

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA  
VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA**

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS GENEALÓGICOS  
E DUPLO-HAPLÓIDE PARA SELEÇÃO DE  
GENÓTIPOS ELITES E ESTUDO DA HERANÇA  
GENÉTICA DE ALTURA DE PLANTA E ESPIGA EM  
MILHO**

**ANDERSON LUIZ VERZEGNAZZI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, dezembro de 2011.

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA  
VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA**

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS GENEALÓGICOS  
E DUPLO-HAPLÓIDE PARA SELEÇÃO DE  
GENÓTIPOS ELITES E ESTUDO DA HERANÇA  
GENÉTICA DE ALTURA DE PLANTA E ESPIGA EM  
MILHO**

**ANDERSON LUIZ VERZEGNAZZI**

**Orientadora: Prof. Dr Magali F. Grando**

**Co-orientadora: Dr Ph.D Sandra C. K. Milach**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, dezembro de 2011.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

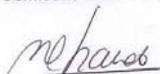
"Comparação dos métodos genealógicos e duplo haplóide para seleção de genótipos elites e estudo da herança genética de altura de planta e espiga em milho"

Elaborada por

ANDERSON LUIZ VERZEGNAZZI

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Agronomia – Área de Produção Vegetal

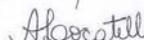
Aprovada em: 17/12/2010  
Pela Comissão Examinadora

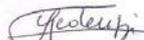
  
Dra. Magali Ferrari Grando  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora

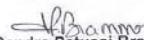
  
Dr. Wilson Antonio Klein  
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

  
Dra. Sandra Cristina Milach  
Pioneer Sementes  
Co-orientadora

  
Dr. Hélio Carlos Rocha  
Diretor FAMV

  
Dra. Ana Beatriz Locatelli  
Pioneer Sementes

  
Dr. Luiz Carlos Federizzi  
UFRGS

  
Dra. Sandra Pátussi Brammer  
Embrapa Trigo

CIP – Catalogação na Publicação

---

V574c Verzeznazzi, Anderson Luiz  
Comparação dos métodos genealógicos e duplo-haplóide  
para seleção de genótipos elites e estudo da herança genética  
de altura de planta e espiga em milho / Anderson Luiz  
Verzeznazzi. – 2011.  
99 f. : il. ; 25 cm.

Orientação: Prof. Dr. Magali F. Grando.  
Co-orientação: Dr. Ph.D. Sandra C. K. Milach.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade  
de Passo Fundo, 2011.

1. Milho – Melhoramento genético. 2. Milho –  
Sementes. 3. Milho – Plantio. I. Grando, Magali  
Ferrari, orientador. II. Milach, Sandra Cristina Kothe,  
co-orientador. III. Título.

CDU: 633.15

---

Catálogo: Bibliotecária Angela Saadi Machado - CRB 10/1857

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Anderson Luiz Verzeznazzi nasceu em 13 de março de 1982, na cidade de Santa Bárbara do Sul, estado do Rio Grande do Sul.

Biólogo, formando em 17 de agosto de 2008 pela Universidade de Passo Fundo, em Passo Fundo, RS.

Em 2009 iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Produção Vegetal, em nível de mestrado, na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

**DEDICATÓRIA**

À minha família...

Meus pais, Aquelino (*in memoriam*) e Irma Verzeznazzi;

Meus irmãos (as) Irineu, Juarez, Janete, Vera Lúcia, Terezinha e Lourdes;

Minha namorada Grazieli Araldi da Silva;

Aos meus amigos (a) Márcio Eccel, Marco Barbieri, Vagner Aliati, Salete Q. Pavin e Carlos Silveira.

Aos colegas de trabalho, Maurício Kobiraki, Ana Beatriz Locatelli e Sandra C. K. Milach, responsáveis pelo meu encaminhamento e desenvolvimento profissional e acadêmico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e saúde;

À Universidade de Passo Fundo e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo pela oportunidade para a realização do curso;

À empresa Du Pont do Brasil – divisão Pioneer Sementes Ltda., pela disponibilização dos genótipos para desenvolvimento da pesquisa e pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional;

À Mari Viecelli, secretária do PPGAgro, pela disponibilidade e eficiência;

Aos colegas de trabalho, Alan Batisti, Carina K. Sthal, Douglas B. Jandrey, Fabrício B. Passini, Jacso Dellai, Joelito Zatti, Marcelo Silva, Paulo R. O. dos Santos, Paulo C. Endrigo, pelo apoio e incentivo;

À Dr<sup>a</sup>. Sandra C. K. Milach, minha co-orientadora, pela dedicação, paciência, confiança, orientação, conhecimentos transmitidos e principalmente pelo direcionamento dado à minha carreira profissional e acadêmica;

À professora Magali Ferrai Grando, Ph.D., minha orientadora, pelo apoio, orientação, compreensão e, acima de tudo, pelo otimismo e motivação nessa caminhada;

À Dr<sup>a</sup>. Ana Beatriz Locatelli pela oportunidade em poder trabalhar com melhoramento vegetal, pelos ensinamentos e orientações profissionais e pessoais;

Aos professores do curso, pelo apoio, compreensão e pelos conhecimentos transmitidos, em especial aos professores Pedro A. V. Escosteguy, Geraldo Chavarria Lamas Jr., Florindo Luiz Castoldi e Sandra Patussi Brammer;

Aos colegas de curso Alexandre Müller, Aveline Avozani, Adilar Chaves, Bernardo Tisot, Gabriela Parizoto, Guilherme Parize, Heloísa Mendonça, Marília Boeno e Marília Rodrigues da Silva, pela ajuda e apoio durante esta trajetória.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	ix
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	xvii
2.1	Caracterização geral do milho.....	xvii
2.2	Método genealógico no melhoramento.....	xxii
2.3	Duplo-haplóides.....	xxvi
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	xxxiii
	CAPÍTULO I.....	1
	SELEÇÃO DE GENÓTIPOS ELITES DE MILHO EM COMBINAÇÕES HÍBRIDAS PELOS MÉTODOS GENEALÓGICO E DUPLO-HAPLÓIDE.....	1
	SELECTION OF ELITE MAIZE GENOTYPES DEVELOPED BY PEDIGREE X DOUBLED HAPLOID METHODS.....	2
1	INTRODUÇÃO.....	3
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3	RESULTADOS.....	16
4	DISCUSSÃO.....	22
5	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
	CAPÍTULO II.....	30
	HERANÇA GENÉTICA DE ALTURA DE PLANTA E ESPIGA EM LINHAS DUPLO-HAPLÓIDES E GERAÇÕES SEGREGANTES DE MILHO.....	30

GENETIC INHERITANCE OF PLANT AND EAR HEIGHT IN DOUBLED HAPLOIDS AND SEGREGATING GENERATIONS IN MAIZE .....	31
1 INTRODUÇÃO .....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3 RESULTADOS .....	44
4 DISCUSSÃO .....	59
5 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

**LISTA DE TABELAS****Capítulo I:** Seleção de genótipos elites de milho em combinações híbridas pelos métodos genealógico e duplo-haplóide

<b>Tabela 1:</b> Números de indivíduos ou linhas para cinco populações de milho nas gerações F1, F2, F3, D1 e D2 utilizadas neste estudo .....	13
<b>Tabela 2:</b> Análise de variâncias para rendimento de grãos, umidade de colheita, altura de planta e espiga de cinco populações pertencentes a dois grupos heteróticos e obtidas pelos métodos genealógico e duplo-haplóide avaliadas em combinações híbridas .....	17
<b>Tabela 3:</b> Comparação de médias de cinco populações de milho em testcross para rendimento de grãos, altura de planta e espiga e umidade de colheita para os métodos, populações e grupo heterótico .....	19
<b>Tabela 4:</b> Diferencial de seleção, ganho genético e herdabilidade para rendimento de grãos, altura de planta e espiga para cinco populações de milho estudadas, conforme o desenvolvimento de linhagens pelo método genealógico (F3) ou duplo-haplóide (DH).....	21

**Capítulo II:** Herança genética de altura de planta e espiga em linhas duplo-haplóides e gerações segregantes de milho

<b>Tabela 1:</b> Populações, cruzamentos, e números de indivíduos ou linhas de milho nas gerações F1, F2, F3, D1 e D2 utilizados para avanço (F1) e/ou avaliação de altura de planta e inserção espiga (F2, F3, D1 e D2) .....	39
<b>Tabela 2:</b> Comparação das médias, variâncias e herdabilidades para altura de planta das cinco populações de milho estudadas em duas gerações segregantes (F2, F3) e duas fixas (D1 e D2).....	52
<b>Tabela 3:</b> Comparação das herdabilidades, para a característica altura de espiga nas cinco populações de milho em duas gerações F2, F3 e em duas gerações fixas D1 e D2 .....	53
<b>Tabela 4:</b> Comparação de herdabilidade para altura de planta em combinações híbridas por local. ....	55
<b>Tabela 5:</b> Comparação das herdabilidades para altura de espigas em combinações híbridas nos três locais observados .....	56
<b>Tabela 6:</b> Correlação entre linhas F3 para altura de planta, altura de espiga e seus respectivos híbridos (TCF3 e TCDH) e 3 locais.....	58

**LISTA DE FIGURAS**

**Capítulo I:** Seleção de genótipos elites de milho em combinações híbridas pelos métodos genealógico e duplo-haplóide

**Figura 1:** Esquema de obtenção de cinco populações F2 e subsequentes gerações provenientes de oito linhagens de milho através dos métodos genealógico e duplo-haplóide. .... 11

**Capítulo II:** Herança genética de altura de planta e espiga em linhas duplo-haplóides e gerações segregantes de milho

**Figura 1:** Distribuição de frequência para a característica de altura de planta, em duas gerações segregantes (F2 e F3) e em duas gerações fixas (D1 e D2) das populações cinco cruzamentos (populações) de milho..... 46

**Figura 2:** Distribuição de frequência para a característica de altura de espiga, em duas gerações segregantes (F2 e F3) e em duas gerações fixas (D1 e D2) das populações cinco cruzamentos (populações) de milho..... 48

**COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS GENEALÓGICOS E  
DUPLO- HAPLÓIDE PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS  
ELITES E ESTUDO DA HERANÇA GENÉTICA DE ALTURA  
DE PLANTA E ESPIGA EM MILHO**

**RESUMO:** O milho (*Zea mays L.*) é uma espécie da família das gramíneas, sendo o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz . O Aprofundamento do conhecimento da fisiologia e genética da cultura, aprimoramento das técnicas de melhoramento e introdução de novas tecnologias dentro dos programas de pesquisa, tem estimulado, ano após ano, o crescimento da produção e produtividade do milho, podendo atingir, na safra 2010/2011, uma produção de 51, 3 milhões de toneladas no Brasil. Características fenotípicas associadas a aspectos genéticos são comumente estudas na cultura do milho. Altura de planta e espiga são características importantes no melhoramento de milho por estarem associadas à resistência ao acamamento e rendimento de grãos. Devido à sua importância, diversos estudos têm sido realizado buscando compreender as bases genéticas destas características . A tecnologia de duplo-haplóide (DH) para obtenção de linhas homozigotas tem sido cada vez mais empregada nos programas de melhoramento de milho para produção de híbridos comerciais. Com a melhoria e evolução das técnicas de obtenção de linhas DH, vários estudos vêm sendo realizados para avaliar a eficiência do método e a eficácia da sua utilização dentro dos programas, principalmente comparando com outros métodos. Este trabalho busca contribuir para o esclarecimento de questionamentos sobre o uso de linhas duplo-

haplóide nos programas de melhoramento de milho, através da comparação de dois métodos de melhoramento, método genealógico e duplo haploide, para identificação de linhas superiores de milho que produzam híbridos de alto rendimento de grãos combinado com com baixa altura de planta e inserção de espiga. Também foi objetivo deste trabalho comparar o ganho genético e a herdabilidade de cinco populações de milho obtidas por ambos os métodos. Para o desenvolvimento desse estudo foram utilizadas oito linhagens homocigotas de milho, da Du Pont do Brasil – divisão Pioneer Sementes, que foram cruzadas dentro de seus grupos para o desenvolvimento de cinco populações, três do grupo heterótico SSS (AxB, AxC, DxE) e duas do NSS (FxG e FxH). Após os cruzamentos as populações foram autofecundadas para obtenção das gerações segregantes. Essas populações foram conduzidas por dois métodos de melhoramento, o genealógico e o duplo-haplóide. Para comparação dos métodos em gerações híbridas, as linhas F<sub>3</sub> (genealógico) e F<sub>3</sub> DH foram cruzadas com um testador de alta capacidade combinatória para a produção dos Testcross (F<sub>3</sub>-TC e F<sub>3</sub>-DH). Os ensaios das populações segregantes foram conduzidos na estação de pesquisa da Du Pont (Pioneer) no município de Coxilha-RS. Os ensaios dos híbridos F<sub>3</sub>-TC e F<sub>3</sub>-DH, foram conduzidos em três municípios do estado do Rio Grande do Sul, Carazinho, Cruz Alta e Condor. As avaliações realizadas foram: altura de planta e espiga nas gerações F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> e DH-D<sub>2</sub> e respectivos híbridos F<sub>3</sub>-TC e DH-TC, além da produtividade destes híbridos. O trabalho mostrou que não houve diferença entre os métodos genealógico e DH na identificação de linhas superiores quanto ao rendimento de grãos em combinações

híbridas. Para características de herdabilidade moderada a alta, como altura de planta e espiga, o método DH pode apresentar vantagens sobre o genealógico. Além disso, as distribuições de frequências revelaram que altura de planta e espiga são características de alta herdabilidade, ampla segregação transgressiva e alta heterose em F<sub>2</sub>. O uso de duplo-haplóides versus linhas segregantes no estudo da herança de altura de planta e espiga revela diferentes aspectos da variabilidade genotípica para estas características e em geral herdabilidades no sentido amplo e restrito de maior magnitude.

**Palavras – chave:** ganho genético, germoplasma tropical, herdabilidade, melhoramento de milho, Pai-progênie, segregação transgressiva, *Zea mays*.

**COMPARISON OF PEDIGREE AND DOUBLE HAPLOID  
METHODS FOR MAIZE ELITE GENOTYPE SELECTION AND  
GENETICS INHERITANCE STUDY OF PLANT AND EAR  
HEIGHT**

**ABSTRACT:** The maize (*Zea mays* L.) is a species of the grass family. It is the third most cultivated cereal in the world, behind only to wheat and rice. The increasing of knowledge of the physiology and genetics of culture, the refinement of breeding techniques and the introduction of new technologies within the research programs has enhanced the production and productivity of maize, so that the production could reach 51.3 million tons in the 2010/2011 in Brazil . Phenotypic characteristics

associated with genetic factors are commonly studied in maize. Plant height and ear height are important characteristics for maize since they are associated with resistance to lodging and grain yield. Because of its importance, several studies have been done trying to understand the genetic basis of it. The technology of double-haploid (DH) to obtain homozygous lines have been increasingly used in maize breeding programs for production of commercial hybrids. With the improvement and development of techniques for obtaining DH lines, several studies have been conducted to evaluate the efficiency and effectiveness of this method within programs especially compared to other methods. This work seeks to contribute to the clarification of questions about the use of double-haploid lines in maize breeding programs, by comparing two methods of breeding, pedigree method and double haploid, to identify superior lines of maize that produce hybrids of high grain yield, combined with low plant height and ear insertion. Also was aimed to compare genetic heritability and five maize populations obtained by both methods. To develop this study we used eight inbred lines of maize, from Du Pont in Brazil - Pioneer Seeds Division, which were crossed within their groups for the development of five populations, - three of the SSS heterotic group (AxB, AxC, DxE) and two NSS (FxG, FxH). After the crossing, populations were selfed to obtain segregating generations. These populations were conducted by two methods of breeding, the pedigree and the double-haploid. To compare the methods of generation hybrid lines  $F_3$  (pedigree) and  $F_3$  DH were crossed with a tester presenting high capacity combinatorial for producing testcross ( $F_3$ -TC and  $F_3$ -DH). The experiments with segregating populations were conducted at the research station of DuPont (Pioneer) at Coxilha-RS city. The experiments of hybrid  $F_3$ -TC and  $F_3$ -DH were conducted in three

cities in Rio Grande do Sul state, Carazinho, Cruz Alta and Condor. The variables evaluated in the field were: plant height and ear height in  $F_2$ ,  $F_3$ , DH- $D_1$  and DH- $D_2$  and their hybrids  $F_3$ -TC and  $F_3$ -DH, as well as yield of these hybrids. The study showed no difference between DH and pedigree methods in the identification of superior lines for grain yield in hybrid combinations. For characteristics of moderate to high heritability, such as plant height and ear height, the DH method had advantages over the pedigree. Moreover, the frequency distributions revealed that plant height and ear height are characteristic of high heritability, broad transgressive segregation and high heterosis in  $F_2$ . The use of double haploid versus lines segregating in the study of inheritance of plant height and ear height reveals different aspects of genotypic variability for these characteristics and in general narrow and broad sense heritability of greater magnitude.

**Key-words:** genetic gain, heritability, maize breeding, parent-progeny, transgressive segregation, tropical germplasm, *Zea mays*.

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família das poáceas, sendo o terceiro cereal mais cultivado no mundo, perdendo apenas para o trigo e o arroz (FAO, 2008). No Brasil, a produção de milho vem crescendo anualmente, sendo que na safra 2010/2011 pode chegar a uma produção de 51, 3 milhões de toneladas (CIMilho, 2010). Os maiores consumidores de milho no Brasil são os criadores de aves (para corte e postura) e de suínos, que utilizam o milho para a produção de ração (IBGE, 2009). Seu uso não se restringe a indústria alimentícia, já que o milho é largamente utilizado na produção de elementos espessantes e colantes, além da produção de óleos. Recentemente, a Europa e os Estados Unidos têm incentivado seu uso para a produção de etanol. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado *in natura*, como milho verde e na forma de subprodutos como pão, farinha e massas (PINAZZA e ALIMANDRO, 1998).

Um dos principais motivos do incremento na sua produtividade nos últimos anos são os avanços no melhoramento genético da cultura. Estima-se que metade do incremento da produtividade das principais espécies agronômicas nos últimos 50 anos seja atribuída ao melhoramento genético (BORÉM, 2001).

Os métodos de melhoramento aplicados as culturas também vêm sofrendo modificações em suas metodologias com o passar dos anos, isso para que o melhorista possa utilizar o método visando torná-lo mais adequando a sua situação.

No caso do milho, um dos métodos de melhoramento mais utilizados é o Método Genealógico, baseado no princípio da seleção individual de plantas na população segregante, bem como a avaliação de cada progênie separadamente, onde o mérito dos indivíduos selecionados é avaliado pelo teste de progênie, desta forma a seleção é praticada com base no genótipo dos indivíduos (BORÉM, 2001).

Pelo fato do processo de obtenção de linhas homozigotas através dos métodos tradicionais de melhoramento levar no mínimo cinco gerações, uma alternativa disponível na cultura do milho para acelerar a obtenção de linhagens puras consiste na produção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados, também conhecidos como duplo-haplóides (CHASE, 1952).

Indivíduos haplóides são portadores de uma única cópia de cada cromossomo, apresentando inclusive no tecido somático o número  $n$  de cromossomos que seria típico dos gametas daquela espécie (BORÉM, 2001).

Segundo MORAES-FERNANDES et al. (1999), duplo-haplóides são plantas derivadas de seus gametas, portadoras de apenas um genoma, o qual é duplicado artificialmente, obtendo linhas totalmente homozigotas. Estas linhas são obtidas em apenas uma geração, ao invés de sete a nove necessárias através dos processos normais de melhoramento. Desta forma a obtenção de germoplasma ou cultivares superiores em produtividade e/ou adaptação, é antecipada. Dentre as inúmeras vantagens da utilização de DH's a mais significativa é a redução do tempo necessário para o processo de obtenção de novos genótipos homozigotos. Por isso, a técnica de

duplo-haplóide vem sendo cada vez mais empregada para acelerar os programas de melhoramento.

