadas de populações Stiff Stalk/Dixie/Lancaster foram utilizadas para gerar as populações segregantes utilizadas no presente estudo. Estas linhagens foram cruzadas entre si, respeitando os grupos heteróticos, dando origem a um total de duzentos e vinte e cinco populações S_0 .

As populações foram originadas em ciclos de cruzamentos diferentes e então semeadas em três campos isolados onde o macho foi uma linhagem indutora de haploidia utilizada no programa de Duplo-Haplóides da empresa. Foram semeadas quarenta e oito populações em Março de 2006 (WIN06), 99 populações em agosto do ano de 2006 (SUM67) e setenta e oito populações em Março de 2007 (WIN07).

Após a polinização das populações pelo macho indutor, as espigas produzidas foram colhidas e levadas ao laboratório onde foram selecionados os grãos haplóides. A seleção foi feita com auxílio de lupa com aumento de três vezes, onde se verificava a presença de marca púrpura no endosperma e ausência de pigmentação no embrião. Procedeu-se então a estimativa do peso de mil sementes por meio da pesagem de três repetições de cem grãos. A massa total de grãos diplóides foi pesada e o número total de sementes foi estimado.

As sementes haplóides foram submetidas a tratamento de duplicação cromossômica com colchicina de acordo com o protocolo proposto por DEIMLING et al., 1997 e posterior aclimação em casa de vegetação. Após vinte dias, as plântulas

foram transplantadas a campo, onde foram conduzidas, polinizadas e suas espigas colhidas.

A percentagem real de indução, sobrevivência em casa de vegetação, sobrevivência a campo, percentagem de plantas polinizadas, eficiência de polinização e número de espigas colhidas foram determinadas. As percentagens foram calculadas relativas à média dos três ciclos trabalhados a fim de preservar a confidencialidade dos dados da eficiência do programa da empresa.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa SAS através do procedimento GLM, onde foram calculados os efeitos da estação de plantio, grupo heterótico, interação grupo X estação para cada uma das variáveis mencionadas anteriormente.

No caso de diferença significativa entre os tratamentos apontados pelo teste “F”, foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação das médias.

Havendo interação significativa entre grupos heteróticos e estações de plantio, foi realizado o procedimento LSMeans para identificação da significância das interações entre os grupos e estações.

Durante todo o processo de duplicação e condução a campo, plantas diplóides que possam ter sido classificadas como haplóides foram descartadas e o número de grãos haplóides inicial foi corrigido.

3) Resultados e Discussão

Na tabela 1, encontram-se os valores das médias para cada variável estudada.

As médias dos três ciclos foram calculadas e os dados convertidos em porcentagem relativas as médias.

Tabela 1. Média de porcentagem de indução real (IR%), porcentagem de plantas macho-férteis (Pol%), porcentagem de sobrevivência em casa de vegetação (SCV%), porcentagem de sobrevivência a campo (FS%), porcentagem de linhagens produzidas (DHP%) e porcentagem de plantas polinizadas que produziram grãos (Ef_Pol%).

Grupo	Estação	N*	IR%	Pol%	SCV%	FS%	DHP%	Ef_Pol%
TD	WIN06	19	149	132	93	94	127	109
TF	WIN06	9	90	127	109	90	129	106
TT	WIN06	20	64	108	97	98	98	101
TD	SUM67	20	113	84	90	106	84	98
TF	SUM67	53	67	80	110	105	115	112
TT	SUM67	26	136	86	97	103	66	74
TD	WIN07	11	150	132	96	91	115	102
TF	WIN07	18	98	101	99	104	101	110
TT	WIN07	49	98	107	99	96	90	92

*Porcentagem relativa à média dos três ciclos.

N – Número de populações utilizadas no ciclo

TD – Dentadas tropicais

TF – Flints Tropicais

TT – Temperadas/tropicais

Na Tabela 2 encontram-se sumarizada a análise da variância para as variáveis estudadas porcentagem de indução real (IR%), porcentagem de sobrevivência em casa de vegetação (SCV%), porcentagem de plantas macho-férteis (Pol%), porcentagem de linhagens produzidas (DHP%) e porcentagem de plantas polinizadas que produziram grãos (Ef_Pol%).

