

**RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO POR
MARCADORES SSRs EM MILHO**

ANTONIO GILSON GOMES MESQUITA

2002

ANTONIO GILSON GOMES MESQUITA**RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO POR MARCADORES SSRs EM
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia, área de concentração em
Genética e Melhoramento de Plantas, para a
obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Dr. Edilson Paiva

LAVRAS**MINAS GERAIS****2002**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Mesquita, Antônio Gilson Gomes

Retrocruzamento assistido por marcadores SSRs em milho / Antônio Gilson
Gomes Mesquita. -- Lavras : UFLA, 2002.

69 p. : il.

Orientador: Edilson Paiva.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Retrocruzamento. 3. Melhoramento genético vegetal. 4. Marcador
molecular. 5. Microssatélite. 6. SSR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1523

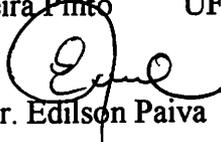
ANTONIO GILSON GOMES MESQUITA

**RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO POR MARCADORES SSRs EM
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia, área de concentração em
Genética e Melhoramento de Plantas, para a
obtenção do título de “Doutor”.

Aprovado em: 22/11/2002.

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Elto Eugênio Gomes e Gama	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto	UFLA


Dr. Edilson Paiva
Embrapa Milho e Sorgo
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

À minha mãe, Raimunda,
pelo amor, carinho, dedicação
e apoio em todas as etapas de minha vida.

A meu pai, Manoel,
pelo esforço, carinho e
luta árdua para o provimento de nosso sustento.

À Luciete, mãe de meus queridos filhos,
por todos os momentos de alegria e adversidade
que passamos juntos.

Aos meus maravilhosos e amados filhos, Brendon e Brayan,
por serem a razão de todo meu esforço, dedicação e amor.

Aos meus irmãos, Francisco e Cleide,
pelo apoio e reconhecimento.

À minha vovozinha Maria,
pelas orações e pela certeza da vitória.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado DEUS, por ter me dado força, discernimento, calma e tolerância nos momentos mais difíceis dessa longa caminhada.

À Universidade Federal do Acre, instituição da qual sou servidor, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À Universidade Federal de Lavras e em especial ao Departamento de Biologia, por oferecerem um dos mais bem conceituados cursos de doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas e por apresentarem um corpo docente de excelência.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Edilson Paiva, meu orientador, pelos ensinamentos, paciência, firmeza e admoestações.

Aos professores João Bosco, Magno Ramalho, César Brasil, Daniel Furtado e Lisete Davide, pelos ensinamentos repassados ao longo do curso.

À Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, pela amizade, treinamento e auxílio nas análises dos dados moleculares.

Aos amigos do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA), Ubiraci, Cristina, Miguel, Ronaldo, Silvia, Lili, Lilian, Edna, Renato, Célio, Nati, Charles, Alcione, Natália, Mariana, Martinele e Eduardo, pela amizade, carinho e auxílio nos trabalhos burocráticos e técnicos.

Ao amigo Fausto Sobrinho, pela amizade e ajuda nas análises estatísticas dos dados de campo.

Aos pesquisadores Elto Gama, Cleso Pacheco, Sidney Parentoni, Antônio Carlos de Oliveira e Manoel Xavier, pelos conselhos, ensinamentos e experiências de campo.

À equipe de melhoramento constituída por Davi, Orlando, Peninha, Luiz, Juca, Celso, José Neto, José Geraldo, Toninho, Joaquim, Antônio e José Augusto, pelo incansável apoio nos trabalhos realizados no galpão e nos campos experimentais.

Aos colegas do curso de doutorado: Maximilian, José Maria, Sidney, Marcos Ventura, Juliane, Juliana, Eduardo, Vanderley, Francislei, Carlos Ledo, Odair, Marilaine, Fábria Botelho e Joãozinho.

Ao Núcleo de Estudos em Genética (GEN), pelo apoio logístico e pelas oportunidades de reciclagem oferecidos.

A todos que aqui não foram citadas, mas que contribuíram, de alguma forma, para minha realização profissional.

E, finalmente, à Érika, uma pessoa maravilhosa que, em pouco tempo de convívio, me fez um homem muito feliz.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Obtenção de linhagens endogâmicas.....	03
2.2 Método dos retrocruzamentos.....	04
2.3 Marcadores moleculares no melhoramento vegetal.....	08
2.3.1 Marcadores SSRs e sua utilização em programas de retrocruzamento.....	10
2.4 Topcross.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material genético	18
3.2 Obtenção e seleção de plantas nos retrocruzamentos.....	19
3.3 Genotipagem com marcadores microssatélites (SSRs).....	23
3.4 Obtenção e avaliação dos híbridos topcrosses.....	24
3.5 Análise estatística dos híbridos <i>topcrosses</i>	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
4.1 Obtenção e seleção na primeira geração de retrocruzamento assistido.....	28
4.2 Obtenção e seleção na segunda geração de retrocruzamento assistido.....	31
4.3 Análise dos híbridos <i>topcrosses</i>	35
4.3.1 Comparações entre médias dos híbridos <i>topcrosses</i>	47
5 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	60

RESUMO

MESQUITA, A. G. G. **Retrocruzamento assistido por marcadores SSRs em milho.** 2002. 69 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar a possibilidade de se utilizar marcadores microssatélites para auxiliar a seleção em programas de retrocruzamento em milho. A característica escolhida foi altura de espiga (AE) e, para tal, foram selecionadas duas linhagens contrastantes. A linhagem L11 foi selecionada como genitor recorrente por apresentar uma excelente capacidade geral de combinação para produção de grãos e uma alta inserção da espiga; a linhagem L13 foi escolhida como genitor doador por possuir uma baixa inserção de espiga. Obteve-se a geração F_1 e o primeiro ciclo de retrocruzamento que foi fenotipicamente avaliado quanto a AE. Usando como critério de seleção fenotípica um desvio padrão abaixo da média para AE, foram selecionadas 35 plantas para serem genotipadas com 27 marcadores microssatélites previamente selecionados. Utilizando-se esses marcadores moleculares, foram selecionadas cinco plantas com um desvio padrão acima da média de recuperação do genoma recorrente, sendo estas utilizadas na obtenção do segundo ciclo de retrocruzamento. Foram obtidas 241 plantas RC_2 que passaram pelo mesmo processo de seleção fenotípica e genotípica já mencionados anteriormente. No segundo ciclo de retrocruzamento, 31 plantas com menor altura de espiga foram genotipadas, selecionando-se sete que apresentavam maior proporção de recuperação do genoma recorrente. Em cada geração de retrocruzamento foram selecionadas, em média, oito plantas para comporem um topcross, usando a linhagem L161 como testador. Trinta e três híbridos topcrosses foram avaliados em Goiânia, Janaúba e Sete Lagoas, utilizando-se o delineamento em blocos casualizados, com três repetições e uma testemunha comum (P30F33) intercalada a cada sete parcelas. Foram avaliadas as características AE e produção. Todos os híbridos obtidos tiveram produção superior à testemunha (P30F33), em todos os ambientes, mostrando o potencial produtivo dos materiais testados. Pôde-se constatar que programas de retrocruzamento assistidos por

* Comitê orientador: Dr. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador); Dra. Cláudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo; Dr. Elto Eugênio Gomes e Gama – Embrapa Milho e Sorgo; Dr. João Bosco dos Santos – UFLA; Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA.

marcadores são uma estratégia viável quando se deseja reduzir o tempo e aumentar a eficiência da seleção, uma vez que foram identificadas plantas com elevado grau de recuperação do genótipo recorrente nos ciclos iniciais do processo de retrocruzamento.