No entanto, os questionamentos sobre manter as técnicas convencionais de melhoramento, introduzir parcialmente DH's ou ainda ter uma programa 100 % duplo-haplóide são decisões a serem tomadas nos programas de melhoramento. Para isso, ambos os métodos devem ser comparados, analisando suas vantagens e desvantagens dentro de cada programa, e tratando-se em um programa de melhoramento de milho, compará-los no resultado final que é o híbrido. Estas informações serão úteis para que os programas possam definir as melhores estratégias de melhoramento e produção de híbridos de forma rápida, preservando a variabilidade genética do programa, ganhos genéticos e produção de linhas superiores.

Assim, o presente trabalho busca contribuir para o esclarecimento desses questionamentos sobre o uso de linhas duplo-haplóide nos programas de melhoramento de milho. Tendo em vista a introdução da técnica de DH em um programa de melhoramento, este trabalho tem por objetivos comparar dois métodos de melhoramento (método genealógico e duplo-haplóide) para identificação de linhas superiores de *Zea mays* que produzam híbridos de alto rendimento de grãos e que combinem rendimento de grãos com baixa altura de planta e inserção de espiga, e comparar o ganho genético e a herdabilidade de cinco populações de milho obtidas por ambos os métodos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caracterização geral do milho

O milho (*Zea mays* ssp. *mays*) representa um dos principais cereais cultivados no mundo. Isso se deve principalmente pelo seu elevado valor econômico e potencial genético que esta cultura apresenta, sendo bastante responsivo pelas técnicas de manejo. É extensivamente utilizado com alimento humano e para ração animal, devido as suas qualidades nutricionais.

O milho é cultivado em várias regiões do mundo, totalizando cerca de 150 milhões de hectares, com uma produção que oscila entre 550 a 580 milhões de toneladas. Os principais produtores de milho no mundo são os Estados Unidos, China, Brasil, México, França, Argentina e Índia. Os Estados Unidos são responsáveis por 25% da área plantada, 40% da produção, 30% do consumo e 70% das exportações. Os países asiáticos – Japão, Coreia e Taiwan, seguidos do México e do Egito são os maiores importadores. O Brasil produz mais de 40 milhões de toneladas de milho por ano, sendo o terceiro país em área plantada (13 milhões de hectares). O estado líder na sua produção no Brasil é o Paraná, seguido de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo. Os milhos mais semeados são os híbridos, representando cerca de 70% da área global da cultura (IBGE, 2007).

Apesar de sua relevância na economia do país, a produtividade média de milho no Brasil tem se situado entre 3,5 e 4,0 t ha nas últimas safras. Estes valores são muito baixos, se comparados aos rendimentos superiores a 10 t ha que têm sido obtidos em

condições experimentais ou com a produtividade média dos Estados Unidos, que supera 9 t ha. A grande lacuna existente entre o rendimento médio obtido em lavouras, e o que é verificado sob condições de alto manejo, pode ser atribuída a várias causas, como o uso de genótipos com baixo potencial de rendimento de grãos e/ou não adaptados á região de cultivo, aplicação de baixas doses de fertilizantes, época de semeadura imprópria e escolha inadequada do arranjo de plantas (SANGOI, 2010).

O milho é originário das Américas e foi o principal alimento dos nativos americanos. É uma das principais espécies cultivadas no mundo, tendo sua produção voltada principalmente à alimentação animal (IBGE, 2007).

A idade estimada do milho é de 11 milhões de anos e o seu surgimento teria sido resultado de um evento de poliploidização que teria ocorrido após a divergência entre o sorgo e o milho sendo, portanto, considerado um poliplóide antigo (GAUT et al., 2000). Durante muitos anos, acreditava-se que este cereal era diplóide e que tinha evoluído por meio de seleção e através de recombinações entre genótipos. Entretanto, hoje existem evidências de que o milho possui origem alotetraplóide, com  $2n = 4x = 20$  cromossomos tendo seu número básico de cromossomos de  $x = 5$ . Três descobertas citológicas apóiam esta hipótese: 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).

O milho foi domesticado há mais de 8000 anos atrás e não é mais capaz de sobreviver em sua forma silvestre. A verdadeira

origem do milho ainda não foi completamente elucidada, porém existem alguns trabalhos indicando que seu genitor seja *Zea mays* ssp. *Mexicana* ou *Zea mays* ssp. *Parviglumis*, ambos conhecidos como teosintes. O entanto, esta poácea é tão diferente morfológicamente do milho, que por muito tempo foi classificada em um gênero separado. Entretanto, com os avanços dos estudos de genética e biologia molecular, atualmente há um consenso de que essas duas espécies são bastante próximas.

Estas espécies são suspeitas de terem originado o milho pela presença de alguns caracteres em comum, com o mesmo número de cromossomos ( $2n=20$ ) e ainda por serem capazes de se cruzarem resultando em descendentes férteis na  $F_1$ . Entretanto, a existência de barreiras em nível genético entre o milho e o teosinte, o que impediu o desenvolvimento da geração  $F_2$ . Contudo, quando a geração  $F_1$  é retrocruzada com o milho, são obtidos descendentes férteis.

Como o teosinte é uma planta silvestre e o milho é conhecido somente como uma espécie cultivada, a interpretação mais relevante é que o milho foi domesticado do teosinte. Provavelmente, as diferenças mais notáveis em suas morfologias foram resultados da seleção humana durante o processo de domesticação. A redução do tamanho de população durante a domesticação deveria ter causado uma diminuição na diversidade genética do milho em relação ao teosinte, sendo que dados de isoenzimas indicam uma perda de cerca de 25% da diversidade genética (DOEBLEY et al., 1990).

É importante ressaltar que a domesticação do milho contribuiu efetivamente com o seu desenvolvimento evolutivo, como se a ação humana tivesse, aos poucos, moldado ou, até mesmo,

construído uma espécie através da seleção de características importantes durante milhares de anos, o que resultou em uma espécie de grande importância econômica mundial, porém extremamente dependente do homem.

Segundo Parteniani e Campos (1999), o milho é botanicamente classificado como uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *mays*, portanto, taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. spp. *mays*, divergindo assim, de seu possível parente silvestre mais próximo, o teosinte (*Euchalaena*).

O milho possui a característica de monoecismo, ou seja, suas flores estão em inflorescências masculinas e femininas separadas na mesma planta. Esta característica garante que o milho seja uma planta de fecundação cruzada, seguindo os procedimentos de melhoramento de plantas alógamas (PARTENIANI e CAMPOS, 1999).

Em geral as plantas alógamas são em número superior ao de espécies autógamas. Isso pode ser entendido sob a perspectiva da evolução e da domesticação das espécies pelo homem. Ao contrário das espécies autógamas, as populações de espécies alógamas são caracterizadas pela grande heterogeneidade. Cada indivíduo na população é altamente heterozigoto e distinto dos demais. As alógamas são consideradas mais flexíveis, por gradativamente otimizarem sua frequência gênica para o ambiente onde são cultivadas. Outro aspecto distinto das alógamas é a significativa perda de vigor com a endogamia (BORÉM, 2001).

O melhoramento de plantas possui um papel fundamental para o aumento da produtividade e a maior adaptabilidade das espécies cultivadas. Nos primórdios da agricultura, quando os agricultores iniciaram a “domesticação” das espécies, selecionando os tipos mais desejáveis, o melhoramento realizado subjetivamente resultou nas primeiras mudanças gênicas dirigidas. Os resultados desses esforços primitivos contribuíram de forma decisiva para o processo evolucionário das espécies cultivadas. Com a descoberta do sexo no reino vegetal, a hibridação de tipos diferentes foi incorporada às técnicas de melhoramento. Todavia, foram os clássicos experimentos de Mendel que forneceram as bases para o entendimento e a manipulação da herdabilidade, visando ao melhoramento e ao desenvolvimento de novas variedades. Ainda hoje alguns melhoristas acreditam que o melhoramento depende quase exclusivamente da habilidade do cientista em detectar diferenças que possam ter importância econômica (BORÉM, 2001).

O melhoramento de plantas é a arte e a ciência de modificar geneticamente as plantas em benefício do homem. Como arte depende da intuição e das experiências passadas que são únicas de cada indivíduo. Apesar de todo o progresso nas tecnologias relacionadas ao melhoramento genético de plantas, a arte continua um componente muito importante para a carreira de sucesso e, que os melhores melhoristas são os melhores artistas e eles podem não ser os melhores geneticistas (FEDERIZZI, 1998).

Melhoramento de plantas é a ciência, arte, e negócios para as plantas para benefício humano. Como ciência melhora as plantas baseando-se em bases teóricas em empíricas dos conhecimentos de

genética. O conhecimento da genética das plantas permite ao melhorista uma base segura e objetiva para definir os melhores cruzamentos, quais os métodos de seleção utilizar e quais as progênies deverão permanecer no programa. Como arte o melhoramento de plantas, exige um julgamento subjetivo na concepção e implementação de um programa de melhoramento. A arte no melhoramento de plantas também envolve a percepção do melhorista, no que diz respeito aos quais progênies manter, ou quais descartar do programa, além de seleção das melhores cultivares. Como um negócio, o melhoramento de plantas requer um investimento de pessoas, dinheiro e tempo. O melhoramento tornou-se um negócio de desenvolvimento de cultivares de grandes culturas, e, além disso, passou de ser sem fins lucrativos, universidade e entidades governamentais para empresas privadas (BERNARDO, 2002).

## **2.2 Método genealógico no melhoramento**

O método genealógico, ou o método pedigree, é um dos mais usados no melhoramento vegetal. Pode ser resumido como um método de condução de populações segregantes obtidas, geralmente, a partir de um determinado cruzamento entre duas linhagens (obviamente homozigotas),  $P_1$  e  $P_2$  (Pinto, 1995). Este método foi inicialmente proposto por Hjalman Nilsson. Aproximadamente na mesma época, 1943, Louis de Vilmorin, citado por Allard (1971), usava seleção individual de plantas com teste de progênie, metodologia que deu origem ao método genealógico convencional,

que tem sido utilizado tanto no melhoramento de espécies autógamas quanto alógamas (BORÉM, 2001).

O princípio do método genealógico é a seleção individual de plantas na população segregantes, bem como a avaliação de cada progênie separadamente. O método dos indivíduos selecionados é avaliado pelo teste de progênie. Dessa forma, a seleção é praticada com base no genótipo dos indivíduos, ao contrário da seleção massal, que se baseia apenas no fenótipo das plantas selecionadas (BORÉM, 2001).

Para a escolha dos parentais ( $P_1$  e  $P_2$ ) deve ser feita de tal forma que ocorra uma combinação dos caracteres desejáveis na população  $F_2$  que se pretende ter. Esta população ( $F_2$ ) deve ser conduzida em condições representativas de cultivo, utilizando, porém, um espaçamento ligeiramente maior, para possibilitar a avaliação individual de plantas. As plantas fenotipicamente superiores são selecionadas e colhidas separadamente. Cada planta  $F_2$  selecionada é conduzida em uma fileira na geração  $F_3$  (BORÉM, 2001). A precisão da seleção na geração  $F_2$  é diminuída por dois fatores: o plantio espaçado favorece a interação genótipo-ambiente, e parte do que é selecionado deve-se ao que resta da heterose (por ainda haver heterozigose geradora de dominância e vigor híbrido). A seleção de heterozigose é de certa forma inútil, pois tal heterozigose será perdida nas gerações seguintes (PINTO, 1995).

As linhas  $F_{2:3}$  são avaliadas durante o ciclo da espécie e aquelas consideradas superiores, submetidas à seleção individual de plantas por ocasião da maturação. Cada planta  $F_3$  selecionada é conduzida em uma fileira na geração  $F_4$ , e, à semelhança do

procedimento na geração anterior, as linhas  $F_{3:4}$  considerados superiores são submetidas à seleção individual. Esse procedimento de seleção das melhores linhas e, dentro dessas, das melhores plantas é repetido nas gerações seguintes até que o nível de homozigose desejado seja obtido. Cada geração deve ser conduzida em região e época de plantio representativas do ambiente onde se cultivará a nova variedade (BORÉM, 2001).

Uma das principais características deste método é o registro da genealogia de cada linha, que permite estabelecer o grau de parentesco entre as linhas selecionadas. O registro inicia-se com a numeração de cada planta  $F_2$  selecionada. O princípio deste método é que a seleção com teste de progênie e o conhecimento da genealogia dos tipos selecionados permitem a maximização da eficiência da seleção. Por exemplo, após as linhagens atingirem elevado grau de homozigose, aquelas que apresentam ancestral comum a uma ou duas gerações anteriores devem ser consideradas geneticamente semelhantes e apenas uma delas deve ser preservada para avaliações futuras (BORÉM, 2001).

A variabilidade genética na população segregante modifica-se com as gerações de autofecundação. A variância genética aditiva em uma população sem seleção aumenta entre linhas, sendo, contudo reduzida dentro das linhas. A variância genética aditiva, em termos relativos, entre plantas  $F_2$  e entre linhas  $F_{2:3}$  é igual a unidade. Essa variância entre linhas é maior que a variância genética aditiva dentro das linhas. Quanto maior a variabilidade genética, maior é o progresso com a seleção e, por isso, deve-se avaliar e selecionar grande número de plantas  $F_2$  (BORÉM, 2001).

A seleção entre fileiras é mais eficiente do que dentro, onde a variabilidade genética é menor. Com o avanço das gerações, a variabilidade genética aditiva é gradativamente exaurida dentro das linhas e a seleção dentro destas torna-se mais ineficiente. A seleção dentro de fileiras é justificável somente nas primeiras gerações de autofecundação, quando a variabilidade genética é ainda razoável (BORÉM, 2001).

Em função da interação genótipo-ambiente e da heterozigose residual serem muito grandes nas gerações iniciais ( $F_2$  e  $F_3$ ), não possível prever o rendimento, a altura ou qualquer outro tipo de fenótipo inerente a caracteres de baixa herdabilidade, em  $F_5$ - $F_7$ , a partir de dados de  $F_2$  ou  $F_3$  (PINTO, 1995).

No método genealógico, o conhecimento da cultura é fundamental, pois nas gerações segregantes ( $F_2$ ,  $F_3$ ,  $F_4$ ) as decisões devem ser feitas rápida e eficientemente entre centenas de indivíduos. O método genealógico permite ao melhorista exercer sua habilidade de fitotecnista na seleção em um grau maior do que em qualquer outro método (PINTO, 1995).

A maioria das definições de melhoramento inclui os termos “ciência e arte”. A avaliação visual e a seleção com base na inspeção de indivíduos estão mais associadas à “arte” do que à ciência do melhoramento. Diversos autores usam o termo “olho clínico” para caracterizar a habilidade do melhorista na avaliação fenotípica (BORÉM, 2001).

Durante as primeiras gerações de segregação, devem-se selecionar, principalmente, indivíduos com base nos caracteres mono ou oligogênicos. Com o avanço das gerações, a ênfase pode ser dada

às características um pouco mais complexas. Produtividade, entretanto, deve ser avaliada somente a partir da geração em que as linhagens expressam uniformidade genética (BORÉM, 2001).

### **2.3 Duplo-haplóides**

Uma alternativa disponível na cultura do milho para acelerar a obtenção de linhagens puras consiste na produção de linhagens homozigotas instantâneas pelo uso de haplóides duplicados, também conhecidos como duplo-haplóides (CHASE, 1952). A grande vantagem desse método consiste na diminuição do tempo para obtenção das linhagens homozigotas, após o cruzamento de um híbrido com um indutor de haploidia. Empresas de melhoramento genético de milho vêm trabalhando para aumentar a porcentagem de plantas haplóides geradas por esse tipo de cruzamento (SILVA et al., 2009).

Segundo Moraes-Fernandes et al. (1999), duplo-haplóide são plantas derivadas de seus gametas, portadoras de apenas um genoma, o qual é duplicado artificialmente, obtendo linhas totalmente homozigotas. Estas linhas são obtidas em apenas uma geração, ao invés de sete a nove necessárias através dos processos normais de melhoramento. Desta forma, a obtenção de germoplasma ou cultivares superiores em produtividade e/ou adaptação, é antecipada. O processo de seleção torna-se mais econômico e eficaz por causa da ausência das interações de dominância e recessividade. O tamanho da população requerida, para se ter a probabilidade de selecionar um genótipo qualquer, é a raiz quadrada do necessário pelos métodos

convencionais. Exemplificando, se os genitores diferirem por dois pares de genes, para se obter um genótipo homozigoto, é necessário uma população de pelo menos quatro plantas, se usar a haplodiploidização, ou seja, a raiz quadrada de 16 plantas necessárias para se ter a mesma probabilidade, quando usadas as populações de F<sub>2</sub> dos métodos convencionais de melhoramento.

Em um processo normal de autofecundação em espécies diplóides, considerando apenas dois pares de locos independentes segregando entre os genitores (AAbb) e (aaBB), o genótipo recessivo aabb tem a probabilidade de ser encontrado na proporção de 1/16 em uma população F<sub>2</sub>. Entretanto, na indução de haploidia, o mesmo genótipo terá a probabilidade de ocorrência de ¼ na população. Isso ocorre devido à ausência dos heterozigotos, prevalecendo apenas quatro genótipos homozigotos (AABB, AAbb, aBB e aabb). Com a obtenção de linhas homozigotas, a variância aditiva é maximizada, os efeitos de dominância são neutralizados e as vantagens na seleção de características quantitativas podem ser superiores, uma vez que é realizada somente com base na aditividade, não havendo interferência dos efeitos de dominância e epistasia (SILVA et al., 2002). No entanto, a maior vantagem desse processo está na redução significativa do tempo para a obtenção de linhagens endogâmicas (SILVA et al., 2009).

Dois processos para a produção de haplóides são utilizados: um é baseado em técnicas de cultura de tecido (*in vitro*) e o outro por meio da indução genética (*in vivo*). Como a cultura de anteras em milho tem se mostrado uma metodologia bastante complexa e cara, a opção mais comum tem sido pela indução genética

de haploidia e a posterior duplicação cromossômica. A indução *in vivo* baseia-se na utilização de linhagens indutoras de haplóides. A maioria dessas linhagens é derivada de duas linhagens temperadas, a Stock6, que gera haplóides gimnogenéticos, ou seja, de origem materna e a W23, que gera haplóides androgenéticos por meio de uma mutação no alelo do gene *IG*, produzindo o alelo *ig*, denominado de *gametófito indeterminado1* (KERMICLE, 1969).

A frequência de haplóides gerados com o sistema W23 (*ig1*) varia de 1 a 3% (KERMICLE, 1969, 1973). Já o sistema Stock6 possui uma frequência em torno de 3%, embora várias iniciativas tenham sido realizadas no intuito de aumentar essa frequência. Com o cruzamento da linhagem W23 com a linhagem Stock6 obteve-se a linhagem indutora WS14, com uma taxa de indução de 3 a 5%. Alguns autores obtiveram uma taxa de indução de 6% nos cruzamentos realizados (SILVA et al., 2009).

Os mecanismos moleculares da indução de haploidia em milho não foram totalmente compreendidos. Porém, para o caso de indutores gimnogenéticos, em que o indutor é o doador de pólen, há indícios de que, para a formação de linhagens haplóides, dois núcleos espermáticos são desenvolvidos com diferentes velocidades. Como resultado, um dos núcleos espermáticos atinge o estágio pronto para a fertilização, enquanto o outro não. A existência de somente um núcleo espermático normal em um grão de pólen pode ser a razão para a quebra da fertilização dupla e o desenvolvimento de sementes com embriões haplóides na espiga da planta que recebeu pólen de um indutor gimnogenético (SILVA et al., 2009).

O alelo recessivo do gene *gametófito indeterminado (ig1)* restringe o potencial embriogênico das células, produzindo, em alguns casos, somente o genoma de um dos dois parentais (KERMICLE, 1969). Esse alelo foi identificado como o causador de alterações significativas na estrutura dos embriões de milho (KERMICLE, 1969). Foi observado que a presença do alelo *ig1* permite a ocorrência de um número variável de divisões mitóticas, resultando em um saco embrionário com 16 núcleos ou mais, em vez dos oito núcleos observados normalmente. Como resultado dessas divisões mitóticas adicionais, o indivíduo mutante que apresenta o alelo *ig1* exibe heterofertilização, poliembrionia e variação no nível de haploidia do endosperma depois da fertilização.