Tabela 2: Quadrados Médios obtidos na Análise da Variância para as variáveis IR%, SCV%, FS%, DHp%, Pol%, e Ef_Pol%

FV	GL	IR%	SCV%	FS%	DHp%	Pol%	Ef_Pol%
E	2	0,2672	0,0496	0,2018	0,7343	2,8699**	0,0861
G	2	5,1780**	0,3344**	0,0105	2,3493	0,3326**	1,1666
E*G	4	2,1326**	0,0476	0,0448	0,3785	0,1919*	0,1456
Erro	216	0,5576	0,0293	0,0733	0,6473	0,0698	0,3750
Total	224						

* Significativo a 5% pelo teste F

** Significativo a 1% pelo teste F

E – Estação de plantio

G – Grupo (TD,TF e TT)

E*G – interação estação de plantio X grupo

3.1) Percentagem Real de Indução (IR%)

Para a variável IR, houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade do teste F entre os diferentes grupos heteróticos. Não houve diferença significativa entre a média das estações que foram de 100,96, 105,43 e 115,45 para as estações WIN06, SUM67 e WIN07, respectivamente.

O grupo TD apresentou média de 137,56 diferindo pelo teste Tukey em relação aos demais grupos, TF e TT, que apresentaram médias de 85,24 e 99,04, respectivamente. As médias de IR% dos grupos TF e TT não diferem entre si.

Houve interação significativa entre grupos heteróticos e estações de plantio. Na Tabela 3 podem ser observadas as médias dos grupos heteróticos em relação às estações de plantio para a variável IR%.

Tabela 3: Comparação entre as médias de percentagem de real de indução (IR%) dentro dos diferentes grupos heteróticos em relação à estação de plantio

Grupo	Estação	N	IR(%)	
TD	WIN07	11	150	a
TD	WIN06	19	149	a
TD	SUM67	20	113	a
TT	SUM67	26	136	a
TT	WIN07	49	98	ab
TT	WIN06	20	64	b
TF	WIN07	18	98	a
TF	WIN06	9	90	a
TF	SUM67	53	67	a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste T a 1% de probabilidade.

Na Figura 1 pode ser observado o gráfico de interação entre grupos heteróticos e estações de plantio para a variável IR%.

A média de IR% do grupo TD na estação WIN06 foi de 150,27 e não diferiu da média do grupo TF que foi de 89,88, mas diferindo da média do grupo TT que foi de 63,67. Durante a estação SUM67, houve um aumento na IR% do grupo TT, resultando numa média de 135,71. A média do grupo TT não diferiu da média do grupo TD, que foi de 113,10, porém demonstrou uma interação do tipo complexa com a média do grupo TF que foi de 67,49, diferindo estatisticamente pelo teste "T" a 1% de probabilidade. Já na estação WIN07, a média do grupo TT foi de 97,77 e as médias dos grupos TD e TF foram respectivamente, 150,27 e 98,36, não havendo diferença significativa entre os grupos nesta estação.