ABSTRACT

MESQUITA, A. G. G. **Assisted backcross in maize by SSR molecular markers**. 2002. 69 p. Thesis (Doctorate in Genetic and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

The present work was carried out with the objective of testing the possibility to use microsatellite markers as selection tools in maize backcross. The chosen characteristic was height of ear insertion (HEI) where two contrasting maize inbred lines were selected. Line L11 was chosen as recurrent parent due to its high general combining ability for grain yield and a high ear insertion, and line L13 was chosen as the donor parent due to its low ear height. The F1 generation and the first backcross cycle were obtained and the RC₁ plants were phenotypically evaluated for the trait HEI. One standard deviation below the average for HEI was applied as criterion for phenotypic selection. Thirty five plants were selected and genotyped with twenty-seven previously selected microsatellite markers. Five plants with one standard deviation above the recovery mean of the recurrent parent were selected. Two hundred and forty one RC₂ plants were obtained from them and were subjected to the same phenotypic and genotypic analysis described above. Thirty-one RC₂ individuals were phenotypically selected for their higher ear insertion and among them 7 were genotypically selected for presenting the higher proportion of recovery of the recurrent parent. In each backcross generation around eight plants were selected to be used in a topcross, where inbred line L161 was used as the male tester. Thirty-three topcross hybrids were evaluated in Goiânia, Janaúba and Sete Lagoas, using a randomized complete block design, with three replications and a common check (P30F33) intercalated at ever seven rows. HEI and grain yield, data were also collected. All the experimental hybrids outyielded the check (P30F33) at all the environments tested, showing up their high yielding potential. It was showed that assisted backcross in maize by microsatellite markers is a viable strategy for time saving and increasing selection efficiency. The assisted maize microsatellite backcross allowed the identification of plants

* Guidance Committee: Dr. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Major Professor); Dra. Cláudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo; Dr. Elto Eugênio Gomes e Gama – Embrapa Milho e Sorgo; Dr. João Bosco dos Santos – UFLA; Dr. César Augusto Brasil Pereira Pinto – UFLA.

with high degree of recovery of the recurrent parent at the beginning cycles of the backcross process.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na agricultura têm sido obtidos, em grande parte, graças ao melhoramento genético de plantas, com o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e adaptadas aos diversos ambientes. Dentre os métodos clássicos de melhoramento genético destaca-se o retrocruzamento, que possibilita a introgressão de uma ou poucas características de um genótipo doador e a recuperação das demais características favoráveis presentes no genitor recorrente. Em geral, as características com alta herdabilidade, que são controladas por um ou poucos genes, são mais facilmente transferidas por esse método.

Como estratégias adicionais e complementares aos métodos clássicos de melhoramento genético, pode-se contar, atualmente, com os marcadores moleculares, que exploram uma quantidade quase ilimitada de polimorfismos. Por não serem afetados pelas condições ambientais, nem pelos estádios de desenvolvimento das plantas, permitem a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis.

Dentre as aplicações dos marcadores moleculares, tem sido relatada com sucesso a sua utilização em programas de retrocruzamentos assistidos, tanto na identificação de indivíduos que apresentem maior proporção do genótipo recorrente, quanto na seleção daqueles que possuem um ou mais alelos de interesse a serem transferidos a partir do genitor doador. Com isso, tem sido obtida uma redução significativa no número de retrocruzamentos, levando a um ganho em tempo e recursos para a obtenção de genótipos superiores.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar a viabilidade de utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélite como ferramenta de auxílio à seleção em um processo de retrocruzamento visando à redução da altura de inserção da espiga em plantas de milho e confirmar a recuperação da capacidade produtiva da linhagem recorrente L11.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obtenção de linhagens endogâmicas

Os programas de melhoramento de milho necessitam, para seu sucesso, do desenvolvimento de linhagens elites que são utilizadas na obtenção de híbridos com alto desempenho produtivo. Na obtenção de linhagens superiores podem ser utilizados vários métodos: padrão, da cova única, genealógico, do híbrido críptico e dos monoplóides (Miranda Filho & Viégas, 1987).

O método padrão é o mais empregado, sendo os demais variações deste (Paterniani & Campus, 1999). Nesse método, são realizadas sucessivas autofecundações em plantas fenotipicamente selecionadas de variedades e/ou híbridos. São semeadas, em fileiras individuais, em torno de 30 sementes de cada espiga obtida, procedendo-se a autofecundação de duas a cinco plantas em cada progênie. À medida que as gerações de endogamia são avançadas, é feita a seleção fenotípica entre e dentro das família (Miranda Filho & Viégas, 1987).

No método da cova única, cada progênie é representada por uma única covas com três plantas, em vez de uma linha com várias plantas. Isso permite reduzir a área plantada e aumentar o número de progênies a serem avaliadas, aplicando uma maior intensidade de seleção.

O método genealógico é usado nos casos em que a seleção é efetuada dentro de uma população derivada de duas linhagens previamente selecionadas, de acordo com a capacidade combinatória, seguido da aplicação do método padrão.

Já o método dos híbridos crípticos consiste na avaliação de famílias de irmãos germanos, obtidos pelo cruzamento entre plantas prolíficas e não endogâmicas. Simultaneamente ao cruzamento, a segunda espiga é

autofecundada. As famílias de irmãos germanos são avaliadas em ensaios com repetição para identificar os melhores cruzamentos. As progênies S_1 correspondentes às melhores combinações são plantas aos pares e cruzadas para se obter a nova geração. Esse processo é repetido até que se atinja o grau desejado de homozigose nas linhagens a serem usadas na síntese de híbridos.

O método dos monoplóides é baseado na cultura de anteras, seguido de duplicação cromossômica para se obter plantas totalmente homozigotas em curto espaço de tempo. Tal metodologia não tem sido muito utilizada devido à baixa frequência de ocorrência de monoplóides.