Algumas características são atribuídas à interferência do alelo *ig1*, como sinergia múltipla no saco embrionário, oócitos múltiplos e várias células centrais. Essa mutação afeta também a migração nuclear e a diferenciação celular. No saco embrionário do mutante *ig1*, a fase proliferativa é prolongada, sugerindo que a função do alelo selvagem *ig1* promova uma interrupção na proliferação da diferenciação no saco embrionário (LIN, 1981).

O mutante *ig1* não condiciona um processo em particular; a sua interferência ocorre anteriormente à formação do saco embrionário e altera a atividade de outros genes durante a formação deste. Portanto, seus efeitos pleiotrópicos parecem ser independentes, não tendo relações uns com os outros. O gene *ig1* está localizado no braço longo do cromossomo três do milho. Segundo Evans (2007), o gene *ig1* é amplamente expresso em uma variedade de tecidos em milho, como folhas, primórdios foliares, espigas imaturas, pendão

imaturado, cabelo e palha jovem. O gene *igl* apresenta baixa expressão no endosperma, em raízes e grãos de pólen maduro e se expressa em várias partes florais, nos diferentes estágios de desenvolvimento.

As sementes de milho que sofrem a interferência do gene *igl*, e são consideradas haplóides, precisam ser identificadas ainda no estágio embrionário para viabilizar o processo de duplicação cromossômica. Com o objetivo de identificar as sementes haplóides, um sistema de marcador fenotípico baseado na pigmentação por antocianina determinado pelo gene R-navajo (*RI-nj*), foi desenvolvido. Esse gene controla a pigmentação do endosperma e do embrião, como um marcador dominante derivado da fonte indutora. Como o endosperma é triploide, o marcador irá se expressar em qualquer tipo de cruzamento. Mas como um embrião haploide não possui a contribuição do genoma da linhagem indutora, que possui o alelo R-navajo, o marcador não irá se expressar. Assim, as sementes com a pigmentação púrpura do endosperma e a não pigmentação do embrião podem ser selecionadas como possíveis haplóides (SILVA et al., 2009).

No entanto, a expressão desse gene é bastante influenciada pelo background genético e pelo processo de maturação da semente, além da existência de genes dominantes (*C1-I*, *C2-Idf* e *In1-ID*) que inibem a síntese de antocianina. Tais fatores dificultam a identificação precoce de genótipos haplóides, limitando a ampla aplicação dessa metodologia em programas de melhoramento.

Após a obtenção e a identificação de plantas haplóides, ainda é necessário que seja feito um tratamento, durante a fase de plântula, para duplicar o número de cromossomos e restabelecer a

fertilidade das plantas. Para isso, alguns métodos foram desenvolvidos e consistem basicamente em emergir a plântula em uma solução de colchicina (DEIMLING et al., 1997). A colchicina atua na desorganização das fibras do fuso durante a metáfase celular, impedindo a sua formação e a conseqüente disjunção dos cromossomos, resultando na duplicação dos cromossomos (SILVA et al., 2009).

Trabalhos em andamento na Embrapa Milho e Sorgo vêm tentando compreender os mecanismos de indução de haplóides androgenéticos em milho, com a utilização do gene *gametófito indeterminado*, assim como a incorporação do gene *ig1* e o gene *R1-nj* em linhagens de milho tropicais do programa de melhoramento, para posterior utilização como uma linhagem indutora de haplóides androgenéticos.

Indivíduos na condição de haplóides não tem uso prático, nos programas de melhoramento, tornando-se necessário restaurar a condição cromossômica normal da espécie, o que pode ocorrer naturalmente ou de forma induzida. Plantas resultantes desse processo são denominadas duplo-haplóides (SILVA et al., 2009).

No caso do milho, a indução à haploidia é feita com o cruzamento de um indutor da mesma espécie (RWS). Após ser polinizada por uma linhagem doadora de pólen, são produzidos grãos com embrião haplóide de origem maternal pura e com endosperma triplóide ( $2n = 3x = 30$ ). Alguns indutores carregam consigo marcadores fenotípicos dominantes, com o gene *R1-nj* (Purple Embryo Marker), o que facilita a diferenciação das sementes e plantas haplóides pela avaliação visual, pois as plantas apresentam haste

vermelha e os grãos apresentam mancha roxa no endosperma e/ou embrião, característica favorável para sua utilização como indutor *in vivo* (DEIMILING et al., 1997).

Dentre as inúmeras vantagens da utilização de DH's, a mais significativa é a redução do tempo necessário para o processo de obtenção de novos genótipos homozigotos. A obtenção de plantas totalmente homozigotas após a duplicação, elimina as interações de dominância e recessividade, pela ausência da heterozigose. Ganho de tempo na pesquisa, antecipação de ganhos econômicos são resultados da obtenção de germoplasma ou de cultivares mais produtivos. Também são vantagens o aumento na eficiência da seleção e economia dos espaços nos campos experimentais (MORAES-FERNANDES, 2002).

Melchinger et al. (2005) citam que DH's são considerados uma alternativa atrativa para seleção recorrente em alógamas, como no caso o milho. Em um trabalho realizado na University of Hohenheim, Alemanha, os autores testaram o cruzamento de DH's com um testador e populações de  $F_1$ ,  $F_2$  e  $F_3$  cruzadas com testador. Em três anos de testes, os duplos haplóides obtiveram um ganho de seleção de 27% superior se comparado aos DH.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BORÉM, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: UFV, 1998. 817p.

BORÉM, Aluízio. *Melhoramento de plantas*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2001. 5000p.

DEIMLING S, RÖBER F, GEIGER HH. Methodik und genetic der in-vivo- haploideninduktion bei Mais. *Vortrage für Pflanzenzüchtung* 38:203-204.1997

DOEBLEY, J.F.; STEC, J.; WENDEL, A.; EDWARDS, M. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F<sub>2</sub> population: implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 9888-9892. 1990.

FERNANDES, M. I. at al., Haploidização genética e melhoramento. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vol.2, Brasília: Embrapa, 1999. p 613-650

KERMICLE, J. L. Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science*, Washington, v. 166, n. 3911, p. 1422-1424, 1969.

LIN, B. Y. Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. *Revista Brasileira de Biologia*, São Paulo, v. 41, p. 557-563, 1981.

SILVA, G. J., et al, Produçãode haplóides androgenéticos em milho. *Embrapa Milho e Sorgo*, 17 p., 2009.

PINTO, R. J. B., *Introdução ao Melhoramento Genético de Plantas*. EDUEM, Maringá, 275 p.,1995.

## CAPÍTULO I

### SELEÇÃO DE GENÓTIPOS ELITES DE MILHO EM COMBINAÇÕES HÍBRIDAS PELOS MÉTODOS GENEALÓGICO E DUPLO-HAPLÓIDE

ANDERSON LUIZ VERZEGNAZZI<sup>1</sup>, MAGALI F. GRANDO<sup>2</sup> E  
SANDRA C. K. MILACH<sup>3</sup>

**RESUMO** – A tecnologia de duplo-haplóide (DH) para obtenção de linhas homozigotas tem sido cada vez mais usada nos programas de melhoramento de milho (*Zea mays* L.) para produção de híbridos comerciais. Com a melhoria e evolução das técnicas de obtenção de linhas DH's, vários estudos vêm sendo realizados para avaliar a eficiência do método e a eficácia da sua utilização dentro dos programas, principalmente comparando com outros métodos. Os objetivos deste trabalho foram comparar o método genealógico e o de duplo-haplóide na identificação e seleção de linhas superiores de milho para a produção de híbridos de alto rendimento de grãos e que combinem rendimento de grãos com baixa altura de planta e espiga; e

---

<sup>1</sup> Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, Ph.D. em Agronomia com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, Professora do Curso de Agronomia (FAMV) e Ciências Biológicas (ICB) da UPF e PPGAgro, FAMV/UPF.

<sup>3</sup> Co-orientadora, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador Sênior Pioneer Sementes Ltda.

estimar o ganho genético e a herdabilidade de cinco populações de milho obtidas por ambos os métodos. A partir de cinco populações F<sub>2</sub> de milho provenientes de oito linhagens e dois grupos heteróticos foram obtidas linhas F<sub>3</sub> pelo método genealógico e DH pelo método duplo-haplóide. Estas linhas F<sub>3</sub> e DH foram avaliadas em combinações híbridas para rendimento de grãos, umidade de colheita, altura de planta e espiga, calculado o ganho genético e a herdabilidade para uma pressão de seleção de 5%. Não houve diferença entre os métodos genealógico e DH na identificação de linhas superiores quanto ao rendimento de grãos em combinações híbridas. Para características de herdabilidade moderada a alta como altura de planta e espiga, o método DH pode apresentar vantagens sobre o genealógico.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, herdabilidade, ganho genético, altura de planta, altura de espiga e melhoramento de milho.

#### **SELECTION OF ELITE MAIZE GENOTYPES DEVELOPED BY PEDIGREE X DOUBLED HAPLOID METHODS**

**ABSTRACT** – The double haploid technology (DH) to obtain homozygous lines has been increasingly used in corn (*Zea mays* L.) commercial breeding programs. With the improvement and development of techniques to obtain DH lines, several studies have been conducted to evaluate its efficacy and effectiveness for breeding compared to other methods. Our objective was to compare the

pedigree and the double-haploid methods to identify and select superior corn lines in hybrids that produce high grain yield and combining yield with low plant height and ear insertion, comparing the genetic gain and heritability of five maize populations obtained by both methods. Five populations were generated from biparental crosses among eight inbred lines belonging to two heterotic groups. F<sub>3</sub> lines obtained by the pedigree method and DH lines from the doubled haploid method were evaluated in hybrid combinations for grain yield, moisture, plant height and ear insertion and the genetic gain and heritability calculated for a 5% selection pressure. No differences were observed for the pedigree versus the DH method for the ability to identify and select the best hybrid combinations. For moderate to high heritability traits as plant height and ear insertion, the DH method had higher heritabilities and genetic gain and may present advantages over the pedigree method.

**Key words:** *Zea mays* L., heritability, genetic gain, plant height, ear insertion and corn breeding.

## 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de duplo-haplóide (DH) para obtenção de linhas homozigotas tem sido cada vez mais empregada nos programas de melhoramento de milho (*Zea mays* L.) para produção de híbridos comerciais (MAYOR e BERNARDO, 2009a; WEGENAST et al., 2010). Desde a década de 1990, o progresso das técnicas para obtenção de haplóides via gimnogênese em milho, com a utilização de

um genótipo indutor, vem propiciando a produção de um número elevado de linhas duplo-haplóides, permitindo o seu uso em germoplasma elite, variedades crioulas, além de materiais temperados e tropicais (BELICUAS et al., 2007; GEIGER e GORDILLO, 2009; WILDE et al., 2010).

Entre as inúmeras vantagens da utilização de linhas DH em relação às de autofecundação obtidas por outros métodos de melhoramento de milho, Geiger e Gordillo (2009) destacam entre outros: (i) a máxima variância genética entre linhas para desempenho *per se* e em híbridos testcross, (ii) completa homozigose das linhas para caracterização e proteção varietal, (iii) diminuição do tempo para lançamento de híbridos no mercado, (iv) simplificação da logística do programa, e (v) maior eficiência na seleção assistida por marcadores moleculares.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para otimizar o uso de linhas DHs dentro dos programas de melhoramento de milho e para investigar a efetividade desse método comparado a outros para a obtenção de linhagens (BORDES et al., 2006 e 2007; MAYOR e BERNARDO, 2009a e 2009b; GEIGER e GORDILLO, 2009). Em um trabalho pioneiro, Seitz (2005) comparou o desempenho de *test crosses* (TCs) provenientes de DH versus SSD (single seed descent = descendência de semente única) e concluiu que a variação obtida para desempenho dos híbridos e *per se* era a mesma. Outro estudo comparou o método SSD com o duplo-haplóide, ambos partindo de famílias em F<sub>2</sub> (BORDES et al., 2007). Os autores verificaram que a variância genética observada foi similar entre híbridos provenientes de testcross (TC) pelos dois métodos DH e SSD para características

como rendimento de grãos, umidade de colheita, altura de planta e espiga e comprimento de folha. Além disso, as médias das populações não diferiram estatisticamente e as herdabilidades ( $h^2$ ) obtidas a partir de linhas DH e SSD foram, aproximadamente, iguais para todas as características avaliadas. Esses resultados revelaram que a tecnologia de DH permitiu a produção de linhagens com variação semelhante às oriundas de autofecundação e, que o processo de indução e duplicação para obtenção de DHs, não afetou a variação genética para importantes características agronômicas.

Em outro estudo recente, 80 linhas DH foram cruzadas com duas linhagens crioulas européias de milho e uma linhagem elite, para produção de TCs para quantificação da variação genética (WILDE et. al., 2010). As médias de rendimento de grãos das três populações não diferiram significativamente, indicando que a tecnologia DH pode ser considerada eficaz para o acesso a diversidade genética de populações crioulas de milho, abrindo novos caminhos para o melhoramento genético da cultura.

Avaliando a tecnologia DH em outros *pools* gênicos, Belicuas et al. (2007), verificaram, pela primeira vez, a possibilidade da utilização dessa tecnologia em germoplasma tropical, concluindo que utilização desta tecnologia neste tipo de germoplasma, rendeu haplóides em taxas equivalentes àquelas obtidas em genótipos de clima temperado, apesar de algumas restrições impostas pelo ambiente.

Gallais e Bordes (2007) estimaram o ganho genético predito para diferentes esquemas de melhoramento de seleção recorrente (SR) com e sem o uso da tecnologia DH. Concluíram que

não haveria uma grande vantagem do uso de DHs para características de média a alta herdabilidade, porque o ganho genético por ano seria similar para DH e o método convencional de autofecundação, sendo que com DH levaria um ano a mais por ciclo. A vantagem do uso de DHs em seleção recorrente, baseado no ganho genético predito, contudo foi evidente para o esquema de três anos e características de baixa herdabilidade. Além disso, os autores concluem que o uso de DH seria vantajoso considerando a facilidade de manutenção e avanço de linhas fixas.

Em um estudo publicado um ano mais tarde, Gordillo e Geiger (2008a) chegaram a uma conclusão semelhante usando simulações e comparando esquemas de SR envolvendo um, dois ou três estágios de seleção de TCs provenientes de linhas DH. Salientam que o tempo necessário para cada ciclo, e o tamanho efetivo da população, são determinantes para maximizar o ganho genético com o uso de DHs. A variação genética de uma população pode ser reduzida rapidamente, necessitando assim manter um número adequado de indivíduos na população para não comprometer o ganho genético (GEIGER e GORDILLO, 2009).

Smith et al. (2008) examinaram com dados genotípicos progênies fixas obtidas pelos métodos de DH e SSD. Observaram que indivíduos DH possuíam 88,4% de constituição parental, em comparação a 73% das progênies de linhas fixas obtidas por SSD. Concluíram que houve menos recombinação genética em progênies DH comparada às de SSD.

Através de um trabalho de simulação, Mayor e Bernardo (2009a) utilizaram seleção assistida por marcadores (MARS- Marker

Assisted Recurrent Selection) para comparar o método de seleção recorrente (SR) versus DH em populações de  $F_2$ . Os resultados indicaram que as populações DH são úteis para seleção genotípica, com a utilização de MARS para características controladas por muitos QTLS (Quantitative Traits Loci) de baixa herdabilidade.

Apesar de vários trabalhos indicarem a eficiência do uso de DHs dentro dos programas de melhoramento, inclusive para identificação de linhas superiores, algumas questões ainda persistem sobre a possibilidade do efeito do processo de produção de duplo-haplóides na variabilidade genética para características agronômicas importantes.

O método genealógico com a utilização de TCs para identificação de linhas superiores na geração  $F_3$  é atualmente o mais usado no melhoramento de milho, principalmente no ambientes tropicais. Contudo, este método vem sendo substituído pela utilização direta de linhas DH, oriundas de populações nas gerações  $F_1$  ou  $F_2$ . Essa utilização de linhas DH's nos programas de melhoramento vem trazendo uma série de questionamentos que precisam ser melhor compreendidos como: 1) se a variação genética é expressa fenotipicamente de forma similar para linhas DH e de autofecundação; 2) ganho de seleção em populações DH é o mesmo do que populações de autofecundação; 3) a capacidade de detectar linhas superiores pela análise de combinações híbridas em testcross é a mesma com ou sem o uso de DHs.

As respostas para estas perguntas vão ajudar na resolução de outros questionamentos relacionados à manutenção de métodos convencionais de melhoramento pelo melhorista, se utilizar

parcialmente o método DH ou, ainda, a possibilidade de adotar um programa 100% duplo-haplóide. Para isso, ambos os métodos devem ser comparados, analisando suas vantagens e desvantagens dentro de cada programa e, tratando-se de um programa de melhoramento de milho, compará-los no produto final que é o híbrido. Estas informações serão úteis, para que os programas possam definir as melhores estratégias de melhoramento e produção de híbridos de forma rápida, preservando a variabilidade genética do programa, ganhos genéticos e produção de linhas superiores.

Para responder a estes questionamentos foi desenvolvido um estudo a campo, utilizando populações de milho geradas a partir de linhagens do programa de melhoramento da Du Pont do Brasil – divisão Pioneer Sementes Ltda. Desta forma, este estudo tem por objetivos comparar dois métodos de melhoramento, o genealógico e o de duplo-haplóide, para geração de linhas superiores de *Zea mays* L. que produzam híbridos de alto rendimento de grãos, precoces e que combinem rendimento de grãos com precocidade, baixa altura de planta e espiga; e comparar o ganho genético e a herdabilidade de cinco populações de milho obtidas por ambos os métodos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Centro de Pesquisa de milho da Du Pont do Brasil – Divisão Pioneer Sementes Ltda., localizada na RS 135, km 17 no município de Coxilha – RS, na região fisiográfica do Planalto Médio do Rio Grande do Sul, com uma altitude de 700m, definida pelas coordenadas 28° 12' de latitude Sul e 52° 19' de

longitude Oeste. Além da estação de pesquisa em Coxilha, os experimentos de híbridos (testcross) foram conduzidos nos municípios Condor (550 m de altitude, 29° 09' de latitude Sul e 53° 44' de longitude Oeste), Cruz Alta (550 m de altitude, 28° 66' de latitude Sul e 53° 42' de longitude Oeste) e Carazinho (600 m de altitude, 29° 28' de latitude Sul e 52° 85' de longitude Oeste), todos no estado do Rio Grande do Sul.