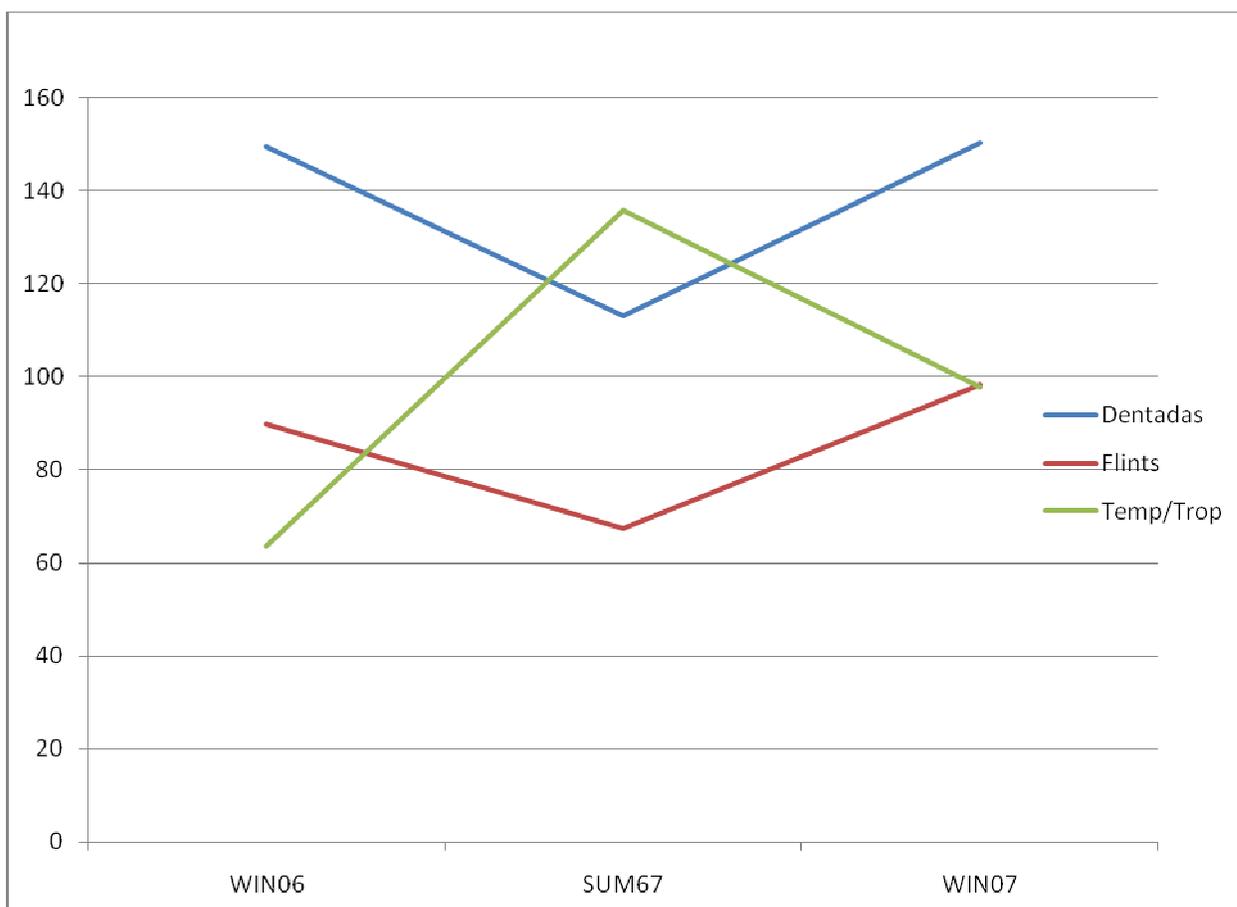


Figura 1. Gráfico da interação entre médias dos grupos heteróticos e estações de plantios para a variável IR%

Os dados obtidos pelos experimentos concordam com EDER & CHALYK (2002), que realizaram ensaios de indução com vinte populações, sendo onze dentadas, quatro *flint* europeias e cinco *flint* X dentadas. Os autores obtiveram uma média de indução para as populações dentadas de 5,3%, contra 3,6% das populações *flint* e 4,4% das populações *flin* X dentadas.

COE (1994) comenta que a dificuldade em isolar haplóides de genótipos de grãos duros (*flint*) está relacionada com genes dominantes existentes no milho, *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*, os quais inibem a síntese de antocianina no endosperma, interferindo na expressão do marcador utilizado para seleção de haplóides. Quando há pelo menos

um dos genes presente no genótipo maternal, a identificação de haplóides torna-se muito difícil devido à falta de pigmentação.

RÖBER (1999) cita que em geral, a expressão de genes marcadores de antocianina é melhor em genótipos dentados.

De modo contrário a produção de antocianina no endosperma, CHALYK & EDER (2002) mostraram que a expressão do gene *R1-nj*, responsável pela pigmentação por antocianina no embrião, tem sua expressão melhor em genótipos de grãos duros, quando comparados com os genótipos dentados e *flint* X dentados.

3.2) Sobrevivência em Casa de Vegetação (SCV%)

Houve diferença significativa em relação aos grupos heteróticos em relação à porcentagem de sobrevivência em casa de vegetação, conforme pode ser verificado na Tabela 2. O grupo TF teve média de 105,84 de sobrevivência, diferindo significativamente dos demais pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os grupos TT e TD resultaram em média de 97,66 e 92,83, respectivamente, não diferindo entre si.

Não houve diferença significativa entre as médias das estações de plantio assim como não houve interações entre as médias das estações de plantio e grupos heteróticos.

CHALYK & EDER (2002), realizaram experimentos onde após o tratamento de duplicação cromossômica com colchicina, as plântulas foram cultivadas em casa de vegetação e a campo diretamente. A sobrevivência em casa de vegetação após o tratamento foi de 90,8% enquanto que no cultivo diretamente a campo foi de 88,6%. Além disso, o cultivo em casa de vegetação também favoreceu o aumento do número de plantas tratadas que produziram pólen (macho-férteis) e o número de plantas polinizadas que produziram grãos, quando comparadas com as médias das plantas cultivadas a campo diretamente. A média da porcentagem de plantas macho-férteis em casa de vegetação foi de 42,4% contra 16,1% do cultivo a campo e a porcentagem de

plantas polinizadas que produziram grãos foi de 30,5% no cultivo em casa de vegetação contra 8,1% das plantas cultivadas a campo. Porém, os autores não correlacionaram estas características com a origem genética (dentadas, grãos duros ou duros X dentadas) do material, assim como fizeram para a característica de porcentagem de indução.