De acordo com Hallauer (1990), somente cerca de 0,01% das linhagens obtidas é utilizada na produção de híbridos comerciais, sendo uma porcentagem muito baixa se comparada com o total produzido em um programa de melhoramento. Uma vez obtidas as linhagens elites, as mesmas podem ser recicladas pela introgressão de características de interesse ausentes nas mesmas e presente em outros genótipos. Normalmente, esta transferência é realizada pelo método dos retrocruzamentos (Souza, 2000). Segundo Miranda Filho & Viégas (1987), esse método é eficiente tanto para a transferência de alelos específicos quanto para caracteres quantitativos, permitindo a manutenção das principais características da cultivar ou linhagem.

As características comumente adicionadas aos genótipos elites, via retrocruzamento, são resistência a doenças e tolerância a estresses ambientais ou melhoria nas propriedades nutricionais.

2.2 Método dos retrocruzamentos

O método do retrocruzamento tem por objetivo a introgressão de uma característica mono ou oligogênica de um parental doador e a recuperação do genoma do parental recorrente. O esquema envolve o cruzamento de dois

genótipos, sendo um deles adaptado e produtivo e o outro contendo o caráter de interesse que se deseja introduzir. A partir do híbrido F₁ são realizados ciclos sucessivos de seleção e de retrocruzamentos com o genitor recorrente (Allard, 1971).

A proporção do genoma do genitor doador é reduzida pela metade em cada geração de retrocruzamento (Tabela 1). Desconsiderando os efeitos de ligação aos alelos em transferência, ou seja, a presença de alelos indesejáveis ligados aos de interesse, a porcentagem esperada do genoma do genitor recorrente (%GR) em cada geração de retrocruzamentos é calculada por:

$$\%GR = 100[1 - (0,5)^{n+1}], \text{ em que } n \text{ é o número de retrocruzamentos.}$$

A aplicação deste método para o melhoramento de plantas foi sugerido por Harlan & Pope (1922). Estes autores observaram que o retrocruzamento foi usado por muitos anos no melhoramento animal com o objetivo de fixar caracteres comercialmente desejáveis e que poderia ser aplicado ao melhoramento genético de cereais como a cevada. Eles observaram que esse método havia sido negligenciado em programas que tinham por objetivo a produção de progênes específicas. Assim, foi possível sugerir que o processo de retrocruzamento seria de maior valor do que o procedimento mais usual de se selecionar durante o período de autofecundação após a hibridação (Fehr, 1987). Foi também em 1922, que Briggs iniciou um extensivo programa de retrocruzamento para desenvolver variedades de trigo resistentes à cárie, causada pelo fungo *Tilletia indica* (Briggs, 1930). Ele salientou que, dentro de certos limites, o método dos retrocruzamentos obedecia aos princípios do método científico, uma vez que as características morfológicas e agrônômicas da variedade melhorada poderiam, se assim fosse desejado, ser novamente obtidas utilizando-se as mesmas etapas, ou seja, utilizando-se as linhagens parentais poderia-se reconstruir o genótipo resistente (Briggs, 1930; Allard, 1971).

TABELA 1 – Recuperação esperada do genoma do genitor recorrente (GR) durante as sucessivas gerações de retrocruzamentos.

Gerações	% GR
F ₁	50,0000
RC ₁	75,0000
RC ₂	87,5000
RC ₃	93,7500
RC ₄	96,8750
RC ₅	98,4375
RC ₆	99,2188
RC ₇	99,6094

As características com alta herdabilidade, que são controladas por um ou poucos genes, são mais facilmente transferidas por esse método. Porém, quando o número de genes é muito elevado, necessita-se de uma população com grande número de indivíduos, o que dificulta aplicação do método de retrocruzamento (Borém, 1998). Quanto maior for o número de características a serem introgridas, maior será a complexidade e o tempo requeridos para a condução de um programa baseado em retrocruzamento. Assim, quando se deseja transferir duas ou mais características, pode-se lançar mão da estratégia seqüencial, paralela ou simultânea. Na primeira, transfere-se uma característica de cada vez; na segunda, conduzem-se dois subprogramas paralelos, nos quais as características são transferidas independentemente, originando, ao final, linhagens quase isogênicas que são cruzadas, permitindo selecionar-se progênies com ambas as características de interesse. Já na simultânea, as características são transferidas de uma só vez, requerendo o uso de grandes populações segregantes (Allard, 1971; Borém, 1998).

Uma vez obtidas as gerações de retrocruzamentos, as progênies resultantes apresentarão heterozigose para os alelos sob transferência e homozigose para os demais. É necessária uma geração de autofecundação após o

último ciclo, a fim de que os descendentes se tornem completamente homozigotos, principalmente para os alelos em transferência, resultando em uma nova versão do material usado como genitor recorrente. Caso os alelos em transferência sejam recessivos, as autofecundações devem ser feitas após cada ciclo de retrocruzamento (Fehr, 1987).

Para se definir a quantidade de gerações de retrocruzamentos que serão necessárias em um programa de melhoramento, deve-se considerar o grau desejado de recuperação do genitor recorrente, a divergência entre os genitores, a intensidade de seleção praticada e a ocorrência de ligação entre os genes que estão sendo introgrididos e os indesejáveis (*linkage drag*). O *linkage drag* ou arraste gênico foi quantificado molecularmente por Van Berloo et al. (2001) em linhagens quase isogênicas (NIL) de cevada. Os referidos autores concluíram que, mesmo com a recuperação satisfatória das características de interesse do genitor recorrente, a proporção de material genético indesejável que acompanha o gene em transferência é relativamente grande. A redução no arraste gênico se dá pela seleção de indivíduos que possuem o alelo de interesse e que são homozigotos para os locos marcadores originados do genitor recorrente, fortemente ligados à região selecionada (Frisch et al., 1999).

Os programas de retrocruzamentos têm sido, na maioria das vezes, conduzidos no sentido de se obter cultivares resistentes a doenças (Ahmadi et al., 2001). Deve-se salientar que esse método também se adapta ao melhoramento de caracteres morfológicos, fisiológicos e quantitativos de herança relativamente simples, tais como precocidade, altura de planta, tamanho e forma de sementes. As características podem ser introduzidas, partindo de germoplasma exótico (Hoffbeck et al., 1995) ou de materiais transgênicos (Openshaw et al., 1994).

O sucesso do método dos retrocruzamentos depende da escolha de um genitor recorrente que apresente perspectiva de longa vida útil, ou seja, um material que apresente ampla adaptabilidade e estabilidade genotípica, da característica de interesse a ser transferida apresentar herança simples e de fácil identificação e do uso de um número de gerações de retrocruzamentos necessários para a recuperação satisfatória do genótipo recorrente.