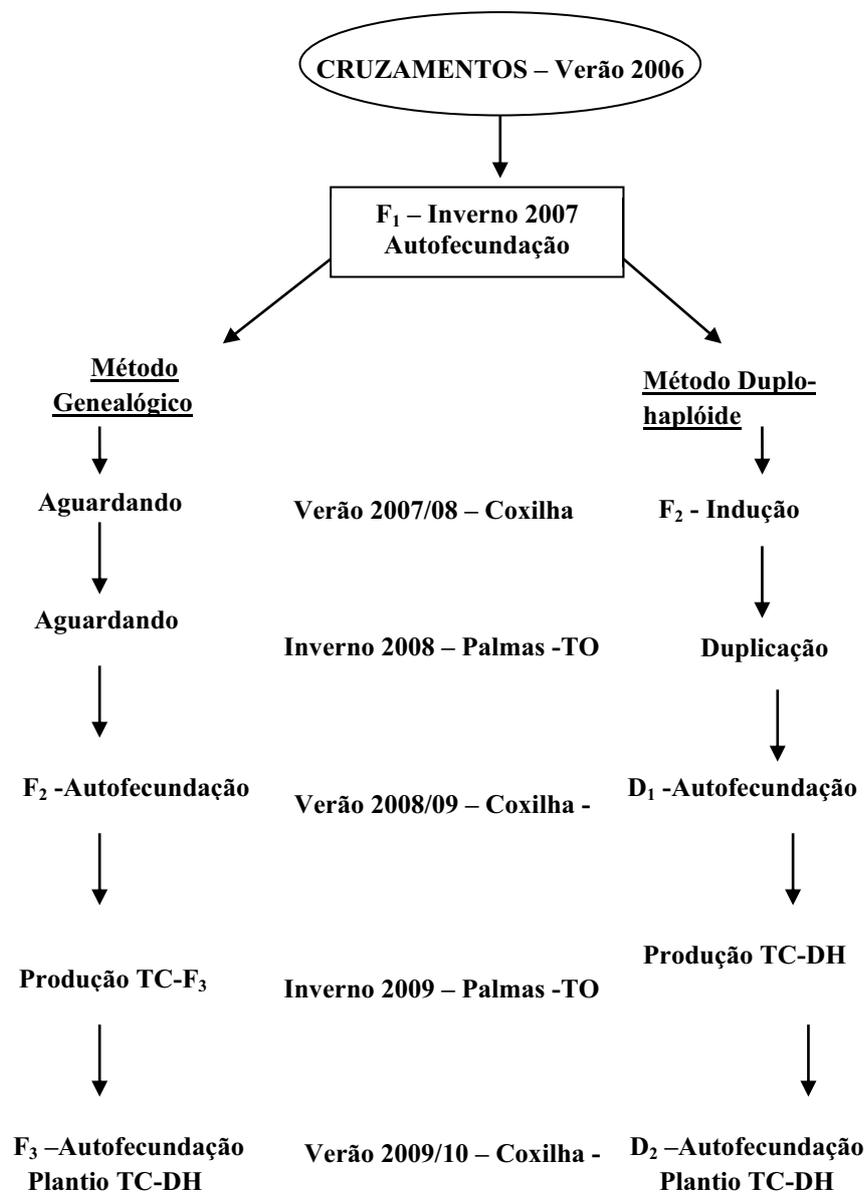
As sementeiras dos quatro anos de ensaios foram realizadas sobre o resto cultural de aveia-preta (*Avena strigosa*). O manejo foi feito com aplicação de herbicida glifosato (Roundup 2,5 l/ha), aplicando vinte dias antes da sementeira dos ensaios. A sementeira utilizada para o plantio foi um John Deere modelo CT 909, modificada para sementeira de parcelas. A adubação do solo, nas linhas de sementeira, foi feita com 20 Kg de N/ha, 100 Kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha e 100 de K<sub>2</sub>O/ha (400 Kg/ha da fórmula 05-25-25). A adubação nitrogenada foi incorporada ao solo com 300 Kg ha de uréia cloretada da fórmula 36-00-18. Esta aplicação foi dividida em dois estádios, o primeiro no estádio V2 (duas folhas totalmente expandidas) e o segundo em V4 (quatro folhas totalmente expandidas). O controle de plantas daninhas foi realizado com pulverizações aéreas, com um pulverizador Jacto 600 litros, aplicando um volume de calda de 200 l/ha do herbicida atrazina (Atrazina 5,0 l/ha). O controle de insetos e demais pragas da parte foliar foi feito com o inseticida metomil (Lannate 0,6 L/ha).

Para a elaboração do projeto foram utilizadas oito linhagens homozigotas do banco de germoplasma da Pioneer Sementes Ltda. Destas, cinco linhagens pertencem ao grupo

heteróticos SSS (Stiff Stalk Synthetic - fêmeas), denominadas A, B, C, D e E, e três pertencem ao grupo heteróticos NSS (Non Stiff Stalk - macho), denominadas F, G e H. Estas linhagens foram cruzadas dentro de seus grupos para o desenvolvimento de cinco populações, três do grupo heterótico SSS (AxB, AxC, Dx E) e duas do NSS (FxG e FxH).

Os cruzamentos para o desenvolvimento das populações foram realizados no mês de dezembro de 2006, na Estação Pesquisa da Pioneer Sementes em Coxilha-RS. Após a colheita (março/2007) estas sementes foram levadas para Palmas – TO na Estação de Pesquisa da Pioneer Sementes, onde foram plantadas em uma linha de cada para a produção dos F<sub>1</sub>s. Cinco espigas de cada cruzamento foram colhidas em “bulk” para formar as populações na geração F<sub>2</sub> (Figura1).

A Figura 1 esquematiza o processo de obtenção e condução das populações F<sub>2</sub> pelos métodos genealógico e DH para avaliação em combinações híbridas pelo testcross.



**Figura 1:** Esquema de obtenção de cinco populações F<sub>2</sub> e subseqüentes gerações provenientes de oito linhagens de milho através dos métodos genealógico e duplo-haplóide.

As populações na geração  $F_2$  foram plantadas na Estação de Pesquisa de Coxilha – RS, em setembro de 2007, para indução da haploidia. Esse processo foi feito com um indutor da mesma espécie, ou seja, um híbrido de milho proveniente do cruzamento de linhagens com origem (RWS) (CHASE, 1969). Estas linhagens RWS carregam um marcador fenotípico dominante (Antocianina) que confere a cor púrpura ao grão (no embrião e endosperma) que permite a separação de sementes haplóides e diplóides. As sementes com ambos, endosperma e embrião, coloridos são provenientes de um cruzamento normal, portanto diplóides e devem ser eliminadas. As sementes com endosperma colorido e o embrião normal (sem cor púrpura), eram as haplóides e foram mantidas para a fase seguinte de duplicação.

As espigas induzidas foram colhidas e levadas para a Estação de Pesquisa de Palmas – TO, onde foi feita a separação dos grãos haplóide dos diplóides, através de identificação visual. Feita a identificação dos grãos haplóides, estes foram submetidos ao processo de duplicação cromossômica com uso de colchicina (DEIMLING et al., 1997). Após a duplicação, as sementes duplo-haplóides (DH), na primeira geração chamada  $D_1$ , foram novamente enviadas para a Estação de Pesquisa de Coxilha, onde foram plantadas no mês de setembro de 2008. Na mesma época, também foi realizado novamente o plantio das populações de  $F_2$ , 16 linhas cada em parcelas de 4,2 metros, para autofecundação e avanço para a geração  $F_3$ . As linhas DH- $D_1$  igualmente foram autofecundadas para multiplicação de sementes e obtenção da geração DH- $D_2$ . As demais gerações, nos dois anos de plantio, seguiram população similar de plantas, variando o número de linhas de cada geração e população conforme Tabela 1.

**Tabela 1:** Números de indivíduos ou linhas para cinco populações de milho nas gerações F1, F2, F3, D1 e D2 utilizadas neste estudo

População	Cruzamento	GH	Indivíduos		Linhas		
			F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
1	AxB	SSS	22	227	74	133	74
2	AxC	SSS	22	221	52	139	49
3	DxE	SSS	22	334	99	193	159
4	FxG	NSS	22	219	65	151	77
5	FxH	NSS	22	260	90	135	95

GH= grupo heterótico

As avaliações de altura de planta e espiga foram feitas para as gerações F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> e DH-D<sub>2</sub> a campo. No primeiro caso, utilizou-se uma régua de três metros de comprimento, medindo-se a base da planta até a extremidade do pendão. Para a altura de espiga fez as medições até a base da inserção da espiga. Nas populações de F<sub>2</sub>, as medições foram feitas em todas as plantas da família no verão de 2008 em Coxilha, registradas separadamente para posterior estudo da herdabilidade pai-progênie com as linhas avançadas para a geração F<sub>3</sub>. Para as linhas nas gerações F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> e DH-D<sub>2</sub> foram medidas cinco plantas em cada linha para obtenção da média, sendo DH-D<sub>1</sub> feita no verão de 2008, e as demais no verão de 2009 em Coxilha.

Baseada em características fenotípicas, foi feita uma seleção das melhores plantas das populações F<sub>2</sub>, para formarem a geração F<sub>3</sub> e das melhores linhas da geração DH-D<sub>1</sub> para obtenção da DH-D<sub>2</sub>. A seleção foi feita para se obter um número semelhante de linhas F<sub>3</sub> e DH-D<sub>2</sub> para cada população com um mínimo de 50 linhas de cada na geração seguinte. Isso significou uma pressão de seleção de

em torno de 25% de  $F_2$  para  $F_3$  e de 50% de  $DH-D_1$  para  $DH-D_2$ . A pressão de seleção real de  $F_2$  até  $DH-D_2$  foi maior que 50% uma vez que alguma seleção foi feita na geração de indução em  $F_2$ .

Tanto as sementes da geração  $F_3$  como das linhas  $DH$ , foram semeadas na Estação Pesquisa de Palmas – TO, em abril de 2009, para serem cruzadas com um testador de alta capacidade combinatória do grupo heterótico oposto, que no caso foi uma linhagem fixa com presença do gene Bt YieldGard, para a obtenção dos híbridos (testcross). A colheita das sementes destes híbridos foi realizada em agosto de 2009 (Tabela 1).

Os híbridos  $TC-F_3$  e  $TC-DH$  foram semeados no mês de setembro de 2009, em três locais diferentes do estado do Rio Grande do Sul, Condor (29° 09' de latitude Sul e 53° 44' de longitude Oeste) Cruz Alta (28° 66' de latitude Sul e 53° 42' de longitude Oeste) e Carazinho (29° 28' de latitude Sul e 52° 85' de longitude Oeste) para avaliações de altura de planta e espiga, rendimento de grãos e umidade de colheita. Os híbridos foram plantados em experimentos completamente casualizados com uma repetição por local em parcelas de duas linhas com 4,2 metros de comprimento, tendo após o desbaste uma população final de 78 mil plantas por hectare. As testemunhas, que foram os híbridos comerciais da Pioneer Sementes 32R48, 32R48Y, 30F53 e 30F53Y, foram semeadas de forma repetida nas diagonais dos experimentos em todo o campo experimental.

Tanto nos híbridos  $TC-F_3$  como nos  $TC-DH$ , foram coletados dados de altura de planta e espiga. A coleta de dados foi feita com auxílio de uma régua de 3 m, sendo que foram medidas cinco plantas por parcelas para obtenção da média. A colheita dos

híbridos foi realizada com uma colheitadeira Jonh Deer 1465, adaptada para a colheita de parcelas. Esta colheitadeira possui um sistema eletrônico para medição do peso e umidade de grãos e armazena todos os dados coletados de cada parcela. O peso da parcela obtido foi convertido em kg/ha considerando a área colhida e corrigindo para uma umidade de 13% de umidade do grão para todos os materiais.

A análise de variância e a comparação das médias pelo teste Tukey Kramer ( $\alpha=0,05$ ) foram feitas para todas as características avaliadas, utilizando-se o pacote estatístico de análise de dados CoStat (COSTA e CASTOLDI, 2009).

Os parâmetros de herdabilidade ( $h^2$ ), diferencial de seleção (DS) e ganho genético (GG) foram estimados para uma intensidade de seleção de 5% de acordo com Allard (1960):

$$h^2 = VG/VP, \text{ onde } h^2 = \text{herdabilidade}$$

$$VG = VP - VE \quad VP = \text{variância fenotípica}$$

$$VG = \text{variância genotípica} \quad VE = \text{variância ambiental}$$

A variância ambiental (VE) foi estimada pela variância dos híbridos comerciais da Pioneer Sementes 30F53, 30F53Y, 32R48 e 32R48Y, plantados nas diagonais dos ensaios como testemunhas. A variância de cada um desses híbridos foi calculada e observou-se uma variância muito mais alta para os híbridos convencionais (não YieldGard) e também para o 32R48Y, que apesar de ser YieldGard é um híbrido de maior susceptibilidade a insetos. Desta forma, para não superestimar a variância ambiental, grandemente influenciada pelo

ataque desuniforme por insetos nas áreas, elegeu-se a variância do híbrido 30F53Y para estimar a variância ambiental. Acredita-se que essa retrata com maior proximidade a variância ambiental no qual os ensaios de híbridos testcross aqui avaliados foram submetidos, uma vez que os testadores também eram portadores do gene Bt.

O ganho de seleção foi calculado pela seguinte fórmula segundo Allard (1960):

$$GS = DS \times h^2, \text{ onde } DS = \text{diferencial de seleção.}$$

O diferencial de seleção (DS) foi calculado desta forma:

$$DS = \text{média dos 5\% selecionados} - \text{média do cruzamento.}$$

### **3 RESULTADOS**

A análise de variância para rendimento de grãos mostrou diferenças significativas ( $P > 0,01$ ) entre as cinco populações avaliadas e entre os grupos heteróticos (Tabela 2). Contudo, não houve diferenças significativas quando comparados os métodos  $F_3$  e DH para a obtenção das linhas que deram origem aos híbridos testados. Também não houve interação significativa entre as populações e os métodos de desenvolvimento das linhagens, indicando que os genótipos interferiram mais que os métodos para os resultados obtidos.

Para características de herdabilidade moderada à alta, como umidade de colheita, altura de planta e espiga, a análise de variância mostrou significância estatística para populações, métodos, interação população x método e grupo heterótico. Isso demonstra que

para essas características pode haver diferenças entre a obtenção de linhas homozigotas através do método genealógico comparado ao duplo-haplóide (Tabela 2).

**Tabela 2:** Análise de variâncias para rendimento de grãos, umidade de colheita, altura de planta e espiga de cinco populações pertencentes a dois grupos heteróticos e obtidas pelos métodos genealógico e duplo-haplóide avaliadas em combinações híbridas

C.V	GL	Rendimento de Grãos		Umidade Colheita		Altura de Planta		Altura da Espiga	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Blocos	2	210000	118*	4217	2786*	50184	574*	149	2*
População	4	28449	16*	2026	1339*	10504	120*	39	70*
Método	1	9	0 ns	65	43*	4726	54*	16	29*
Pop x Mét.	4	353	2 ns	2	1 ns	314	4*	39	70*
Grupo Het.	1	56167	32*	9	6*	18079	200*	419	7*
Erro	1898	1751		1		87		55	
CV %		11.8		5.7		3.83		7.48	

\* Significativo a 5% de probabilidade ns = não significativo a 5% de probabilidade,  $\alpha$  QM x 1000

Para rendimento de grãos, a diferença entre os híbridos TC-DH e TC-F<sub>3</sub> não foi significativa, havendo apenas uma diferença de 7.9 kg entre as médias dos mesmos. Para umidade de colheita também houve diferenças significativas, onde os híbridos TC-F<sub>3</sub> foram colhidos com umidade menor. Para as características altura de planta e espiga houve diferenças significativas, sendo os híbridos TC-DH mais baixos que os TC-F<sub>3</sub> (Tabela 3). É possível que o nível de heteroziguidade das linhas F<sub>3</sub> que originaram os respectivos híbridos tenha levado a esse resultado, uma vez que no caso de híbridos TC-DH as linhas que os geraram eram homozigotas, devido à duplicação cromossômica (Tabela 3).

Quando comparadas entre si, a População 5 do grupo heterótico dos NSS-macho foi a que obteve maior rendimento de grãos de 11570 Kg/ha, ou seja 727 kg/ha ou 6.7% maior comparada com as Populações 1 e 2 que obtiveram os menores rendimentos (10964 e 10843 Kg/ha respectivamente).

Para as características altura de planta e espiga, houve variação significativa entre as médias das populações e a População 4 destacou-se como a mais baixa para ambas as características (Tabela 3). Para umidade de colheita, as populações do grupo SSS tiveram umidades menores, isso é explicado porque o testador usado para a obtenção dos testcross deste grupo é bem mais precoce do que o usado para grupo das NSS (Tabela 3).

Na comparação do grupo heterótico, o grupo NSS, obteve na média um rendimento de grãos superior em 347,7 Kg (3%) ao do grupo SSS (Tabela 3).

**Tabela 3:** Comparação de médias de cinco populações de milho em testcross para rendimento de grãos, altura de planta e espiga e umidade de colheita para os métodos, populações e grupo heterótico

Método	Rendimento de grãos (Kg/ha)	Umidade de colheita (%)	Altura de planta (cm)	Altura de Espiga (cm)
DH	11208	a	21,7	b
F <sub>3</sub>	11200	a	21,4	a
<b>Populações</b>				
5	11570	a	23,7	d
3	11222	b	19,8	b
4	11178	b	24,3	e
2	10964	c	19,3	a
1	10843	c	20,3	c
<b>Grupo heterótico</b>				
NSS	11407	a	23,9	a
SSS	11059	b	19,3	b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey Kramer ( $\alpha=0,05$ )

O diferencial de seleção (DS) para rendimento de grãos obtido pela diferença entre a média dos híbridos 5% superiores em relação à média de todos os híbridos de uma determinada população variou conforme a população e o método utilizado (Tabela 4). O maior DS foi observado para a População 1 de híbridos produzidos a partir de linhas F<sub>3</sub> do método genealógico. Já para a População 5, o resultado foi ao contrário sendo o maior DS para híbridos de linhagens obtidas pelo método DH. O fato da interação população x método não ser significativa para essa característica revela que o DS depende mais da superioridade e variabilidade da população do que do método que gerou as linhas que deram origem aos híbridos. A eficiência do

método em termos de ganho genético (GG) depende da população avaliada.

O ganho genético (GG) para rendimento de grãos também variou entre populações e entre os métodos avaliados. No geral a População 1 (SSS) e a População 5 (NSS) apresentaram os maiores ganhos genéticos. Na População 1, os híbridos produzidos pelas linhas F<sub>3</sub>, apresentaram GG superior, enquanto que para a População 5 um GG maior foi obtido com híbridos produzidos pelas linhas DH.

Da mesma forma, os dados de herdabilidade ( $h^2$ ) para essa característica também ficaram semelhantes entre os métodos, onde não se pode afirmar que existe superioridade entre um método e outro, apenas que houve diferenças entre as populações. Com relação à População 4, esta revelou-se a de menor ganho de seleção em decorrência da baixa  $h^2$  e variabilidade genética existente nesta população para rendimento de grãos (Tabela 4).

Para as características de maior herdabilidade como altura de planta e espiga, as diferenças entre os métodos tornaram-se mais evidentes. No caso da altura de planta, o DS dos híbridos TC-DH nas Populações 1, 4 e 5 foi superior aos TC-F<sub>3</sub>, conseqüentemente obtiveram também um maior GG. Porém, as diferenças nas Populações 2 e 3 tanto para o DS como para o GG foram pequenas. A herdabilidade para altura de planta foi sempre maior para os TC-DH em todas as populações, destacando-se diferenças mais expressivas nas Populações 4 e 5 (NSS) (Tabela 4).

Para inserção de espiga, o DS foi superior nos TC-DH nas Populações 1, 4 e 5, por conseguinte com um maior GG. As Populações 2 e 3 foram muito semelhantes para DS, GG e  $h^2$ , com

pequena variação para TC-F<sub>3</sub>. É importante destacar que a  $h^2$  dos TC-DH das Populações 1, 4 e 5 foi superior quando comparada com os TC-F<sub>3</sub> (Tabela 4).