3.3) Porcentagem de plantas macho-férteis (Pol%)

Em relação à variável Pol%, houve diferença significativa entre as médias das estações, entre as médias dos grupos heteróticos ao nível de 1% de significância para o teste “F” e ainda interação significativa entre estações e grupos ao nível de 5% de significância, conforme pode ser verificada na Tabela 2. As médias dos grupos heteróticos obtidas em cada estação estão representadas na Tabela 1.

A média da estação WIN06 foi de 122,31, não diferindo da estação WIN07 que teve média de 113,21, porém ambas foram diferente significativamente quando comparadas a média da estação SUM67 que foi de 82,55 de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade. A comparação foi considerada significativa quando maior que 0,0167, utilizando-se a correção de Bonferroni $\alpha/3$.

Em relação aos grupos heteróticos, a média do grupo TD foi de 116,14, diferindo significativamente pelo teste Tukey a 5% das médias dos grupos TT e TF que foram de 102,76 e 100,25, respectivamente.

A Figura 2 representa graficamente as médias dos grupos heteróticos em relação às estações de plantio. A interação entre grupos e estações foi significativa ao nível de 5%.

Na Tabela 4 podem ser verificadas as médias dos grupos heteróticos em cada estação e a diferença estatística entre elas avaliada através do teste “T” ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 4: Médias de percentagem de indução real (Pol%) dos diferentes grupos heteróticos em relação à estação de plantio

Grupo	Estação	N	Pol	
TD	WIN06	19	132,209	a
TD	WIN07	11	132,142	a
TD	SUM67	20	84,084	b
TT	WIN06	20	107,529	a
TT	WIN07	49	107,002	a
TT	SUM67	26	86,228	b
TF	WIN06	9	127,205	a
TF	WIN07	18	100,739	a
TF	SUM67	53	80,359	b

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste T a1% de probabilidade.

Na estação WIN06, as médias dos grupos TF e TD não diferem entre si, mas diferem das médias do grupo TT. Na estação SUM67, nenhuma das médias dos grupos difere entre si, voltando a apresentar diferenças significativas na estação WIN07, onde a média de TD diferente das médias de TF e TT, sendo as duas últimas não diferentes entre elas.

O ciclo SUM67 apresentou as médias mais baixas para todos os grupos heteróticos, sugerindo que a produção de linhagens DH é facilitada pela polinização no verão, pois os ciclos induzidos no inverno são plantados a campo no verão, quando obtiveram maiores taxas de plantas macho-férteis.