2.3 Marcadores moleculares no melhoramento vegetal

O melhoramento genético vegetal pode, atualmente, contar com o auxílio dos marcadores moleculares que, por fornecerem grande quantidade de polimorfismo de DNA e por não serem afetados pelas condições ambientais e nem pelos estágios de desenvolvimento das plantas, permitem a identificação precoce e precisa de indivíduos que apresentem uma melhor combinação de alelos favoráveis (Lanza et al., 2000). Pelo fato de apresentarem grande capacidade de cobertura do genoma, os atuais marcadores mostram-se como potenciais ferramentas para a avaliação da diversidade genética, manutenção dos bancos de germoplasma e seleção de genótipos em programas de melhoramento. Além disso, os marcadores moleculares têm sido utilizados na identificação de cultivares, na proteção dos direitos da propriedade intelectual dos melhoristas, na confirmação da pureza genética e na construção de mapas genéticos (Souza, 2001).

Para se realizar o registro de um determinado material genético são usados os descritores morfológicos como hábito de crescimento, forma da folha, resistência a doenças, cor das flores, ciclo, dentre outros. Com a aprovação da Lei 9456 de 25 de abril de 1997, Lei de Proteção de Cultivares, os marcadores moleculares tiveram sua importância reconhecida, principalmente para espécies com base genética estreita. Isso porque as mesmas são obtidas de cruzamentos

entre um grupo restrito de materiais geneticamente próximos, como é o caso da soja. Assim, a utilização de uma combinação de marcadores de DNA que possa caracterizar molecularmente uma variedade ou linhagem pode ser adotada na identificação de linhagens, cultivares e híbridos (Lanza et al., 2000).

A obtenção de mapas genéticos foi possível graças ao alto grau de polimorfismo identificado pelos marcadores. Uma vez obtidos os mapas genéticos saturados para as diversas espécies, tornou-se possível mapear genes de herança qualitativa e/ou quantitativa de interesse. Para mapear tais genes torna-se necessária a realização de cruzamentos entre genitores contrastantes para as características a serem mapeadas. A população segregante é então genotipada com um número suficiente de marcadores moleculares para se ter uma boa cobertura do genoma. De posse dos dados fenotípicos e genotípicos, faz-se uma correlação entre a presença de um ou mais marcadores e a expressão do caráter, utilizando-se testes estatísticos apropriados. Se ocorrer significância é porque há ligação entre o marcador e o loco envolvido na expressão da característica (Guimarães & Moreira, 1999; Souza, 2001).

A maioria dos caracteres agrônômicos de interesse econômico são controlados por um grande número de genes, o que dificulta sua manipulação. As regiões do genoma que apresentam locos gênicos associados a essas características quantitativas são denominadas de QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Os QTLs têm sido mapeados possibilitando fazer estimativas do número e da localização dos genes controladores das variações fenotípicas de uma dada característica, além de estimar a magnitude de seus efeitos e a interação entre QTLs. A detecção de QTLs por meio de marcadores moleculares depende da magnitude de seus efeitos, do tamanho da população em estudo e do nível de saturação do mapa genético. A associação entre alelos de marcadores moleculares e alelos de QTLs pode ser usada para selecionar, indiretamente, alelos favoráveis dos QTLs de interesse (Lanza et al., 2000).

Uma área na qual o uso de marcadores de DNA tem sido relatado com sucesso é na transferência de um ou mais alelos de interesse de um genitor não adaptado para genótipos elites. Considerando a diversidade alélica presente na natureza e nos bancos de germoplasma, tal procedimento abre novas perspectivas para a pesquisa baseada na seleção assistida por marcadores (Eathington, 1997; Ribaut & Betrán, 1999; Stuber et al., 1999).

Ao se considerar que os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos de forma mendeliana, acredita-se que seu uso na seleção assistida por marcadores (SAM) levaria à eliminação de certos aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, como o tempo gasto na seleção de indivíduos dentro das várias gerações segregantes, bem como o aumento de sua eficiência e na redução do número de ciclos utilizados na recuperação do genoma do pai recorrente. No entanto, o maior desafio é integrar as novas técnicas de marcadores moleculares aos programas de melhoramento e desenvolver estratégias eficientes de seleção assistida, visando à obtenção de genótipos superiores (Van Berloo & Stam, 1999).

2.3.1 Marcadores SSR e sua utilização em programas de retrocruzamento

No genoma das espécies eucarióticas são encontradas várias classes de seqüências repetidas sendo que uma delas consiste de repetições em tandem de 2 a 6 nucleotídeos, denominada microssatélite ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Senior et al., 1998). Nas espécies vegetais, os microssatélites são muito freqüentes e distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sendo amplamente utilizados na construção de mapas genéticos (Taramino & Tingey, 1996; Maki et al., 2000), no estudo da diversidade genética (Lu & Bernardo, 2001), na caracterização de genótipos elites (Pushpavalli et al., 2001), na proteção de cultivares (Smith & Senior, 2000) e na identificação de indivíduos com uma

baixa porcentagem do genoma indesejável do genitor doador (Frisch et al., 1999).

Os microssatélites apresentam-se como uma das classes de marcadores mais promissoras a serem empregadas nos programas de melhoramento de espécies cultivadas, uma vez que são marcadores co-dominantes e multialélicos, fornecendo, assim, um elevado nível de informação genética por loco (Beckman & Soller, 1990).

A técnica de SSR baseia-se na amplificação das seqüências repetidas, utilizando *primers* complementares às regiões conservadas que flanqueiam os microssatélites. Esta técnica, pelo fato de ser baseada em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), é de fácil execução e apresenta grande possibilidade de automação. Os produtos resultantes da amplificação são separados por eletroforese, sendo que o polimorfismo observado ocorre em função das pequenas diferenças de tamanho entre os segmentos amplificados (Beckman & Soller, 1990; Senior et al., 1998).

A maior limitação do método é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam as regiões altamente repetitivas ou microssatélites. Esta etapa requer a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com os microssatélites, metodologias eficientes para o *screening* das bibliotecas e seqüenciamento de DNA em larga escala, necessitando de laboratórios, com uma infra-estrutura bastante especializada (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Shultz et al., 2002). Várias espécies vegetais têm sido estudadas utilizando-se microssatélites, podendo ser citadas a soja (Narvel et al., 2000), o milho (Smith et al., 2000; Benchimol et al., 2001), o arroz (Temnykh et al., 2000), o trigo (Dograr et al., 2000; Singh et al., 2002), a cevada (Saghai-Marroof et al., 1984; Macaulay et al., 2001; Condon et al., 2002), a *Brassica* (Westman & Kresovich, 1999) e a alfafa (Diwan et al., 2000).

De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), a utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão via retrocruzamento é, talvez, a aplicação mais concreta dessa tecnologia no melhoramento de plantas. Segundo Frisch & Melchinger (2001), o retrocruzamento assistido por marcadores moleculares pode ser usado para a transferência de genes ou de regiões cromossômicas que contenham alelos favoráveis em programas de melhoramento e no desenvolvimento de linhagens quase isogênicas (NILs).