**Tabela 4:** Diferencial de seleção, ganho genético e herdabilidade para rendimento de grãos, altura de planta e espiga para cinco populações de milho estudadas, conforme o desenvolvimento de linhagens pelo método genealógico (F<sub>3</sub>) ou duplo-haplóide (DH)

POP	TEC	Rendimento					
		Média	SD	Amplitude	DS (5%)	GG (5%)	h <sup>2</sup>
1	F <sub>3</sub>	10760	1341	7683 - 15557	3010	927	0,32
	DH	10925	1260	7531 - 14538	2278	489	0,19
2	F <sub>3</sub>	10999	1234	7609 - 15329	2590	507	0,07
	DH	10892	1318	7568 - 14928	2512	725	0,26
3	F <sub>3</sub>	11122	1187	7920 - 15774	2364	268	0,06
	DH	11339	1137	7842 - 14999	2332	118	0,04
4	F <sub>3</sub>	11298	1141	7697 - 14842	2003	85	0,06
	DH	11027	977	8590 - 14504	5924	0	0
5	F <sub>3</sub>	11585	1394	7871 - 16329	2682	981	0,37
	DH	11540	1321	8002 - 14533	6174	2131	0,3

POP= população, MET= método, SD= desvio padrão, DS=diferencial de seleção, GG= ganho genético,  $h^2$  = herdabilidade

PO P	TEC	Altura de Espiga					
		Média	SD	Amplitude	DS (5%)	GG (5%)	h <sup>2</sup>
1	F <sub>3</sub>	247	8,9	203 - 280	-19,08	-10,9	0,42
	DH	241,4	10,2	192 - 268	-26,9	-20	0,68
2	F <sub>3</sub>	250	9,2	224 - 286	-20,5	-13	0,56
	DH	245,8	8,1	219 - 270	-16,3	-9,4	0,57
3	F <sub>3</sub>	247	8,9	222 - 292	-19,3	-11,4	0,49
	DH	244,5	7,8	219 - 274	-14,2	-7,6	0,55
4	F <sub>3</sub>	233,3	6,4	208 - 264	-12,7	-2,5	0,21
	DH	233	8,3	205 - 276	-18,7	-10	
5	F <sub>3</sub>	245,8	7,2	216 - 278	-15,2	-6	0,38
	DH	242,1	10,3	212 - 272	-22,5	-16,3	0,7

POP= população, MET= método, SD= desvio padrão, DS=diferencial de seleção, GG= ganho genético,  $h^2$  = herdabilidade

POP	TEC	Média	SD	Amplitude	DS (5%)	GG (5%)	h <sup>2</sup>
1	F <sub>3</sub>	96,5	7	72 - 120	-16,3	-6,8	0,27
	DH	92,3	8,1	60 - 124	-19,9	-12	0,57
2	F <sub>3</sub>	100,3	7,2	82 - 128	-15	-6,8	0,41
	DH		6,4	80 - 120	-12,1	-4,5	0,36
3	F <sub>3</sub>	102,1	7	77 - 126	-15	-6,6	0,35
	DH	99,4	6,6	78 - 122	-14,5	-5,8	0,36
4	F <sub>3</sub>	95,3	5,5	78 - 114	-11,9	-1,8	0,1
	DH	96,6	7	68 - 132	-16,1	-7,2	0,41
5	F <sub>3</sub>	102,7	5,5	88 - 126	-11,3	-1,8	0,14
	DH		8,3	75 - 124	-17,1	-10,7	0,61

POP= população, MET= método, SD= desvio padrão, DS=diferencial de seleção, GG= ganho genético, h<sup>2</sup> = herdabilidade

#### 4 DISCUSSÃO

O presente trabalho comparou linhas segregantes F<sub>3</sub> com linhas duplo-haplóides (DH) de cinco populações avaliadas em combinações híbridas testercross (TC) a campo e revelou que, para características de baixa herdabilidade como rendimento de grãos, os métodos não diferiram estatisticamente. A diferença dos métodos foi encontrada apenas para características de alta herdabilidade, principalmente altura de planta e espiga, possivelmente pelo efeito de depressão endogâmica e de comparar linhas segregantes F<sub>3</sub> com homozigotas DH. Estes resultados revelam que a introdução do método DH nos programas de melhoramento de milho não afetam a variabilidade intrapopulacional existente e pode ser empregada com segurança pelos melhoristas.

Os resultados aqui obtidos para características como rendimento de grãos eram esperados e não diferem daqueles obtidos por Bordes et al. (2007), que compararam os métodos SSD e DH e observaram que as médias das populações não foram significativamente diferentes entre os dois métodos. Contudo, o presente trabalho se diferencia de todos os demais publicados até o presente, sendo o primeiro a comparar os métodos genealógico e DH com dados de campo.

Apesar dos métodos aqui estudados não diferirem na capacidade de identificação de linhas de desempenho superior, Gordillo e Geiger (2008b) enfatizam outras vantagens do uso do método DH. Segundo eles, linhas DHs expressam sua máxima variação entre as linhas da população, sendo mais precisa a estimativa de seus valores genéticos e também a seleção de seus TCs para um programa de seleção recorrente.

Mayor & Bernardo (2009b) compararam esquemas de seleção recorrente assistida por marcadores moleculares entre uma população de  $F_2$  e linhas DH através de simulação e avaliações a campo. A conclusão deles foi favorável à utilização de DH para seleção assistida por marcadores moleculares, principalmente para características controladas por muitos QTL's de baixa herdabilidade. Assim, considerando outros fatores além do desempenho a campo para rendimento de grãos, o uso de DHs em um programa de melhoramento de milho pode trazer vantagens adicionais facilitando o uso de marcadores moleculares e a avaliação e manutenção das linhas *per se* já fixas.

Simulação também foi realizada por Wegenast et al. (2010) para a comparação entre produção de TCs de linhas DHs (TC-DH) e de TCs posterior a uma seleção de uma população de  $F_2$  ( $F_2$ TC-DHTC). Em ambos os métodos foi avaliado o desempenho de linhas DHs em TC, diferindo para um versus dois estágios de seleção. O esquema  $F_2$ TC-DHTC, que simulou dois estágios de seleção, foi superior em relação ao DHTC especialmente para ganho genético.

Muitos têm sido os trabalhos de simulação computacional feitos para otimizar o emprego de DHs nos programas de melhoramento e que indicam a superioridade do emprego de esquemas com o uso de DHs (Gordillo e Geiger 2008a e b). O presente trabalho foi feito para avaliar esse desempenho a campo, em condições reais de um programa de melhoramento de milho.

Todos estes estudos e, sobretudo, os resultados apresentados por este trabalho revelaram que não houve diferença significativa na comparação de TC- $F_3$  e TC-DH e seleção de linhas superiores para rendimento de grãos. Destacando-se, entretanto a grande valia aos melhoristas, que usam o método genealógico e modificam seus programas para o emprego de DHs, garantindo que mesmo assim estarão mantendo em seus programas o mesmo percentual de linhas superiores.

Para umidade de colheita, a diferença entre os métodos foi significativa estatisticamente, porém com uma diferença de apenas 0,2 pontos percentuais de pouco valor aplicado. O que chama a atenção é a diferença entre os testadores, onde o grupo SSS teve uma umidade bem inferior ao grupo NSS. Isso se explica pelo fato do testador do grupo das SSS ser bem mais precoce que o testador do grupo das NSS.

Para altura de planta e espiga a diferença entre os métodos também foi significativa, onde os TC-DH apresentaram médias menores que os TC-F<sub>3</sub>. Uma possível explicação para isso é a homozigose das linhas DH's, a qual expressa fenotipicamente alturas mais baixas quando em comparação com linhas ainda heterozigotas, como no caso dos TC-F<sub>3</sub>. Assim, o método DH revela, já na primeira geração, o potencial genético da linhagem para essas características uma vez que já está fixa e não sofrerá mais efeitos de depressão endogâmica.

Ganho genético (GG) e herdabilidade ( $h^2$ ) foram parâmetros também analisados para as três características em estudo rendimento de grãos, altura de planta e espiga. Para rendimento de grãos, de baixa herdabilidade, não se pode afirmar que um método tenha sido superior ao outro, porque houve variação entre as populações estudadas. Da mesma forma, aconteceu com as herdabilidades que variaram entre populações e foram em geral baixas, como esperado para esta característica (Tabela 4).

A variação entre as populações pode ser explicada por dois fatores. Primeiro que pode haver uma diferença entre os testadores utilizados para a produção dos testcross, onde as Populações 4 e 5 foram cruzadas com um testador conhecidamente de maior capacidade geral de combinação (CGC), comparado com o testador das Populações 1, 2 e 3. O outro fator que pode explicar a variação entre populações é a diferença de variabilidade genética observada de uma população para outra. Independente do testador usado e, portanto do grupo heterótico em avaliação, as Populações 1 e 5 em geral apresentaram as maiores herdabilidades, provavelmente

por serem aquelas obtidas com parentais mais distantes geneticamente. Enquanto que, para rendimento de grãos, não houve uma tendência de maior herdabilidade de DH versus  $F_3$ , para altura de planta e inserção de espiga, em geral as herdabilidades de DH foram superiores. Esse resultado era esperado, uma vez que ao comparar linhas fixas no caso de DH, espera-se que a maior variância genética esteja entre linhas em detrimento de uma variação dentro da linha ainda existente para linhas  $F_3$ . Sabe-se que, a cada geração de autofecundação, a variância aditiva entre linhas aumenta em detrimento de uma diminuição na variância de dominância em função da redução de genótipos heterozigotos. Isso pode indicar que as características de herdabilidades moderadas a altas aqui estudadas, altura de planta e espiga, sejam também governadas por genes que atuam de forma dominante, o que explicaria a maior herdabilidade a partir de DHs em relação às  $F_3$ s.

Como no método genealógico a seleção de linhas superiores é baseada na produtividade da linha em combinação híbrida, e ficando evidenciado que não existe diferença entre os métodos  $F_3$  e DH e, sim, apenas entre populações, é importante a escolha adequada destes cruzamentos para a geração de linhas DH. Quando se utiliza o método DH, obtém-se, rapidamente, muitas linhas homozigotas, disponíveis para uso no programa. Contudo, como as oportunidades de recombinação e seleção por este método são menores que no caso do genealógico, é fundamental o uso de cruzamentos elites no DH, para que as linhas geradas sejam agronomicamente adequadas, sendo possível deste modo explorar a variabilidade genética da população para características de menor

herdabilidade como rendimento de grãos. Segundo Bernardo (2009), a indução de haploidia a partir da geração  $F_2$  em vez da  $F_1$  pode também minimizar o problema de recombinação.

Por fim, é importante ressaltar que as populações avaliadas neste trabalho são provenientes de cruzamentos de linhagens temperadas com tropicais e variam de 25 a 50% de constituição de germoplasma tropical. Ainda assim, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com aqueles encontrados para cruzamentos 100% temperados, indicando que a tecnologia DH pode ser explorada em pools tropicais, como indicado por Belicuas et al. (2007).

## 5 CONCLUSÕES

Os métodos genealógico e duplo-haplóide são semelhantes na capacidade de identificação e seleção de linhagens superiores de milho avaliadas em combinações híbridas para rendimento de grãos, possibilitando o método de duplo-haplóide a combinação mais efetiva desta com outras características de herdabilidades mais altas como altura de planta e espiga.

A tecnologia DH não restringe a variabilidade observada para rendimento de grãos, umidade de colheita, altura de planta e espiga, sendo essa variabilidade dependente mais do cruzamento, das diferenças genéticas dos parentais de cada população e dos testadores utilizados.

Para características de alta e média herdabilidade como altura de planta e espiga, e umidade de colheita, o método DH pode apresentar vantagem sobre o método genealógico na seleção de linhas

*per se* e em combinações híbridas por revelar maior variância genética entre linhas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, 156: 95-102. 2007.

BERNARDO, R. Should maize doubled haploids be induced among F<sub>1</sub> or F<sub>2</sub> plants? *Theor. Appl. Genet.*, 119: 255-262. 2009.

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled haploid versus S<sub>1</sub> family recurrent selection for testcross performance in a maize population. *Theor. Appl. Genet.*, 112: 1063-1072. 2006.

BORDES, J. CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; LAPIERRE, A.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. Doubled-haploid versus single-seed descent and S<sub>1</sub>-family variation for testcross performance in a maize population. *Euphytica*, 154:41–51. 2007.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Reviews* 35:117-167. 1969

COSTA, C. CASTOLDI. F.L, CoStat: um programa para quem pensa que não gosta de estatística. Ed. Universidade de Passo Fundo, 384 p., 2009.

GALLAIS, A.; BORDES, J. The use of doubled haploids in recurrent selection and hybrid development in maize. *Crop Sci.*, 47(S3):S190–S201. 2007.

GORDILLO, A.; GEIGER, H.H. Alternative recurrent selection strategies using doubled haploid lines in hybrid maize breeding. *Crop Sci.*, 48: 911-922. 2009a.

GEIGER, H. H.; GORDILLO, G. A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, 54:485-499. 2009b.

GORDILLO, A.; GEIGER, H.H. Optimization of DH-based recurrent selection procedures in maize under a restricted annual loss of genetic variance. *Euphytica*, 161: 141-154. 2008.

MAYOR, P.J.; BERNARDO, R. Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F<sub>2</sub> populations. *Crop Sci.*, 49: 1719-1725. 2009a.

MAYOR, P. J.; BERNARDO, R. Doubled haploids in commercial maize breeding: one-stage and two-stage phenotypic selection versus marker-assisted recurrent selection. *Maydica*, 54: 439-448. 2009b.

SEITZ, G. The use of doubled haploids in corn breeding. 41<sup>st</sup> Annual Illinois Corn Breeders' School. Univ. Illinois Urbana- Champaign. 2005 <http://imbgl.cropsoci.uiuc.edu/index.html>.

SMITH, J.S.C; HUSSAIN, T.; JONES, E. S.; GRAHAM, G.; PODLICH, D.; WALL, S.; WILLIAMS, M. Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol Breeding*, 22:51-59. 2008.

WEGENAST, T.; LONGIN, C.F.H.; UTZ, H.F.; MAURER, H.P.; DHILLON, B.S.; MELCHINGER, A. E. Hybrid maize breeding with doubled haploids. V. Selection strategies for testcross performance with variable sizes of crosses S1 families. *Theor. Appl. Genet.*, 120: 699-708. 2010.

WILDE, K.; BURGER, H.; PRIGGE, V.; PRESTERL, T.; SCHMIDT, W.; OUZUNOVA, M.; GEIGER, H. H. Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding*, 129: 181-185. 2010.

## CAPÍTULO II

### HERANÇA GENÉTICA DE ALTURA DE PLANTA E ESPIGA EM LINHAS DUPLO-HAPLÓIDES E GERAÇÕES SEGREGANTES DE MILHO

ANDERSON LUIZ VERZEGNAZZI<sup>1</sup>, MAGALI F. GRANDO<sup>2</sup> E  
SANDRA C. K. MILACH<sup>3</sup>

**RESUMO** – Altura de planta e espiga são características importantes no melhoramento de milho (*Zea mays* L.) por estarem associadas à resistência ao acamamento e rendimento de grãos. Devido à importância destas para o melhoramento, diversos estudos têm sido feitos buscando compreender as bases genéticas das mesmas. O presente trabalho foi feito com dois objetivos: o primeiro foi estudar a herança genética de altura de planta e espiga em milho em cruzamentos envolvendo germoplasma tropical avaliados em ambientes do Sul do Brasil. O segundo foi comparar o uso de linhas F<sub>3</sub> e duplo-haplóides (DH's) para este estudo e entender de que forma a constituição de linhas F<sub>3</sub> segregantes versus DH fixas geneticamente pode afetar a herdabilidade de altura de planta e espiga em populações

---

<sup>1</sup> Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, Ph.D. em Agronomia com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, Professora do Curso de Agronomia (FAMV) e Ciências Biológicas (ICB) da UPF e PPGAgro., FAMV/UPF.

<sup>3</sup> Co-orientadora, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador Sênior Pioneer Sementes Ltda.

de milho. Para o desenvolvimento desse estudo foram utilizadas oito linhagens homocigotas de milho, que foram cruzadas dentro de seus grupos para o desenvolvimento de cinco populações, três do grupo heterótico SSS (Stiff Stalk Synthetic - fêmeas) (AxB, AxC, Dx E) e duas do NSS (Non Stiff Stalk - macho) (FxG e FxH). As avaliações de altura de planta e espiga foram feitas para as gerações F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> e DH-D<sub>2</sub> a campo e respectivos híbridos F<sub>3</sub>-TC e DH-TC provenientes do cruzamento com testadores do grupo heterótico oposto. As distribuições de frequências revelaram que altura de planta e espiga são características de alta herdabilidade, ampla segregação transgressiva e alta heterose em F<sub>2</sub>. O uso de duplo-haplóides versus linhas segregantes, no estudo da herança de altura de planta e espiga, revela diferentes aspectos da variabilidade genotípica para estas características e, em geral, herdabilidades no sentido amplo e restrito de maior magnitude.

**Palavras-chave:** Herdabilidade, Pai-progênie, germoplasma tropical, segregação transgressiva, heterose.

#### **GENETIC INHERITANCE OF PLANT AND EAR HEIGHT IN DOUBLED HAPLOIDS AND SEGREGATING GENERATIONS IN MAIZE**

**ABSTRACT** – Plant and ear height are important traits for maize (*Zea mays* L.) breeding because they are associated with resistance to lodging and higher grain yield. Due to their importance, several

studies have been done trying to understand their genetic basis. This study had two objectives: the first one was to understand the genetic inheritance of plant and ear height in tropical maize crosses evaluated in environments of Southern Brazil. The second was to compare the use of F<sub>3</sub> and DH lines and understand how F<sub>3</sub> segregating lines versus DH fixed lines can affect the heritability of plant and ear height in maize. To develop this study we used eight maize inbred lines, crossed to develop five populations, three from the SSS (Stiff Stalk Synthetic - female) heterotic group (AxB, AxC, DxE) and two from the NSS (Non Stiff Stalk - male) (FxG FxH). Plant and ear height evaluations were done for F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> and DH-D<sub>2</sub> in the field and for their respective testcross hybrids F<sub>3</sub>-TC and DH-TC. The frequency distributions revealed that plant and ear height are high heritable traits, with wide transgressive segregation and strong heterosis in F<sub>2</sub>. The use of double-haploid versus segregating F<sub>3</sub> lines in studying the genetic basis of plant and ear height reveals different aspects of genotypic variability and broad and narrow sense heritabilities of greater magnitude.

**Key words:** Heritability, Parent-progeny, variability, tropical germoplasm.

## 1 INTRODUÇÃO

Altura de planta e inserção de espiga são características importantes no melhoramento de milho (*Zea mays* L.) por estarem associadas à resistência ao acamamento e rendimento de grãos.

Devido à importância destas para o melhoramento, diversos estudos têm sido feitos buscando compreender as bases genéticas das mesmas. A maior parte dos trabalhos publicados, avaliando diferentes germoplasmas, revela que altura de planta e espiga são de herdabilidade moderada a alta, ou seja, em torno de 0.7 a 0.9 para herdabilidade no sentido amplo (AUSTIN et al., 2001; SMALLEY et al., 2004; LIMA et al., 2006; BAI et al., 2010; SCHON et al., 2010).

Utilizando germoplasma tropical, Lima e colaboradores (2006) obtiveram herdabilidades de 0.81 para altura de planta e 0.79 para altura de espiga, identificando que a correlação genética entre essas duas características foi de 0.85 e a fenotípica de 0.88. Apesar disso, os autores encontraram apenas um QTL mapeado na mesma região para as duas características, tendo sido identificados seis QTLs para altura de planta e nove para altura de espiga.

Da mesma forma, Li et al. (2007) encontraram apenas dois QTLs em comum para as duas características entre os sete QTLs para altura de planta e cinco para altura de espiga que foram mapeados, sugerindo que, apesar de correlacionadas, existem genes atuando independentemente para cada uma destas características. Outros autores também reportam a existência de correlação entre altura de planta e espiga e a existência de QTLs independentes para cada característica (AUSTIN *et al.*, 2001; LAN & CHU, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; BAI *et al.*, 2010).

Estimativas de herdabilidade, no sentido restrito para altura de planta e espiga, também foram obtidas por Smalley et al. (2004) e estas apresentaram-se mais baixas, variando entre 0.32 a 0.69 para altura de planta e de 0.35 a 0.60 para altura de espiga conforme a

população e o local avaliados. No mesmo trabalho, os autores estimaram a herdabilidade no sentido amplo pelos componentes de variância e obtiveram valores semelhantes aos publicados na literatura entre 0.74 e 0.83 para ambas as características, sendo esses maiores que a herdabilidade no sentido restrito conforme esperado. Ao estimar as herdabilidades, a partir de locais diferentes, observaram interação genótipo x local atuando em ambas as características.

Todos os tipos de ação gênica têm sido relatados atuando na definição de altura de planta e espiga. Entre eles, dominância (parcial ou completa) é o mais encontrado (LI et al., 2007; BAI et al., 2010) para altura de planta e espiga, seguido de aditividade, sobredominância e epistasia (LIMA et al., 2006; LI et al., 2007; BAI et al., 2010; IQBAL et al., 2010).

Genes de efeito não-aditivo, atuando nestas características, podem explicar o grande efeito de endogamia, para altura de planta e espiga, observadas a cada geração de autofecundação no milho. Alguns trabalhos de investigação das bases genéticas da heterose em milho têm utilizado altura de planta como característica modelo. Estudando variação fenotípica e perfis de expressão de genes diferencialmente expressos, Uzarowska et al. (2007) identificaram mais de 50% de genes mostrando sobredominância, 26% dominância parcial, 12,6% dominância completa e 10,2% aditividade. Esses resultados, contudo, contrastam com os de Swanson-Wagner e colaboradores (2006) que encontraram 78% de genes atuando de forma aditiva e 22% não-aditiva, para explicar as diferenças em geral observadas entre linhagens e seus respectivos  $F_1$ s. Apesar de não haver um consenso na quantificação da ação gênica não-aditiva

atuando em características agronômicas importantes, é consenso que a ação gênica não-aditiva é importante e explica em parte as diferenças de vigor entre linhagens e híbridos e, em consequência, as bases genéticas da heterose para características como altura de planta.