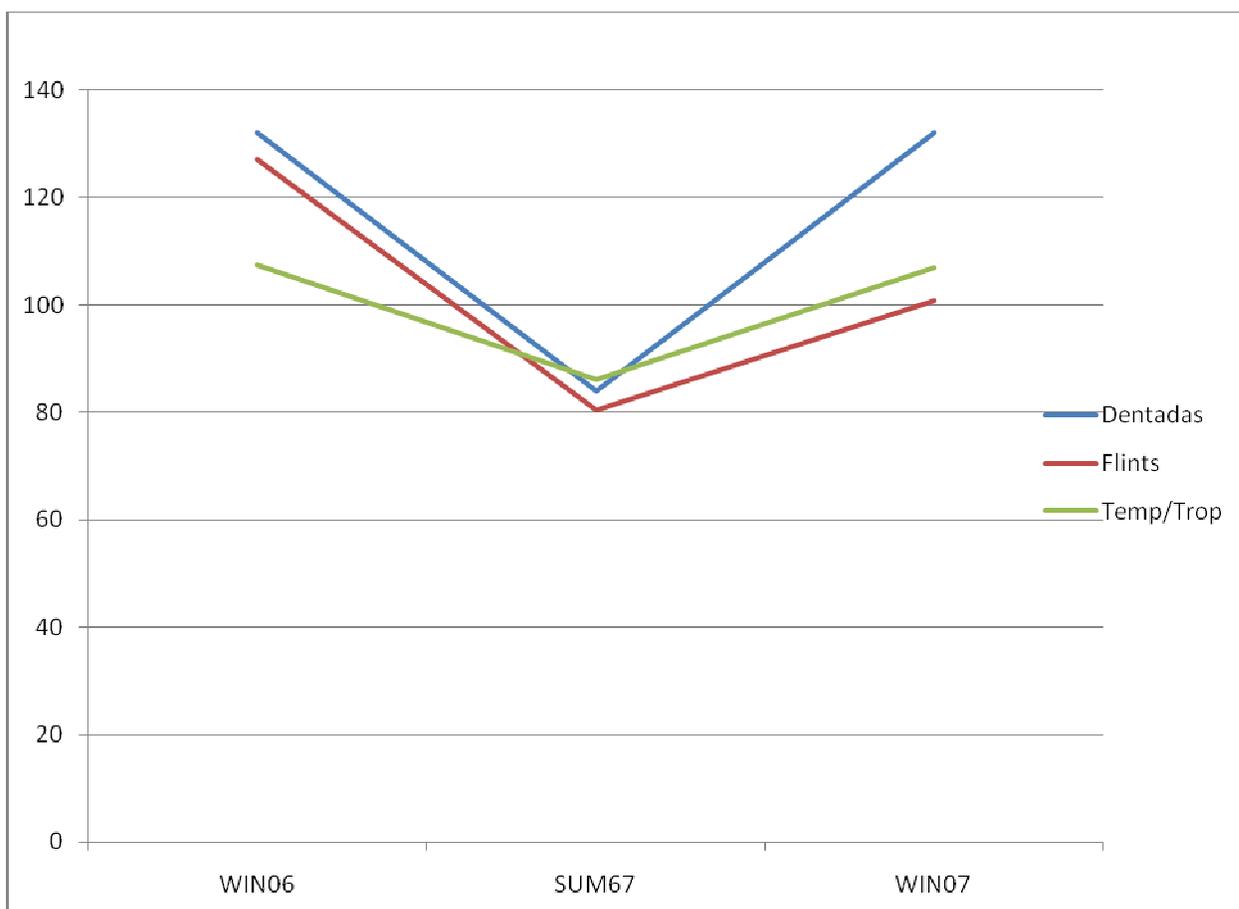


Figura 2. Gráfico da interação entre médias dos grupos heteróticos e estações de plantios para a variável Pol%

Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos e estações de plantio em relação à variável eficiência de polinização.

3.4) Sobrevivência a campo (FS%),e eficiência de polinização (Ef_Pol%) e número total de linhagens duplo-haplóides produzidas (DHp).

Não houve diferenças significativas entre os grupos heteróticos para as variáveis sobrevivência a campo (FS%), eficiência de polinização (Ef_Pol%) e número total de linhagens duplo-haplóides produzidas (DHp%), assim como também não houveram diferenças significativas entre as médias das estações de plantio para estas características.

4) Conclusões

- A origem genética das populações influencia na taxa de indução de haplóides, sobrevivência em casa de vegetação e plantas macho-férteis.
- A porcentagem de plantas macho-férteis é a variável mais influenciada pelo ambiente.

5) Referências Bibliográficas

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A., Doubled haploid versus S_1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1063-1072, 2006.

EDER, J.; CHALYK, S., In vivo haploid induction in maize, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 703-708, 2002.

CHASE, S.S. Utilization of haploids in plant breeding: Breeding diploid species. In K.J. Kasha (ed.) **Procedures of the First International Symposium on Haploids**, Guelph, ON, 1974 Canada. 10–14 June 1974. Univ. of Guelph, Guelph, ON, Canada.

CHALYK, S.T., ROTARENCO, V.A., Using maternal haploid plants in recurrent selection in maize, **Maize Genetics Cooperation News Letter**, v. 74, p. 56-57, 1999.

COE, E.H., Anthocyanin genetics. In: FREELING M, WALBOT V. (ed.), **The maize handbook**, Springer-Verlag, New York, p. 279-281, 1994.

DEIMLING, S., RÖBER, F., GEIGER, H.H., Methodik und Genetik der in-vivo-haploideninduktion bei Mais, Votr Pflanzenzüchtung, v. 38, p. 203-204, 1997.

LASHERMES, P.; AND M. BECKERT. A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 405–410, 1988.

RÖBER F. Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-Markern zur in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. Phd Thesis, Universität Hohenheim, 1999.

SARKAR K. R.; COE E. H. A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize, **Genetics**, v. 54, p. 453-464, 1966.