Young & Tanksley (1989) propuseram o conceito de representação gráfica genotípica para analisar os dados obtidos por marcadores moleculares em programas de retrocruzamento. Esta análise permite determinar a origem de cada segmento cromossômico, identificando os indivíduos que apresentam os alelos de interesse a serem transferidos, ligados ao menor número de alelos indesejáveis do genitor doador. Tal análise permite também calcular a proporção de recuperação do genoma do genitor recorrente em cada indivíduo da progênie do retrocruzamento. Atualmente, encontram-se disponíveis vários softwares, dentre eles o *Graphical Genotypes* - GGT (Van Berloo, 1999), que utiliza dados moleculares para avaliar a contribuição de cada genitor envolvido no cruzamento, facilitando a análise e a interpretação dos resultados, bem como a seleção dos indivíduos de interesse que apresentam uma maior proporção de recuperação do genoma recorrente.

Hospital et al. (1992), fazendo simulações com marcadores moleculares usando o genoma do milho, concluíram que os marcadores são úteis nos programas de introgressão de genes. Mostraram ainda que para se efetuar uma seleção assistida eficiente deve-se realizá-la o mais precoce possível, usando-se marcadores mais próximos ao gene de interesse. Procedendo-se dessa forma, pode-se obter um ganho de cerca de duas gerações de retrocruzamentos por ciclo de seleção. Assim, se a proporção de indivíduos selecionados for menor que

10%, o conteúdo do genoma recorrente dos indivíduos selecionados por meio de marcadores, após a terceira geração, é igual ou maior do que o esperado com base na seleção fenotípica realizada na quinta geração. Foi sugerido, ainda, que a densidade de três marcadores a cada 100 cM parece ser um bom número, em gerações precoces, para se obter uma satisfatória recuperação do genoma recorrente.

Opershaw et al. (1994) e Visscher (1996), mostraram também que para uma espécie possuindo 10 cromossomos entre 100 e 200 cM cada, a utilização, em média, de 8 marcadores por cromossomo, em uma população de 50 progênies, é possível reduzir de sete para três ciclos de retrocruzamento com a recuperação de 99% do genoma recorrente. Resultados semelhantes foram obtidos por Benchimol et al. (2001) que relataram o potencial uso de microssatélites como ferramenta auxiliar na introgressão do marcador polimórfico phi037 e na seleção de indivíduos RC₁ com maior proporção de recuperação do pai recorrente, em milho.

Visscher et al. (1996) utilizaram um modelo genético, assumindo que o genoma apresentava muitos genes de pequenos efeitos em fase de acoplamento que explicavam a variação observada na população. Os estudos de simulação indicaram que os marcadores foram eficientes para transferir alelos e para selecionar genótipos desejados em programas de retrocruzamentos. Os mesmos autores observaram que, ao usar um marcador espaçado de 10 a 20 cM, foi obtido um ganho de uma a duas gerações de retrocruzamentos em relação com a seleção apenas fenotípica. Frisch et al. (1999), também por meio de simulação, conseguiram resultados semelhantes, acrescidos a um ganho de duas a quatro gerações ao transferir um único alelo.

Yousef & Juvik (2002), utilizando seleção assistida por marcadores moleculares, tiveram êxito na introgressão de QTL ligados a um marcador

RFLP, para a característica emergência de plântulas, de um genitor doador endogâmico de milho doce. Os resultados gerados por esse estudo forneceram uma visão mais otimista, sugerindo que os QTLs benéficos introgridos podem exercer efeitos similares em outros *backgrounds* genéticos. O entendimento do *background* genético e a expressão dos QTLs são os elementos-chave na seleção de germoplasmas-alvo com grande expressão potencial dos alelos benéficos introgridos.

2.4 Topcross

Segundo Davis (1927), citado por Hallauer & Miranda Filho (1988), topcrosses são cruzamentos de linhagens com variedades de polinização aberta. De "forma mais ampla, topcross é o cruzamento realizado entre famílias ou linhagens e um genitor comum, que pode ser uma população, uma linhagem ou até mesmo um híbrido simples (Ramalho, 2000). Esse método tem sido usado pelos melhoristas, com muita eficiência, para avaliar a capacidade geral de combinação de linhagens endogâmicas em programas de melhoramento de híbridos, ou seja, para avaliar o valor genético dos indivíduos de uma população a ser melhorada.

Por não haver critérios bem definidos para se realizar uma boa escolha de testadores em um programa de melhoramento, essa etapa se torna um tanto difícil. Porém, existem evidências que demonstram que o cruzamento entre fontes não relacionadas expressam maior heterose, se comparadas com cruzamentos entre linhagens relacionadas (Hallauer, 1990). Muitos autores têm discutido sobre a escolha do melhor tipo de testador usado na determinação da capacidade de combinação (Matzinger, 1953; Lonquist & Rumbaugh, 1958; Rawlings & Thompson, 1962; Allison & Curnow, 1966). Segundo Hallauer & Lopes-Perez (1979), deve-se considerar, na escolha de testadores, algumas

possibilidades, como amplitude da base genética, frequência de alelos favoráveis, capacidade combinatória geral e específica e níveis de produtividade. Deve-se ainda considerar o estágio de desenvolvimento do programa, a disponibilidade de testadores, os tipos de materiais sob teste e os tipos de híbridos para os quais as linhagens serão usadas. Os mesmos autores indicaram que as vantagens do uso de testadores de base genética ampla teriam a menor influência devido à interação testador x ambiente e a menor influência devido à interação testador x linhagem.

No que se refere ao valor relativo dos testadores, vários autores são unânimes em considerar como testador mais apropriado aquele que discrimina com eficiência as linhagens sob teste. Assim, Matzinger (1953) e Hallauer (1975) propuseram que um testador ideal deveria incluir simplicidade no uso, informação para classificar corretamente o mérito relativo das linhagens e a maximização do ganho genético.

Lindstrom (1931), em seus ensaios de campo, foi um dos primeiros a observar e relatar que algumas linhagens se destacavam pelo seu comportamento em combinações híbridas, recomendando o uso do topcross para avaliação precoce de linhagens. O uso do topcross para avaliação do comportamento preliminar de linhagens, de acordo com Miranda Filho & Viégas (1987), se tornou um método de uso generalizado entre os melhoristas de milho. Tais autores indicaram ainda que o emprego de híbridos simples como testadores tem sido largamente utilizado, o que permite avaliar um grande número de linhagens e gerar informações para o uso imediato. Bellucci (1995) estudando populações derivadas de híbridos comerciais, concluiu que o topcross é um bom método, quando não se objetiva identificar cruzamentos específicos e que os híbridos comerciais são uma boa fonte de germoplasma para programas de melhoramento que visem obter cultivares com elevado potencial produtivo.

A avaliação da performance de linhagens é feita com base na capacidade de combinação, que é desvio de cada combinação híbrida em relação à média.