Interação genótipo x ambiente, tanto do tipo genótipo x ano como genótipo x local, tem sido observada em vários trabalhos de mapeamento de QTLs para altura de planta e espiga (AUSTIN et al., 2001; LIMA et al., 2006), bem como no estudo da herdabilidade destas características (SMALLEY et al., 2004).

Os estudos de herança e mapeamento molecular de características agronômicas como altura de planta e espiga em milho têm sido feitos com populações de várias constituições genéticas, incluindo as compostas por linhas segregantes  $F_3$  (SMALLEY et al., 2004; LIMA et al., 2006; LI et al., 2007),  $F_4$  (ZHANG et al., 2006), linhas fixas DH (MAYOR & BERNARDO, 2009a), entre outras.

Em um estudo de mapeamento de QTLs para altura de planta e espiga e florescimento em milho, Austin et al. (2001) compararam dois tipos de população uma composta por linhas segregantes  $F_{2:3}$  e outra por fixas  $F_{6:8}$ . Identificaram mais QTLs com a geração  $F_{6:8}$  do que com a  $F_{2:3}$  da mesma população. Os autores atribuem esses resultados ao fato de que linhas  $F_{6:8}$  serem mais homozigotas e homogêneas, resultando na obtenção de dados fenotípicos mais precisos. Também por terem sofrido mais recombinação no processo de autofecundação resultariam na separação de QTLs ligados.

Mais recentemente, Li et al. (2008) comparam o mapeamento de altura de planta e espiga utilizando linhas fixas de

retrocruzamento com aquele a partir de linhas  $F_{2:3}$  de uma população de milho pipoca. Ao contrário de Austin et al. (2001), os autores identificaram mais QTLs na geração  $F_{2:3}$  do que na de linhas fixas e explicam que, em parte, os resultados podem ser atribuídos à perda de variabilidade genética no processo de desenvolvimento das linhas fixas e, em parte, aos QTLs de ação não-aditiva que não puderem ser detectados com linhas fixas.

A tecnologia de duplo-haplóide (DH) para obtenção de linhas homozigotas tem sido cada vez mais empregada nos programas de melhoramento de milho (*Zea mays* L.) para produção de híbridos comerciais (MAYOR e BERNARDO, 2009b; WEGENAST et al., 2010). Desde a década de 1990, o progresso das técnicas para obtenção de haplóides via gimnogênese em milho, com a utilização de um genótipo indutor, vem propiciando a produção de um número elevado de linhas duplo-haplóides, permitindo o seu uso em germoplasma elite, variedades crioulas, além de materiais temperados e tropicais (BELICUAS et al., 2007; GEIGER e GORDILLO, 2009; WILDE et al., 2010).

Apesar do aumento no uso de duplo-haplóides em milho, não se encontra trabalhos na literatura que comparem o estudo genético da herança de características agrônômicas importantes através de populações DH versus segregantes. O presente trabalho busca, do mesmo modo, investigar como a tecnologia de DH pode influenciar o estudo da herança de altura de planta e espiga em milho.

Assim, este trabalho foi conduzido com dois objetivos. O primeiro foi estudar a herança genética de altura de planta e espiga em milho em cruzamentos envolvendo germoplasma tropical avaliados

em ambientes do Sul do Brasil. O segundo foi comparar o uso de linhas F<sub>3</sub> e DH para este estudo e entender de que forma a constituição de linhas F<sub>3</sub> segregantes versus DH fixas geneticamente pode afetar a herdabilidade de altura de planta e espiga em populações de milho. O entendimento destes dois enfoques pode auxiliar os melhoristas a delinear estratégias de identificação de variabilidade e seleção para altura e inserção de espiga em milho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento desse estudo foram utilizadas oito linhagens homocigotas de milho (*Zea mays* L.), oriundas do banco de germoplasma do programa de melhoramento de milho da Du Pont do Brasil SA- divisão Pioneer Sementes Ltda, localizada na RS 135, km 17, no município de Coxilha – RS, na região fisiográfica do Planalto Médio do Rio Grande do Sul, com uma altitude de 700m, definida pelas coordenadas 28° 12' de latitude Sul e 52° 19' de longitude Oeste. Destas, cinco linhagens pertencem ao grupo heteróticos SSS (Stiff Stalk Synthetic - fêmeas), denominadas A, B, C, D e E, e três pertencem ao grupo heteróticos NSS (Non Stiff Stalk - macho), denominadas F, G e H. Estas linhagens foram cruzadas dentro de seus grupos para o desenvolvimento de cinco populações, três do grupo heterótico SSS (AxB, AxC, Dx E) e duas do NSS (FxG e FxH).

Os cruzamentos para o desenvolvimento das populações foram realizados no mês de dezembro de 2006, na Estação Pesquisa da Pioneer Sementes em Coxilha-RS. Após a colheita (março/2007) estas sementes foram levadas para Palmas – TO na Estação de

Pesquisa da Pioneer Sementes, onde foi plantada uma linha de cada cruzamento para a produção dos F<sub>1</sub>s. Cinco espigas de cada cruzamento foram colhidas em “bulk” para formar as populações na geração F<sub>2</sub>.

As populações na geração F<sub>2</sub> foram plantadas na Estação de Pesquisa de Coxilha – RS, em setembro de 2007, para indução da haploidia. Esse processo foi feito com um indutor da mesma espécie, ou seja, um híbrido de milho proveniente do cruzamento de linhagens com origem (RWS) (CHASE, 1969). Estas linhagens RWS carregam um marcador fenotípico dominante (Antocianina) que confere a cor púrpura ao grão (no embrião e endosperma) que permite a separação de sementes haplóides e diplóides. As sementes com ambos, endosperma e embrião, coloridos são provenientes de um cruzamento normal, portanto diplóides e devem ser eliminadas. As sementes com endosperma colorido e o embrião normal (sem cor púrpura), eram as haplóides e foram mantidas para a fase seguinte de duplicação. As espigas induzidas foram colhidas e levadas para a Estação de Pesquisa de Palmas – TO, onde foi feita a separação dos grãos haplóide dos diplóides, através de identificação visual. Feita a identificação dos grãos haplóides, estes foram submetidos ao processo de duplicação cromossômica com uso de colchicina (DEIMLING et al, 1997). Após a duplicação, as sementes duplo-haplóides (DH), na primeira geração chamada D<sub>1</sub>, foram novamente enviadas para a Estação de Pesquisa de Coxilha, onde foram plantadas no mês de setembro de 2008, autofecundadas e avançadas para a geração D<sub>2</sub>. Concomitantemente, com o plantio das primeiras linhas DH-D<sub>1</sub>, foi realizado novamente o plantio das populações F<sub>2</sub>, para autofecundação e avanço para a

geração F<sub>3</sub>, e também o plantio dos pais (P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>) destas populações. Estas populações foram plantadas em delineamento completamente casualizado, sendo 16 linhas de cada população contendo em média 21 plantas por linha de 4,2 metros de comprimento, totalizando 65.700 plantas ha<sup>-1</sup>. As demais gerações, nos dois anos de plantio, seguiram população similar de plantas, variando o número de linhas de cada geração e população conforme Tabela 1.

**Tabela 1:** Populações, cruzamentos, e números de indivíduos ou linhas de milho nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> utilizados para avanço (F<sub>1</sub>) e/ou avaliação de altura de planta e inserção espiga (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>)

População	Cruzamento	GH	Indivíduos		Linhas		
			F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
1	AxB	SSS	22	227	74	133	74
2	AxC	SSS	22	221	52	139	49
3	DxE	SSS	22	334	99	193	159
4	FxG	NSS	22	219	65	151	77
5	FxH	NSS	22	260	90	135	95

GH= grupo heterótico

As avaliações de altura de planta e inserção de espiga foram feitas para as gerações F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> e DH-D<sub>2</sub> a campo com uma régua de três metros de comprimento da base da planta até a extremidade do pendão, para altura de planta, e até a base da inserção da espiga para altura de espiga. Nas populações de F<sub>2</sub>, as medições foram feitas em todas as plantas da família no verão de 2008 em Coxilha, registradas separadamente para posterior estudo da herdabilidade pai-progênie com as linhas avançadas para a geração F<sub>3</sub>. Para as linhas nas gerações F<sub>3</sub>, DH-D<sub>1</sub> e DH-D<sub>2</sub> foram medidas cinco

plantas em cada linha para obtenção da média, sendo DH-D1 feita no verão de 2008 e, as demais, no verão de 2009 em Coxilha.

Baseada em características fenotípicas, foi feita uma seleção das melhores plantas das populações  $F_2$  para formarem a geração  $F_3$  e das melhores linhas da geração DH-D<sub>1</sub> para obtenção da DH-D<sub>2</sub>. A seleção foi feita para se obter um número semelhante de linhas  $F_3$  e DH-D<sub>2</sub> para cada população com um mínimo de 50 linhas de cada na geração seguinte. Isso significou uma pressão de seleção de em torno de 25% de  $F_2$  para  $F_3$  e de 50% de DH-D<sub>1</sub> para DH-D<sub>2</sub>. A pressão de seleção real de  $F_2$  até DH-D<sub>2</sub> foi maior que 50% uma vez que alguma seleção foi feita na geração de indução em  $F_2$ .

Para o estudo da herança, foram feitas as distribuições de frequências, calculadas as variâncias e estimadas as herdabilidades no sentido amplo ( $h^2_a$ ), pelo método de componentes de variância, e restrito, através do método pai-progênie ( $h^2_r$ ).

As distribuições de frequência para as características altura de planta e espiga foram obtidas pelo agrupamento dos dados em classes para as gerações  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $D_1$  e  $D_2$  e cada uma das populações. Estas classes foram estabelecidas em intervalos de 10 em 10 cm, com base no desvio padrão médio de cada característica, de acordo com Steel & Torrie (1980).

As variâncias para cada característica foram estimadas para as cinco populações, conforme proposto por Allard (1960):

$$VP = VF_2$$

$$VE = (VP_1 + VP_2) / 2$$

$$VG = VP - VE$$

Onde:  $VP_1$ ,  $VP_2$ , e  $VF_2$  representam as variâncias das gerações  $P_1$ ,  $P_2$  e  $F_2$  respectivamente.  $VE$  é a variância ambiental;  $VG$  a variância genética e  $VP$  a variância fenotípica.

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo ( $h^2_a$ ) e restrito - pai-progênie ( $h^2_r$ ) foram calculadas pelas seguintes equações:

$$h^2_a = (VP - VE) / VP \quad (\text{ALLARD, 1960})$$

$$h^2_r = b = \text{covariância}(F_2;F_3) / (\text{var}F_2 \cdot \text{var}F_3)^{1/2}$$

A regressão pai-progênie ( $b = h^2_r$ ) foi calculada para  $F_2 - F_3$  e  $D_1 - D_2$ .

Tanto as sementes da geração  $F_3$  como das linhas DH, foram semeadas na Estação Pesquisa de Palmas – TO, em abril de 2009, para serem cruzadas com um testador de alta capacidade combinatória do grupo heterótico oposto, que no caso foi uma linhagem fixa com presença do gene Bt YieldGard, para a obtenção dos híbridos (testcross).

Os híbridos TC- $F_3$  e TC-DH foram semeados entre os dias 5 e 9 do mês de setembro de 2009, em três locais diferentes do estado do Rio Grande do Sul, Condor (29° 09' de latitude Sul e 53° 44' de longitude Oeste), Cruz Alta (28° 66' de latitude Sul e 53° 42' de longitude Oeste) e Carazinho (29° 28' de latitude Sul e 52° 85' de longitude Oeste), para avaliações de altura de planta e espiga. Os locais de Cruz Alta e Condor são irrigados através de um pivô central. Cada híbrido (TC) foi plantado em um experimento completamente casualizado em uma repetição e com testemunhas repetidas em

diagonais em todo o campo experimental, em parcelas de duas linhas com 4,2 metros de comprimento, tendo após o desbaste uma população final de 78 mil plantas  $\text{ha}^{-1}$ . As testemunhas, que foram os híbridos comerciais da Pioneer Sementes 32R48, 32R48Y, 30F53 e 30F53Y, foram semeadas de forma repetida nas diagonais dos experimentos em todo o campo experimental.

As medições de altura de planta e espiga dos híbridos foram feitas de forma similar àquelas para os demais materiais do estudo com uma régua de 3 metros de comprimento. Em cada parcela foram amostradas cinco plantas para obtenção da média.

As herdabilidades no sentido amplo ( $h^2_a$ ) de altura de planta e espiga com base nos dados dos híbridos TC-F3 e TC-DH foram estimadas pelo método dos componentes da variância de acordo com Allard (1960):

$$h^2_a = VG/VP, \text{ onde } VG = \text{variância genotípica}$$

$$VG = VP - VE$$

$$VP = \text{variância fenotípica}$$

$$VE = \text{variância ambiental}$$

A variância fenotípica foi estimada pela variância entre híbridos F<sub>3</sub>-TC ou DH-TC e a genotípica, pelo contraste desta com a variância ambiental.

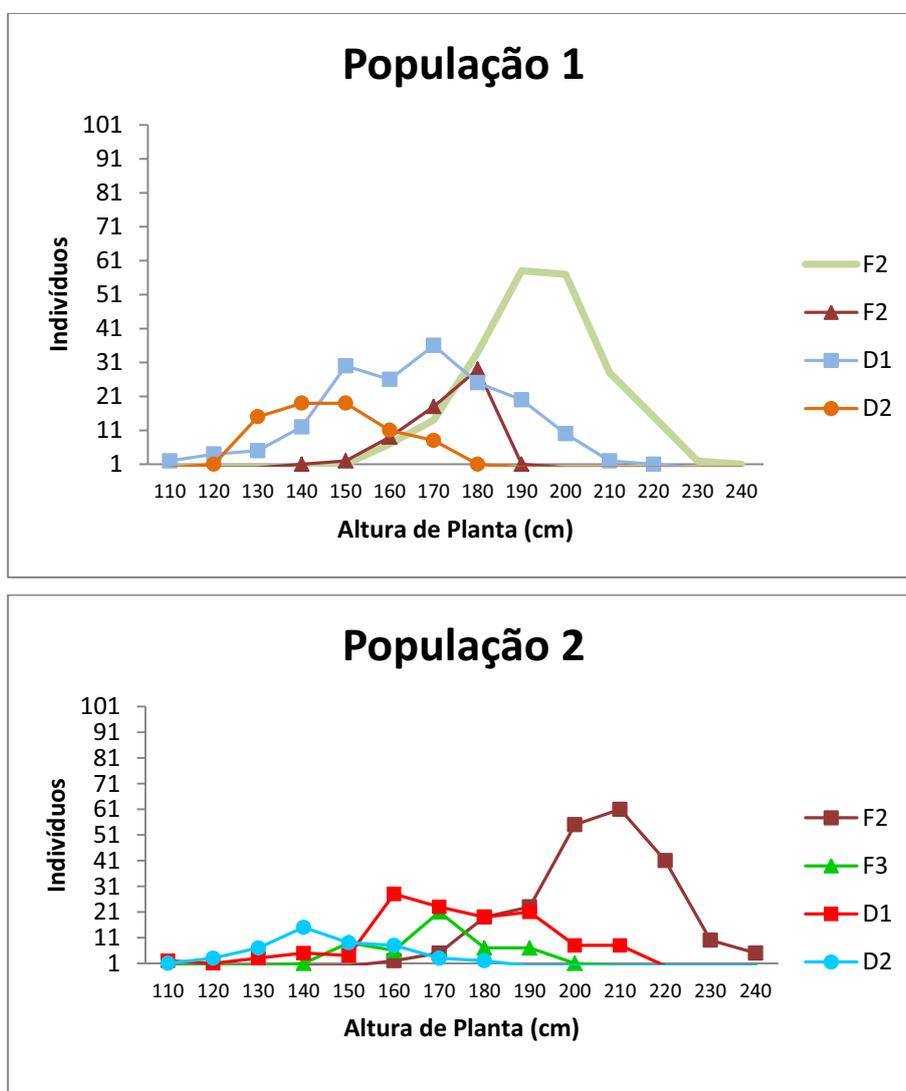
A variância ambiental (VE) foi estimada pela variância dos híbridos comerciais da Pioneer Sementes 30F53, 30F53Y, 32R48 e 32R48Y, plantados nas diagonais dos ensaios como testemunhas. A variância de cada um desses híbridos foi calculada e observou-se uma

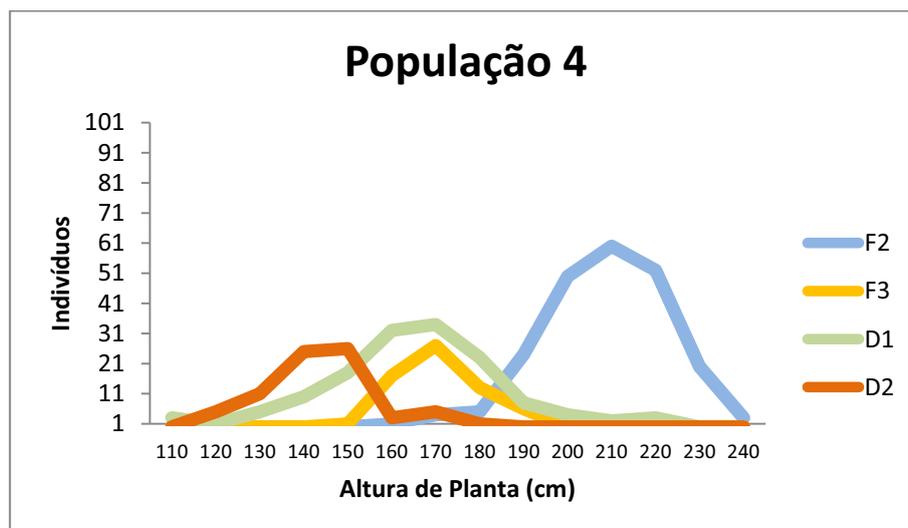
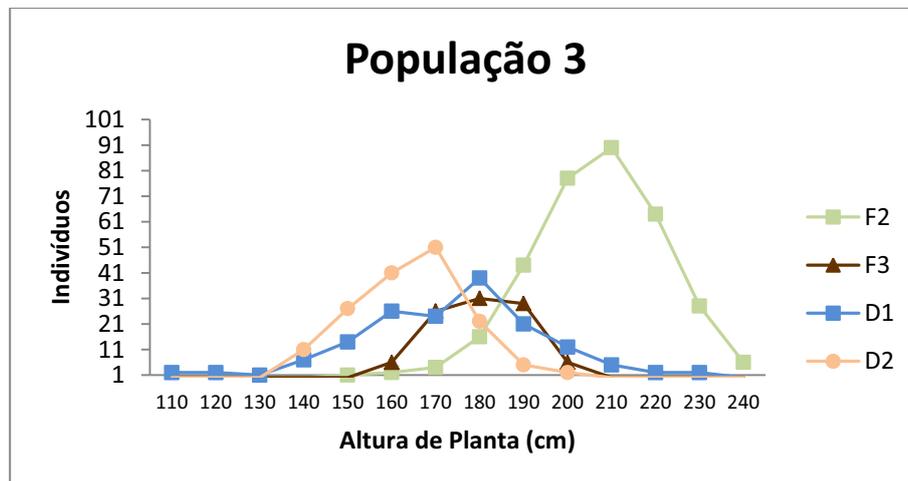
variância muito mais alta para os híbridos convencionais (não YieldGard) e também para o 32R48Y, que apesar de ser YieldGard é um híbrido de maior susceptibilidade a insetos. Desta forma, para não superestimar a variância ambiental grandemente influenciada pelo ataque desuniforme por insetos nas áreas, elegeu-se a variância do híbrido 30F53Y, para estimar a variância ambiental. Acredita-se que essa retrata com maior proximidade a variância ambiental, no qual os ensaios de híbridos testcross aqui avaliados foram submetidos, uma vez que os testadores também eram Bt.

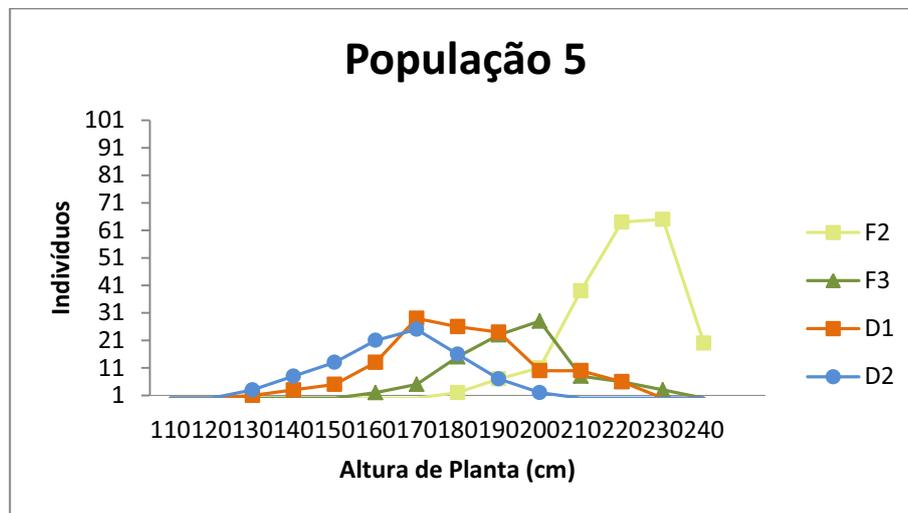
As análises de correlações entre linhas  $F_3$  e  $D_H$  com seus respectivos híbridos ( $TCF_3$  e  $TC-DH$ ) foi calculado através do programa estático CoStat (COSTA; CASTOLDI, 2009).

### 3 RESULTADOS

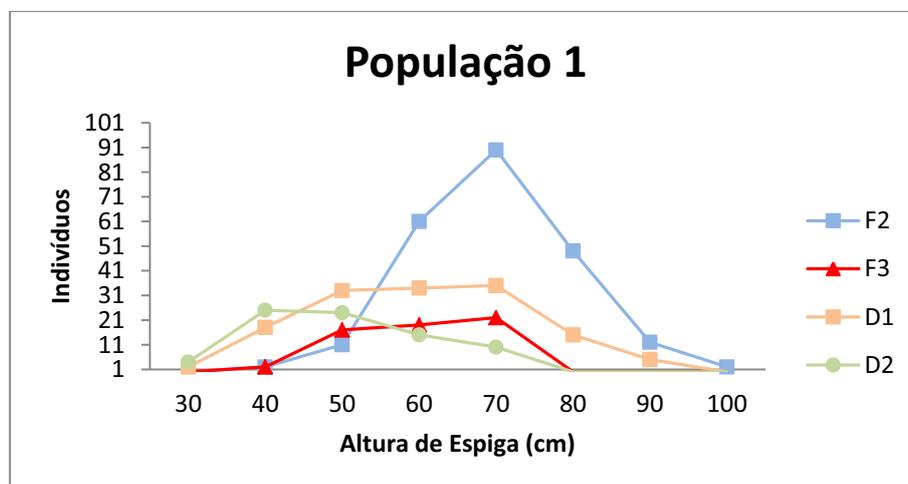
As análises de distribuição freqüência, no caso do milho, para altura de planta e espiga, evidenciaram que ambas são características de herança quantitativa, pois a geração  $F_2$  apresentou variação contínua para todos os cruzamentos (Figuras 1 e 2).

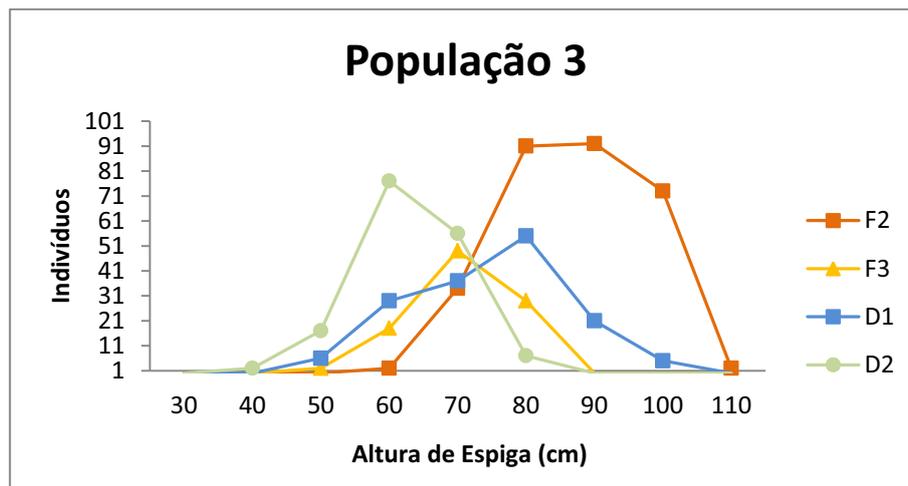
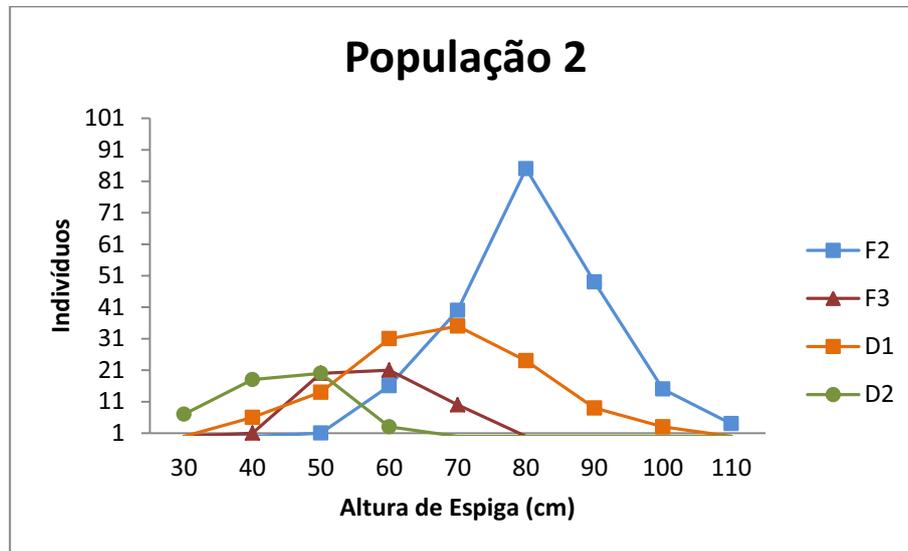


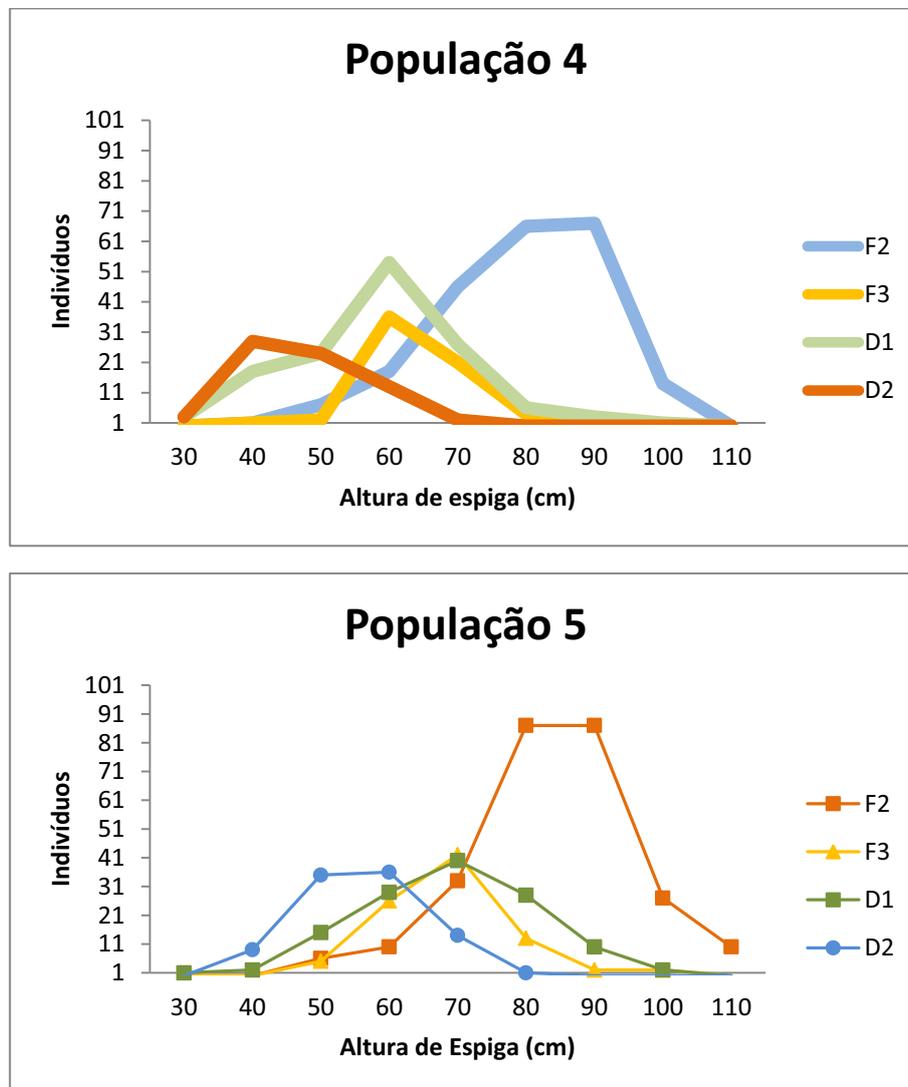




**Figura 1:** Distribuição de frequência para a característica de altura de planta, em duas gerações segregantes (F2 e F3) e em duas gerações fixas (D1 e D2) das populações cinco cruzamentos (populações) de milho.







**Figura 2:** Distribuição de frequência para a característica de altura de espiga, em duas gerações segregantes (F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>) e em duas gerações fixas (D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>) das populações cinco cruzamentos (populações) de milho.

Para todas as populações a média da geração F<sub>2</sub> foi sempre maior que a média dos pais, revelando um efeito alto de heterose,

ainda nesta geração, para altura de planta e espiga. Em todos os casos, a geração  $F_2$  apresentou a maioria de seus indivíduos com altura superior aos pais, sendo para altura de planta em torno de apenas 25% das progênies com altura similar ou menor a deles. No caso da população 5, a proporção de plantas similares aos pais é ainda menor, demonstrando heterose ainda maior (Figura 1). Para esta população houve uma redução de altura de planta de 40% na média da geração  $F_3$  em relação ao  $F_2$ , enquanto que para as populações 1, 2 e 4 a redução foi em torno de 20%, e para a população 3 de apenas 13%.

Para altura de espiga, o comportamento das populações variou em relação à altura de planta, tendo a média da geração  $F_3$  reduzido em relação à  $F_2$  em 40% para as populações 1 e 2 ; 30% para a população 4 e em 25% para as populações 3 e 5 (Tabela 4).

A geração  $D_1$  apresentou maior amplitude de classes para altura de planta e espiga que as demais para todas as populações (Figuras 1 e 2). Uma vez que não existem mais genótipos heterozigotos em  $D_1$ , a variabilidade nesta geração provavelmente se deve a diferentes combinações de gene, que atuam aditivamente, e dos efeitos de epistasia do tipo aditividade x aditividade entre genes. Por outro lado, a geração  $D_2$  foi a de menor amplitude de variação em todas as populações, provavelmente devido ao efeito de seleção de  $D_1$  para  $D_2$ . Da mesma forma na geração  $F_3$ , nota-se que a amplitude das classes de altura de planta e espiga diminui consideravelmente. Isso por que, no caso desta característica, geralmente descartam-se os indivíduos mais extremos da curva, ou seja, os mais altos e os mais baixos (Figuras 1 e 2). Porém, o importante é que a amplitude nestas duas gerações se manteve semelhante. Isto demonstra que, tanto no

método de avanço de gerações quanto no DH, podem-se selecionar indivíduos semelhantes para altura de planta e espiga, com a vantagem de que em duplo-haplóide pode-se explorar toda a variabilidade da população, além de se ter maior confiabilidade do que se estará carregando para a próxima geração devido à homogeneidade das linhas.

Pelas distribuições de frequência, nas cinco populações, pode-se perceber igualmente a existência de segregação transgressiva para altura de planta e espiga, uma vez que se observam, nas gerações segregantes e de linhas fixas DH, indivíduos com altura maior e menor que de seus parentais. Isso ocorreu, possivelmente, porque os genes favoráveis ou desfavoráveis, que controlam as características de altura de planta, estão distribuídos de forma complementar entre os seus parentais.

A comparação das herdabilidades no sentido amplo e restrito para altura de planta e espiga mostrou que, para a maioria das populações, a herdabilidade no sentido restrito foi mais baixa, o que em geral ocorre quando variância genética não-aditiva e a interação genótipo x ano atuam na expressão da característica (Tabelas 2 e 3). No caso da herdabilidade, no sentido restrito, calculada pelo método pai-progênie, pelo fato das gerações  $F_2$  e  $D_1$  estarem em um ano distinto de suas respectivas  $F_3$  e  $D_2$ , a influência da interação genótipo x ano é levada em consideração e a influência ambiental é diluída entre os anos em estudo.

As herdabilidades para altura de planta (Tabela 2) e inserção de espiga (Tabela 3) das gerações de linhas homozigotas  $D_1$  e  $D_2$  foi sempre superior àquelas calculadas para as linhas segregantes

F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> para todas as populações, novamente revelando a importância da variância aditiva. Conforme as estimativas de herdabilidade no sentido amplo ( $h^2_a$ ), para altura de planta as populações 2 e 4 são as de maior potencial para seleção em F<sub>2</sub>. Contudo, a herdabilidade no sentido restrito revela que o maior progresso genético pode ser obtido com a população 2. Contudo, a maior variância genética e herdabilidade no sentido amplo foi obtida para a população 1, indicando que na geração D<sub>1</sub> a seleção desta população pode ser efetiva (Tabela 2). Para altura de espiga, a população 4 apresentou maior herdabilidade no sentido restrito para as gerações D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>, sendo a de maior potencial para a seleção desta característica e as populações 1 e 2 a maior herdabilidade no sentido amplo para linhas D<sub>1</sub> (Tabela 3).

Na comparação entre linhas segregantes obtidas pelo método genealógico e fixas obtidas pelo DH, as herdabilidades tanto no sentido amplo como no restrito foram sempre superiores para as linhas DH para ambas as características, como esperado para uma herança baseada em variância genética aditiva que permanece da geração D<sub>1</sub> para D<sub>2</sub> (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2:** Comparação das médias, variâncias e herdabilidades para altura de planta das cinco populações de milho estudadas em duas gerações segregantes (F2, F3) e duas fixas (D1 e D2)

Pop.	Geração	Média	SD	Componentes da Variância			h <sup>2</sup> r
				VF	VG	h <sup>2</sup> a	
1	P <sub>1</sub>	182	7,8	62,2	-	-	-
	P <sub>2</sub>	167	4,8	23,3	-	-	
	F <sub>2</sub>	202,3	10,3	106,3	63	0,59	0,19
	F <sub>3</sub>	167,8	9,9	99,3	56	0,56	
	D <sub>1</sub>	162,8	22,3	498	455	0,91	0,34
D <sub>2</sub>	147	13,5	182	140	0,76		
2	P <sub>1</sub>	182	7,8	62,2	-	-	
	P <sub>2</sub>	190,5	6,8	46,9	-	-	
	F <sub>2</sub>	207,9	12,4	156,1	101	0,65	0,41
	F <sub>3</sub>	169,4	13,6	185,9	131	0,70	
	D <sub>1</sub>	173	20,8	434	379	0,87	0,77
D <sub>2</sub>	145	15,5	242	187	0,77		
3	P <sub>1</sub>	190,5	6,8	46,9	-	-	
	P <sub>2</sub>	185	8,4	72,2	-	-	
	F <sub>2</sub>	205,4	16,4	271,6	145	0,53	0,22
	F <sub>3</sub>	180,3	10,3	180,3	46	0,43	
	D <sub>1</sub>	174,4	19,2	370	311	0,83	0,37
D <sub>2</sub>	164,1	12,7	162	103	0,63		
4	P <sub>1</sub>	171	6,5	43,3	-	-	
	P <sub>2</sub>	163,5	5,7	33,6	-	-	
	F <sub>2</sub>	212,6	11,2	126,9	88	0,69	0,4
	F <sub>3</sub>	170,9	9,5	91,1	52	0,57	
	D <sub>1</sub>	163,4	17,9	320	282	0,88	0,44
D <sub>2</sub>	143,9	12,5	157	119	0,75		
5	P <sub>1</sub>	171	6,5	43,3	-	-	
	P <sub>2</sub>	205	13,5	183,3	-	-	
	F <sub>2</sub>	230,1	13,6	187,3	73	0,39	0,30
	F <sub>3</sub>	164,7	14,7	218,4	105	0,48	
	D <sub>1</sub>	180,8	18,8	355	242	0,68	0,46
D <sub>2</sub>	165	15,7	246	133	0,54		

Pop = população; SD= desvio padrão, VF= variação fenotípica,  
 VG= variação genética, h<sup>2</sup>a = herdabilidade sentido amplo,  
 h<sup>2</sup>r= herdabilidade sentido restrito (pai=progênie)

**Tabela 3:** Comparação das herdabilidades, para a característica altura de espiga nas cinco populações de milho em duas gerações F2, F3 e em duas gerações fixas D1 e D2

Pop.	Geração	Média	SD	Componentes da Variância			h <sup>2</sup> r
				VF	VG	h <sup>2</sup> a	
1	P <sub>1</sub>	63	5,3	28,8	-	-	
	P <sub>2</sub>	46	5,1	26,6	-	-	
	F <sub>2</sub>	76,3	8	64,8	37	57,1	0.27
	F <sub>3</sub>	55,1	6,7	45	17	38,2	
	D <sub>1</sub>	56,7	12,3	153	125	81,8	0.33
	D <sub>2</sub>	44,5	7,4	55	27	49,7	
2	P <sub>1</sub>	63	5,3	28,8	-	-	
	P <sub>2</sub>	62,5	5,4	29,1	-	-	
	F <sub>2</sub>	81,1	7,7	59,4	30	51,1	0.22
	F <sub>3</sub>	57,6	7,8	61,2	32	52,5	
	D <sub>1</sub>	67,8	13,5	183	154	84,2	0.2
	D <sub>2</sub>	43,9	7,9	66	37	56,6	
3	P <sub>1</sub>	64	6,5	43,3	-	-	
	P <sub>2</sub>	73,5	5,2	28	-	-	
	F <sub>2</sub>	88,8	10,2	105,4	69	66,1	0.13
	F <sub>3</sub>	70,7	7,4	56,1	20	36,6	
	D <sub>1</sub>	74,6	11,5	134	98	73,4	0.18
	D <sub>2</sub>	63	7,7	59	23	39,8	
4	P <sub>1</sub>	60	9,1	83,3	-	-	
	P <sub>2</sub>	43,5	5,2	28	-	-	
	F <sub>2</sub>	83,9	10,4	109,8	54	49,2	0.23
	F <sub>3</sub>	63,9	7,2	52,7	-2,9	0	
	D <sub>1</sub>	58,3	12,9	168	113	66,9	0.42
	D <sub>2</sub>	46,1	9,9	98	42	43,5	
5	P <sub>1</sub>	60	9,1	83,3	-	-	
	P <sub>2</sub>	63,5	7	50,2	-	-	
	F <sub>2</sub>	85,8	9,4	89	22	24,9	0.19
	F <sub>3</sub>	68,5	9,6	93,3	26	28,3	
	D <sub>1</sub>	68,8	12,8	164	97	59,3	0.35
	D <sub>2</sub>	56,1	8,9	79	12	15,8	

Pop = população; SD= desvio padrão, VF= variação fenotípica,  
 VG= variação genética, h<sup>2</sup>a = herdabilidade sentido amplo,  
 h<sup>2</sup>b= herdabilidade sentido restrito (pai=progênie)

As herdabilidades, estimadas a partir da variância dos híbridos F<sub>3</sub>-TC e DH-TC, para os três locais de avaliação revelaram diferenças significativas entre locais, evidenciando a importância da

interação genótipos x locais na definição das alturas de planta dos híbridos. Condor, RS apresentou as maiores médias para altura de planta tanto para F<sub>3</sub>-TC como para DH-TC, comparado aos outros dois locais. Em geral, Condor foi o local com as maiores herdabilidades para altura de planta (Tabela 4). Neste local, com exceção para as populações 2 e 3, as herdabilidades de DH-TC foram semelhantes ou um pouco superior às obtidas com F<sub>3</sub>-TC. Em Cruz Alta, as herdabilidades obtidas com DH-TC foram sempre superiores as de F<sub>3</sub>-TC. De forma semelhante, para Carazinho isso também foi observado, com exceção das populações 1 e 5 que revelaram maiores herdabilidades para F<sub>3</sub>-TC (Tabela 4). Para altura de planta, Carazinho se mostrou o local com menor herdabilidade e onde a seleção provavelmente será menos efetiva para esta característica (Tabela 5). Por outro lado, Condor foi, igualmente, para altura de espiga o local com maiores herdabilidades.