A CGC depende da diferença nas frequências alélicas das populações envolvidas e do tipo de ação gênica (efeitos aditivo e de dominância). Considerando um só loco, altas capacidades de combinação ocorrerão, em geral, em materiais com maior frequência de alelos favoráveis em relação às frequências alélicas dos “p” materiais utilizados. Já a CEC depende dos efeitos de dominância, epistáticos e da interação genótipo x ambiente, sendo nula se houver ausência de dominância. Além disso, baixa CEC ocorrerá quando dois materiais forem semelhantes ou com pequena divergência genética, isto é, apresentando altas ou baixas frequências alélicas nos mesmos locos (Venkovsky, 1987).

A diferença entre a CGC e CEC é atribuída fundamentalmente à base genética dos testadores. De acordo com Hallauer & Miranda Filho (1988), essas diferenças estão relacionadas diretamente com as frequências alélicas, uma vez que, em um testador de base genética ampla, as frequências alélicas para diferentes locos distribuem-se na amplitude de 0 a 1. Por outro lado, nos testadores de base genética estreita, as frequências alélicas são limitadas a 0 ou 1 nas linhagens, e a 0, 0,5 ou 1, nos híbridos simples.

Uma vez introduzido o conceito de CGC e CEC por Sprague & Tatum, (1942), surgiu uma nova abordagem para o uso do topcross e testadores. Assim, testadores com base genética ampla (sintéticos e variedades) testariam para CGC ou ação gênica aditiva, enquanto que testadores com base genética estreita (linhagens), testariam para CEC (Hallauer & Miranda Filho, 1988; Venkovsky, 1987). Tal fato foi inicialmente constatado por Lonquist & Roubough (1958), que estudaram testadores de bases genética ampla e estreita na avaliação de linhagens de milho. Estes autores concluíram que um testador de ampla base

genética seria apropriado para selecionar linhagens com alta CGC, sendo, posteriormente, feito o teste para CEC entre os materiais não selecionados.

Comparando testadores para avaliação da capacidade de combinação de linhagens de milho, Aguilar (1990) sugeriu que testadores para CGC devem ser aqueles relacionados à população que deu origem às linhagens que se quer avaliar. Na ausência destes, deve-se usar testadores com baixa frequência de alelos favoráveis em relação às linhagens das populações avaliadas, pois classificam melhor o mérito relativo das linhagens. Sugere ainda que o testador ideal para CEC será aquele que apresentar a maior heterose específica com a população.

De acordo com Souza (2000), o topcross é um procedimento muito utilizado na seleção precoce de linhagens, embora existam muitos resultados discordantes, decorrentes, principalmente, da escolha de testadores que não discriminam eficientemente as linhagens testadas. Assim, outros procedimentos que venham a contribuir no aumento de sua eficiência serão benéficos para obtenção de linhagens superiores, sendo os marcadores moleculares uma ferramenta que poderá vir a contribuir muito nesse sentido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

As linhagens utilizadas no presente trabalho L11 e L13 foram derivadas da variedade CMS-14C. Esta variedade foi sintetizada em 1982, a partir da recombinação de 90 progênies S_2 selecionadas entre 1.100 progênies obtidas da população Pool 25 e avaliadas em solo sob vegetação de cerrado com 45% de saturação de alumínio. A população Pool 25, introduzida do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), foi formada a partir da recombinação de materiais do México, América Central, Caribe, Equador, Colômbia e Argentina, apresentando boa adaptação às condições tropicais, bom potencial produtivo, porte intermediário, ciclo tardio, com grãos amarelos e duros (Souza, 1997). De 1982 a 1995, a população CMS-14C foi submetida a seis ciclos de seleção em condições de solos ácidos (Parentoni et al., 2001).

A escolha das linhagens L11 e L13 foi baseada na avaliação da capacidade de combinação das linhagens 11, 13, 16, 20, 22, 36, 40, 64, 723 e 724, que foram intercruzadas em um esquema dialélico. Os 45 híbridos simples produzidos, juntamente com quatro testemunhas, foram avaliados em dois ambientes (30 kg ha^{-1} e 130 kg ha^{-1} de nitrogênio), no delineamento látice quadrado com tratamentos comuns, com três repetições (Parentoni et al., 1996). Foram avaliadas várias características. No entanto, para o presente trabalho foram considerados, para a seleção das linhagens, apenas a altura da espiga (AE) e peso de espiga corrigido (PECOR).

A relação $\phi g/\phi s$, em que ϕg quantifica os efeitos aditivos dos genes ($QM_{CGC} - QM_{Resíduo}/P - 2$), sendo P o número de materiais envolvidos e ϕs que quantifica os efeitos de dominância ($QM_{CEC} - QM_{Resíduo}$), indica a importância relativa entre os efeitos gênicos. Esta relação, que é baseada no quadrado médio (QM), também foi utilizada como critério de seleção das duas linhagens parentais usadas no presente trabalho. Assim, para AE, a referida relação, que foi calculada com base na análise de variância do dialelo, apresentou um valor de 43,31. Isso indica que, para essa característica, a contribuição de genes com efeito aditivo é 43 vezes superior àquela, devido aos genes com efeitos não aditivos, e, enquanto que, para a produção, no grupo de linhagens estudadas, foi observado que a contribuição de genes de efeito não aditivo foi predominante.

A linhagem L13 foi escolhida como genitor doador por possuir uma baixa inserção de espiga, característica quantitativa, ser de alta herdabilidade e de fácil avaliação fenotípica a ser introgridida. Já a linhagem L11 foi selecionada como genitor recorrente por apresentar excelente capacidade geral de combinação para produção de grãos e alta inserção da espiga. Assim, as linhagens apresentavam características complementares e contrastantes, favorecendo a seleção das plantas de interesse nas gerações segregantes. Outro aspecto levado em consideração na escolha das linhagens foi o fato de ambas pertencerem à mesma população de origem (CMS 14-C) e, conseqüentemente, ao mesmo grupo heterótico (Parentoni et al., 2001).

3.2 Obtenção e seleção de plantas nos retrocruzamentos

Os ensaios para a obtenção e avaliação das plantas nas diferentes gerações de retrocruzamentos foram realizados na Área Experimental e no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG .

O híbrido simples obtido do cruzamento entre as linhagens L11 e L13 foi cruzado com o genitor recorrente (L11). As sementes RC₁ foram plantadas em fileiras de 5 metros, com espaçamento entre plantas de 0,20 metro e entre fileiras de 0,90 metro, sendo cada seis fileiras intercaladas por uma do genitor recorrente (macho). As 523 plantas RC₁ foram avaliadas quanto à altura da espiga (AE), altura da planta (AP), número de nós até a espiga (NNE) e número total de nós (NTN). As três últimas características foram utilizadas na seleção fenotípica, principalmente como critério para a eliminação de plantas com crescimento atípico. A análise estatística das 523 plantas RC₁, pelo teste de Shapiro-Wilk, a 5% de probabilidade, mostrou a ocorrência de distribuição normal, sendo obtidos uma média e um desvio padrão para a altura de espiga. Foram selecionadas fenotipicamente as plantas que apresentaram altura de inserção da espiga com um desvio padrão abaixo da média da população recorrente, sendo genotipadas com marcadores SSR. As plantas que apresentaram um desvio padrão acima da média de recuperação do genoma do genitor recorrente foram selecionadas e retrocruzadas com a L11. As sementes RC₂ foram plantadas, no ano agrícola 1999/2000, em duas fileiras de 6 metros, espaçadas entre si por 0,90 metro e entre plantas por 0,20 metro, de forma a se obter a densidade de 30 plantas/fileira, gerando 241 indivíduos RC₂, que foram avaliados e selecionados aplicando-se os mesmos critérios utilizados anteriormente. As plantas RC₂ selecionadas com base no fenótipo também foram genotipadas com marcadores SSR, sendo selecionadas aquelas que possuíam maior proporção de recuperação do genótipo recorrente e foram retrocruzadas com a linhagem L11.

As sementes RC₃ obtidas de cada uma das plantas RC₂ selecionadas foram semeadas em fileiras de 6 metros espaçadas entre si por 0,90 metro e entre plantas por 0,20 metro, com densidade média de 30 plantas/parcela, obtendo-se um total de 424 plantas, que foram avaliadas apenas fenotipicamente.

Foram conduzidos, em paralelo, dois esquemas de seleção: um correspondendo ao programa de retrocruzamento convencional, utilizando apenas critérios fenotípicos de seleção e o outro utilizando retrocruzamento assistido por marcadores moleculares, conforme esquema representado na Figura 1.

A identificação das plantas obtidas nos retrocruzamentos seguiram a seguinte nomenclatura:

- a) RC_1-2 : planta número 2 da geração RC_1 ;
- b) $RC_2-2-148$: planta número 148 obtida na segunda geração de retrocruzamento, descendente da planta RC_1-2 .

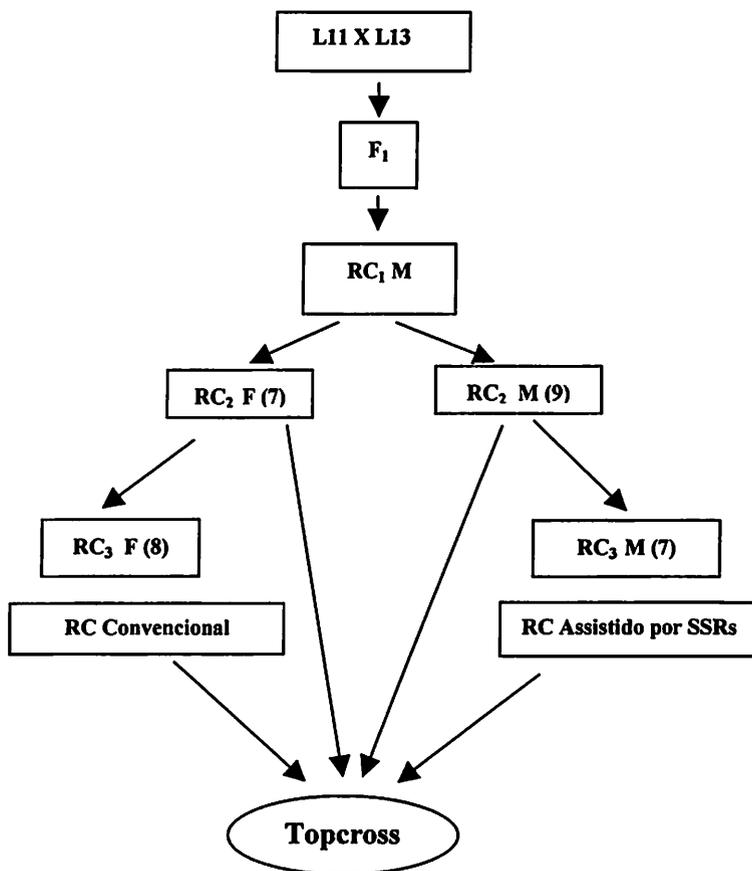


FIGURA 1 – Esquema dos retrocruzamentos convencional e assistido por marcadores SSR conduzidos em paralelo até a obtenção do topcross. A seleção fenotípica (F) foi realizada utilizando apenas dados fenotípicos de AE e a seleção assistida por marcadores (M) foi realizada com base nos dados moleculares dos SSRs. Os valores entre parênteses indicam o número de plantas selecionadas em cada geração de retrocruzamento que participaram do topcross.

3.3 Genotipagem com marcadores microsatélites (SSRs)

O DNA genômico foi extraído segundo a metodologia de Saghai-Marooif et al. (1984), sendo quantificado em géis de agarose 0,8% pela comparação com padrões de DNA de concentração conhecida. Os *primers* SSR específicos para o genoma do milho foram adquiridos da Research Genetics, Inc. (Huntsville, AL), cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (2002). As reações de PCR consistiram de 25 ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer*, 100 µM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.6), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ e 1U da enzima Taq polimerase em um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600 com uma etapa de 95°C/2 min, seguida de ciclos de 94°C/20 s, 68°C/20 s e 72°C/20 s, com a redução da temperatura de anelamento de 1°C a cada ciclo por 9 ciclos, até atingir 60°C. Após, realizarem-se os 25 ciclos com a temperatura de anelamento de 60°C e uma etapa final de 72°C/5 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 4% e visualizados sob luz ultravioleta em presença de brometo de etídio e fotodocumentados no Eagle Eye II (Statagene, La Jolla, CA).

Inicialmente, 342 *primers* de microsatélites foram avaliados com o objetivo de identificar polimorfismos entre as linhagens parentais (L11 e L13). Uma vez selecionados os *primers*, foram utilizados 27 na genotipagem das plantas RC₁ e 68 nas plantas RC₂, com uma média de 3 e 7 *primers* por cromossomo, respectivamente.

Os dados moleculares, obtidos pela amplificação dos alelos, foram codificados como A (homozigoto semelhante ao genitor recorrente) e H (heterozigoto), cuja segregação foi analisada pelo teste de qui-quadrado a 5%. A posição dos marcadores ao longo do genoma, em cM, foi obtida dos mapas genéticos de milho publicados no *Maize Genome Database* (2002). A

genotipagem gráfica dos indivíduos RC₁ e RC₂ foi realizada com o auxílio do programa *Graphical Genotypes* - GGT (Van Berloo, 1999). O programa GGT utiliza um algoritmo que leva em consideração a origem dos segmentos cromossômicos dos parentais. A forma pela qual o programa calcula a porcentagem de recuperação do genoma do genitor recorrente é baseada na expressão $A + 1/2 H$, em que A corresponde aos segmentos cromossômicos que foram recuperados com o processo de retrocruzamento, identificado regiões homocigotas para o par de *primers* utilizados, enquanto que H corresponde às regiões em heterocigose, apresentando os alelos de ambos os genitores.