A diferença de estimativas de herdabilidades entre os locais tanto para F<sub>3</sub>-TC como para DH-TC indica a necessidade de cautela na seleção de linhas de menor altura de planta e espiga com base na média dos locais, como em geral é a prática adotada pelos programas de melhoramento de milho. Neste caso, linhas DH-TC apresentarão vantagem, pois em geral apresentaram diferenças menores nas estimativas de herdabilidade de um local para outro quando comparadas as F<sub>3</sub>-TC (Tabelas 4 e 5). Locais como Cruz Alta, com as menores herdabilidades para altura de planta e Carazinho para altura de espiga, se incluídos na análise dos locais, podem reduzir a habilidade do melhorista de discriminar os materiais de interesse com menor altura de planta e espiga.

**Tabela 4:** Comparação de herdabilidade para altura de planta em combinações híbridas por local.

Local		Condor			
Pop	Geração	Média	SD	VG	h <sup>2</sup> a
1	F3	253	13,5	167,9	0,91
	DH	250	11,5	117,1	0,88
2	F3	255	12	129,6	0,89
	DH	254	6,5	28,2	0,64
3	F3	256	12,7	147,2	0,90
	DH	253	6,6	28,9	0,65
4	F3	241	7,8	46,1	0,75
	DH	248	10,4	93,6	0,85
5	F3	258	8,1	50,4	0,76
	DH	251	11	107	0,87

Local		Cruz Alta			
Pop	Geração	Média	SD	VG	h <sup>2</sup> a
1	F3	245	7,7	15,9	0,26
	DH	234	11,7	95,6	0,68
2	F3	250	9,5	47	0,52
	DH	243	8,7	33,3	0,43
3	F3	244	7,76	16,9	0,28
	DH	239	8,5	30,6	0,41
4	F3	236	6,1	0	0
	DH	228	8,1	23,4	0,35
5	F3	247	8	21,2	0,32
	DH	242	12,1	105,2	0,70

Local		Carazinho			
Pop	Geração	Média	SD	VG	h <sup>2</sup> a
1	F3	242	5,6	2,8	0,09
	DH	238	7,4	26,3	0,47
2	F3	244	6,2	10,8	0,27
	DH	239	8,9	51,8	0,64
3	F3	240	6,4	12,7	0,30
	DH	240	8,3	40,9	0,58
4	F3	221	5,4	1,4	0,04
	DH	221	6,4	16,6	0,30
5	F3	231	5,5	2,2	0,07
	DH	233	7,7	31,8	0,52

Pop = população; SD= desvio padrão, VG= variação genética, h<sup>2</sup> a = herdabilidade sentido amplo

**Tabela 5:** Comparação das herdabilidades para altura de espigas em combinações híbridas nos três locais observados

Local		Condor			
Pop	Geração	Média	SD	VG	h <sup>2</sup>
1	F3	103,7	11	89,9	0,74
	DH	103,7	10,4	78,6	0,71
2	F3	104,5	9,9	68,1	0,68
	DH	105,5	7,2	21,4	0,40
3	F3	106,3	9,9	67,2	0,68
	DH	104,5	7,8	29,8	0,48
4	F3	95,6	7,2	21,9	0,41
	DH	106,3	9,5	60,2	0,65
5	F3	105,7	5,8	3	0,08
	DH	108	8,6	43,3	0,58

Local		Cruz Alta				Carazinho			
Pop	Geração	Média	SD	VG	h <sup>2</sup>	Média	SD	VG	h <sup>2</sup>
1	F3	90,3	5,6	8,6	0,26	95,4	4,4	-3,7	0
	DH	84,3	7,5	33,5	0,58	88,8	6,2	16,4	0,41
2	F3	97,7	6,5	19,2	0,44	98,9	5,1	3,1	0,12
	DH	91,3	6	13	0,35	94	5,9	12,3	0,34
3	F3	98,6	6,6	19,8	0,45	101,5	4,6	-1,5	0
	DH	95,1	7	26,2	0,52	98,7	5	2,2	0,08
4	F3	95,5	4,8	0,34	0,01	94,9	4,6	-1,7	0,08
	DH	89,8	6,2	15,9	0,40	93,6	5,3	5,6	0,19
5	F3	102	6,1	13,9	0,36	100,3	4,7	-0,2	0
	DH	97,9	9,6	69,3	0,74	99,5	6,8	24,1	0,51

Pop = população; SD= desvio padrão, VG= variação genética, h<sup>2</sup> a = herdabilidade

Correlações entre as linhas F<sub>3</sub> e DH e seus respectivos híbridos (TCDH e TCF<sub>3</sub>), apresentaram variações entre os três locais onde foram testados (Tabela 6). Esses resultados salientam a importância da interação genótipo x local na expressão da altura de planta e espiga em milho.

O local que apresentou maior correlação entre altura de planta das linhas F<sub>3</sub> com os híbridos F<sub>3</sub>-TC e DH com do DH-TC foi Carazinho. Este é o local de avaliação de híbridos mais próximo de Coxilha, onde foram conduzidos os ensaios das linhas F<sub>3</sub> e DH. Por outro lado, para altura de espiga, Cruz Alta mostrou correlações maiores entre híbridos e linhas (Tabela 6). De forma geral, para altura de planta e espiga foram encontradas mais correlações significativas

para DHs do que F<sub>3</sub>s, revelando uma superioridade de DH para avaliação e seleção dessas características.

**Tabela 6:** Correlação entre linhas F3 para altura de planta, altura de espiga e seus respectivos híbridos (TCF3 e TCDH) e 3 locais

Local		Condor			
		Alt. de Planta		Alt. de Espiga	
Pop	Geração	Correlação	P	Correlação	P
1	F3	0	ns	0,05	ns
	DH	0	ns	-0,08	ns
2	F3	0,3	*	0,24	ns
	DH	0,17	ns	0,09	ns
3	F3	0,06	ns	0,1	ns
	DH	0,01	ns	-0,2	ns
4	F3	0,27	*	0,13	ns
	DH	0,11	ns	0,06	ns
5	F3	0,34	**	0,22	*
	DH	0,15	ns	0,1	ns

Local		Cruz Alta			
		Alt. de Planta		Alt. de Espiga	
Pop	Geração	Correlação	P	Correlação	P
1	F3	0,07	ns	0,45	**
	DH	0,44	**	0,32	*
2	F3	0,26	ns	0,2	ns
	DH	0,47	*	0,5	*
3	F3	0,2	ns	0,14	ns
	DH	0,32	**	0,41	**
4	F3	-0,06	ms	0	ns
	DH	0,3	*	0,16	ns
5	F3	0,32	**	0,22	*
	DH	0,21	ns	0,3	*

Local		Carazinho			
		Alt. de Planta		Alt. de Espiga	
Pop	Geração	Correlação	P	Correlação	P
1	F3	0,28	*	0,06	ns
	DH	0,39	**		
2	F3	0,34	*	0	ns
	DH	0,25	ns		
3	F3	0,26	**	0,2	ns
	DH	0,42	**		
4	F3	0,27	*	0,08	ns
	DH	0,28	*		
5	F3	0,41	**	0,34	*
	DH	0,41	**		

Pop= população, Alt. = altura, P= significância a 1% (\*\*) e 5% (\*).

#### 4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a herança genética de altura de planta e espiga foi estudada em populações tropicais de milho avaliadas em ambientes do Sul do Brasil. Os resultados revelam que, apesar de serem de natureza quantitativa, as características aqui estudadas são de herdabilidade, no sentido amplo, moderada a alta. Esses resultados estão de acordo com as estimativas de herdabilidade anteriormente publicadas para altura de planta e espiga em milho envolvendo populações temperadas (AUSTIN et al., 2001; SMALLEY et al., 2004; BAI et al., 2010; SCHON et al., 2010) e tropicais (LIMA et al., 2006).

As herdabilidades, no sentido restrito para altura de planta e espiga, encontradas neste trabalho foram sempre menores que as do sentido amplo, como esperado. Os valores obtidos foram também similares aqueles relatados por Smalley e colaboradores (2004). Em

todas as situações, as estimativas no sentido restrito sempre foram maiores para  $D_1$ - $D_2$  do que para  $F_2$ - $F_3$ . Esses resultados, juntamente com as distribuições de frequência das gerações  $D_1$  versus da  $F_2$  revelam a importância da aditividade e da não-aditividade na expressão de ambas as características. Nas gerações fixas obtidas por DH, a variância existente entre as linhas é de natureza aditiva ou epistática proveniente da interação de genes que atuam aditivamente. Devido à ausência de heterozigotos nesta geração, não é possível detectar variância genética de dominância, sobredominância ou outros tipos de interações epistáticas que não a de aditividade. Assim, ao se observar ampla variabilidade entre linhas DH na geração  $D_1$ , esta revela a importância da aditividade na expressão de ambas as características.

Por outro lado, o comportamento das gerações segregantes  $F_2$  e  $F_3$  em relação aos genótipos parentais e a heterose dessas populações, com média superior a dos parentais, revela claramente a existência de variância genética não-aditiva atuando para altura de planta e espiga nos cruzamentos aqui estudados. Variância genética de aditividade e não-aditividade tem sido observada atuando na definição de altura de planta e espiga em milho em diversos trabalhos publicados na literatura. O mapeamento de QTLs tem possibilitado dissecar essa duas características quantitativas estimando-se o efeito de cada QTL em separado, sendo o efeito de dominância (parcial ou completa) o mais encontrado (LI et al., 2007; BAI et al., 2010) para altura de planta e espiga, seguido de aditividade, sobredominância e epistasia (LIMA et al., 2006; Li et al., 2007; BAI et al, 2010; IQBAL et al., 2010). Trabalhando com altura de planta como modelo para o

estudo de heterose, Uzarowska et al. (2007) identificaram que a maior parte dos genes em estudo atuavam de forma não-aditiva, mostrando sobredominância, algum tipo de dominância ou aditividade, explicando a forte heterose observada entre híbridos  $F_1$  e respectivos genótipos parentais.

O comportamento transgressivo das gerações  $F_2$ ,  $F_3$ ,  $D_1$  e  $D_2$ , observado para todas as populações, revela que o melhoramento de milho pode continuar progredindo na seleção para altura de planta e espiga trabalhando com genótipos elites, fenotipicamente similares. A seleção, contudo, nas gerações  $F_2$  e  $F_3$  para essas características deve empregar uma pressão de seleção moderada, uma vez que a alta heterose em  $F_2$  e depressão endogâmica observada de  $F_2$  para  $F_3$  podem mascarar a seleção para essas características.

No presente trabalho, a comparação de segregação de linhas fixas DH nas gerações  $D_1$  e  $D_2$  com segregantes nas gerações  $F_2$  e  $F_3$  possibilitaram compreender de forma mais completa a herança da altura de planta e espiga nas populações estudadas. As gerações  $F_2$  e  $F_3$  possibilitam compreender a existência de interações não-aditivas por apresentarem uma proporção ainda elevada de indivíduos heterozigotos em torno de 50% para  $F_2$  e 37,5% para  $F_3$ . Por outro lado, linhas fixas possibilitam que a avaliação fenotípica das características em estudo seja mais precisa, porque permitem a avaliação na média do genótipo em vez de observações com base no indivíduo. Contudo, como são homozigotas, as linhas DH não permitem detectar variâncias de não-aditividade que não sejam proveniente de epistasia do tipo aditividade x aditividade.

Dois estudos publicados na literatura revelam também diferenças no mapeamento e estudo de herança genética em milho utilizando linhas fixas versus segregantes (AUSTIN et al., 2001; LI et al., 2008). Estes estudos, contudo, usaram linhas fixas  $F_{6:8}$  ou linhas avançadas de retrocruzamento em vez de linhas DH para as comparações. Austin et al. (2001) identificaram mais QTLs com a geração  $F_{6:8}$  do que com a  $F_{2:3}$ , atribuindo esses resultados ao fato de linhas  $F_{6:8}$  serem mais homozigotas e homogêneas, resultando na obtenção de dados fenotípicos mais precisos. Por outro lado, Li et al. (2008) identificaram mais QTLs na geração  $F_{2:3}$  do que na de linhas fixas e explicam que, em parte, os resultados podem ser atribuídos à perda de variabilidade genética no processo de desenvolvimento das linhas fixas e, em parte, aos QTLs de ação não-aditiva que não puderam ser detectados com linhas fixas. Estes estudos e os resultados do presente trabalho, comparando linhas DH com gerações segregantes  $F_2$  e  $F_3$ , indicam que ambas estratégias são complementares e devem ser consideradas para um entendimento mais completo da herança genética de características agrônômicas em milho.

Interação genótipo x ambiente atuando em ambas as características estudadas foi revelada pela estimativa das herdabilidades no sentido amplo em três locais do RS. Neste caso, as estimativas de  $h^2_a$  obtidas com híbridos DH-TC foram mais estáveis do que aquelas obtidas com híbridos  $F_3$ -TC para altura de planta e espiga. Smalley et al (2004) também encontraram diferenças significativas na estimativa de herdabilidades devido a efeito de local. Além disso, parte da diferença encontrada na estimativa de

herdabilidade, pelo método pai-progênie versus componentes da variância, é resultado das diferenças de um ano para ao outro. De forma geral, ficou evidente, no presente trabalho, a superioridade de linhas DH nestes estudos, revelando que parte dessa interação pode estar confundida com o erro experimental que advêm de uma menor precisão em trabalhar com linhas segregantes.

A baixa correlação entre desempenho *per se* das linhas F<sub>3</sub> e DH com o dos respectivos híbridos F<sub>3</sub>-TC e DH-TC observada para altura de planta e espiga alerta para a importância do melhorista estabelecer estratégias de seleção que levem em consideração não apenas o desempenho *per se* das linhas em desenvolvimento, mas o seu desempenho em combinações híbridas. Além disso, essas correlações parecem ser influenciadas pelo ambiente de avaliação dos híbridos e quanto esse difere daquele onde a seleção das linhas *per se* é feita. De forma geral, linhas DH tenderam a apresentar mais correlações significativas do que as segregantes entre desempenho *per se* e de híbridos. Contudo, as baixas correlações alertam também para a necessidade de avaliação de combinações híbridas no caso de linhagens DH serem utilizadas tanto no melhoramento como em estudos de herança genética de características agronômicas de herdabilidade moderada a alta, como altura de planta e espiga em milho.

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho leva a concluir que a herança de altura de planta e espiga em cinco cruzamentos de milho tropical, avaliadas em ambientes do Sul do Brasil, é moderada a alta, de ampla

segregação transgressiva e alta heterose em F<sub>2</sub>. Além disso, que o estudo da herança com o uso de duplo-haplóides versus linhas segregantes revela diferentes aspectos da variabilidade genotípica para altura de planta e espiga e em geral herdabilidades no sentido amplo e restrito de maior magnitude. O uso de linhas DH pode ser complementado por gerações segregantes ou por avaliações dos DHs em combinações híbridas, possibilitando assim a identificação dos componentes não-aditivos da herança genética.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

BAI, W.; ZHANG, H.; ZHANG, Z.; TENG, F.; WANG, L.; TAO, Y.; ZHENG, Y. The evidence for non-additive effect as the main genetic component of plant height and ear height in maize using introgression line populations. *Plant Breeding*, v. 129, p.376-384, 2010.

BELICUAS, P.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, L.V.; DUARTE, J.M.; MALUF, W.R.; PAIVA, E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids. *Euphytica*, v.156, p.95-102, 2007.

CHASE, S.S. Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Reviews*, v.35, p.117-167, 1969.

DEIMLING S.; RÖBER F.; GEIGER H.H. Methodik und genetic der in-vivo- haploidenimduktion bei Mais. *Vortrage für Pflanzenzüchtung*, v.38, p.203-204, 1997.

GORDILLO, A.; GEIGER, H.H. Alternative recurrent selection strategies using doubled haploid lines in hybrid maize breeding. *Crop Science*, v.48, p. 911-922, 2009.

IQBAL, M.; KHAN, K.; RAHMAN, H.; SHER, H. Detection of Epistasis for Plant Height and leaf area per Plant in Maize (*Zea mays* L.) from Generation means Analysis. *Maydica*, v.55, p.33-39, 2010.

LAN, H.J.; CHU, D. Study on the genetic basis of plant height and ear height in maize (*Zea mays* L.) by QTL dissection. *Hereditas*, v.27, p.925-934, 2005.

LI, Y.L.; DONG, Y.B.; NIU, S.Z.; CUI, D.Q. The genetic relationship among plant-height traits found using multiple-trait QTL mapping of a dent corn and popcorncross. *Genome*, v.50, p.357-364, 2007.

LI, Y.; DONG, Y.; NIU, S.; CUI, D.; WANG, Y.; LIU, Y.; WEI, M.; LI, X. Identification of agronomically favorable quantitative trait loci alleles from a dent corn inbred Dan232 using advanced backcross QTL analysis and comparison with the F<sub>2</sub>:3 population in popcorn. *Molecular Breeding*, v.21, p.1-14, 2008.

MAYOR, P. J.; BERNARDO, R. Doubled haploids in commercial maize breeding: one-stage and two-stage phenotypic selection versus marker-assisted recurrent selection. *Maydica*, v.54, p. 439-448, 2009a.

MAYOR, P.J.; BERNARDO, R. Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F<sub>2</sub> populations. *Crop Science*, v.49, p.1719-1725, 2009b.

SCHON, C.C.; DHILLON, B.S.; UTZ, H.F.; MELCHINGER, A.E. High congruency of QTL positions for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, v.120, p.321–332, 2010.

SMALLEY, M.D.; DAUB, J.L.; HALLAUER, A.R. Estimation of heritability in maize by parent-offspring regression. *Maydica*, v.49, p.221-229, 2004.

SWANSON-WAGNER, R.A.; JIA, Y.; DeCOOK, R.; BORSUK, L.A.; NETTLETON, D.; SCHNABLE, P.S. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.103, p.6805-6810, 2006.

UZAROWSKA, A.; KELLER, B.; PIEPHO, H.P.; SCHWARZ, G.; INGVARSDEN, C.; WENZEL, G.; LÜBBERSTEDT, T. Comparative expression profiling in meristems of inbred-hybrid triplets of maize based on morphological investigations of heterosis for plant height. *Plant Molecular Biology*, v.63, p.21-34, 2007.

WEGENAST, T.; LONGIN, C.F.H.; UTZ, H.F.; MAURER, H.P.; DHILLON, B.S.; MELCHINGER, A. E. Hybrid maize breeding with doubled haploids. V. Selection strategies for testcross performance with variable sizes of crosses S1 families. *Theoretical and Applied Genetics*, v.120, p.699-708, 2010.

WILDE, K.; BURGER, H.; PRIGGE, V.; PRESTERL, T.; SCHMIDT, W.; OUZUNOVA, M.; GEIGER, H. H. Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding*, v.129, p.181-185, 2010.

ZHANG, Z. M; ZHAO, M.J.; DING, H.P.; RONG, T.Z.; PAN, G.T. Quantitative trait loci analysis of plant height and ear height in maize (*Zea mays* L.). *Russian Journal of Genetics*, v.42, p.306-310, 2006.