3.4 Obtenção e avaliação dos híbridos *topcrosses*

As sementes remanescentes das linhagens L11 e L13, do F₁ e das plantas selecionadas fenotípica e genotipicamente nas gerações RC₂ e RC₃ foram semeadas e as plantas cruzadas com um testador comum (L161).

A linhagem L161 foi escolhida como testador por ser de grupo heterótico diferente dos materiais a serem testados, por apresentar alta e positiva capacidade geral de combinação para produção e, ainda, por apresentar, quando em combinação com outros materiais, tendência a elevar a altura de inserção da espiga (Sideney N. Parentoni - comunicação pessoal).

As sementes das linhagens parentais, dos sete indivíduos RC₂ selecionados no esquema convencional, dos nove indivíduos RC₂ assistidos por marcadores, dos oito RC₃ convencional, dos sete RC₃ assistidos e da testemunha, foram semeadas em fileiras de cinco metros, com espaçamento entre plantas de 0,20 metro e entre fileiras de 0,90 metro, cada uma delas intercaladas por uma fileira do testador. O testador foi plantado oito dias antes dos demais materiais genéticos, a fim de garantir a coincidência de florescimento na época da polinização, sendo usado como genitor masculino.

A avaliação dos híbridos topcrosses foi realizada em Goiânia, GO, Janaúba, MG e Sete Lagoas, MG, no ano agrícola de 2001/2002, cujas características geoclimáticas estão apresentadas na Tabela 2. Foram avaliados 33 híbridos topcrosses, utilizando-se o delineamento em blocos completos casualizados, com três repetições e uma testemunha comum intercalada a cada sete parcelas. O híbrido comercial da empresa Pioneer P30F33 foi escolhido como testemunha por apresentar altura de inserção da espiga de média a baixa, por ser praticamente insensível ao fotoperíodo, por apresentar alta performance produtiva e por já está estabelecido no mercado de sementes.

Cada parcela do experimento foi constituída de uma linha de 4 metros, com espaçamento de 0,90 metro entre fileiras e de 0,20 metro entre plantas. Foram semeadas 5 sementes/metro linear, de forma a se obter uma densidade de 20 plantas/fileira e cerca de 55.000 plantas/ha. As adubações de semeadura para cada experimento foram de 400 kg/ha da fórmula 4-14-8 (N, P₂O₅, K₂O). A adubação nitrogenada em cobertura foi feita aos 30 dias após emergência, utilizando-se 90 kg/ha de nitrogênio na forma de uréia. O controle das ervas daninhas foi realizado após a semeadura com o herbicida pré-emergente Primextra na quantidade de 4 litros/ha, complementado por uma capina manual aos 70 dias após emergência das plantas.

TABELA 2 – Características geoclimáticas dos locais utilizados na avaliação dos híbridos topcrosses.

	Goiânia	Janaúba	Sete Lagoas
Latitude	16°40' S	15°47'10" S	19°28' S
Longitude	49°15' O	43°18' O	44°15' O
Altitude	741,5 m	516,0 m	732,0 m
Precipitação média	1575,9 mm	873,5 mm	1325,7 mm
Temperatura média	23,2 °C	29,1 °C	24,6 °C

As características fenotípicas foram avaliadas em dez plantas de cada parcela. Para altura de espiga (AE), distância do solo até a inserção da primeira espiga; estande final (EF), número total de plantas na parcela por ocasião da colheita e peso de espiga despalhada (PED), peso de espigas das parcelas, em kg por parcela.

A correção dos dados referente ao peso de espigas despalhadas foi feita para 13% da umidade padrão utilizando a expressão:

$$P_{13\%} = PE (100 - UO)/(100-13), \text{ em que:}$$

$P_{13\%}$: peso de espigas despalhadas (kg/ha), corrigido para a umidade padrão de 13%;

PE: peso de espigas despalhadas observado;

UO: umidade observada.

Os dados de produção de grãos foram ajustados pela técnica de covariância para o estande ideal de 20 plantas/parcelas, utilizando-se como covariável o estande final, calculado pela seguinte expressão:

$$\hat{Y}_{ij} = Y_{ij} - \hat{b}(X_{ij} - X_{20}), \text{ em que,}$$

\hat{Y}_{ij} : produção corrigida na parcela com o tratamento i, no bloco j;

Y_{ij} : produção observada na parcela com o tratamento i, no bloco j;

X_{ij} : estande observado na parcela com o tratamento i, no bloco j;

X_{20} : estande ideal do experimento (20 plantas/parcela);

\hat{b} : coeficiente de regressão residual estimado pelas análises de variância (estande) e covariância (estande, produção).

3.5 Análise estatística dos híbridos topcross

Inicialmente foram realizados os testes de aditividade dos dados, normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, para verificar se não

havia nenhuma restrição quanto às pressuposições da análise de variância. Foram realizadas análises de variância individual para cada local, considerando as variáveis altura de inserção da espiga (AE), e produção (PROD), utilizando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = m + t_i + b_j + e_{ij}, \text{ em que,}$$

Y_{ij} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , no bloco j ;

m : média geral do experimento;

t_i : efeito do tratamento i , $i = 1, 2, \dots, t$;

b_j : efeito devido ao bloco j , $k = 1, 2, \dots, b$;

e_{ij} : erro experimental associado à observação Y_{ij} , NID $(0, \sigma^2)$.

As análises de variâncias conjuntas foram realizadas para todas as características avaliadas, considerando os três locais, segundo Ramalho et al. (2000), de acordo com o modelo:

$$Y_{ijk} = m + t_i + b_{j(k)} + l_k + tl_{ik} + e_{ijk}, \text{ em que,}$$

Y_{ijk} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i , no bloco j , no local k ;

m : média geral do ensaio;

t_i : efeito aleatório do tratamento i , $i = 1, 2, \dots, t$;

l_k : efeito do local k , $k = 1, 2, \dots, l$;

$b_{j(k)}$: efeito do bloco j , dentro do local k ; $j = 1, 2, \dots, b$;

$tl_{(ik)}$: efeito da interação do tratamento i com o local k ;

e_{ijk} : erro experimental médio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Obtenção e seleção na primeira geração de retrocruzamento assistido

A análise estatística das 523 plantas RC₁, pelo teste de Shapiro-Wilk, a 5% de probabilidade, mostrou a ocorrência de distribuição normal, com média de 1,22 m e desvio padrão 0,15 m para a altura de espiga. A normalidade dos dados é um pré-requisito para se realizar a análise de variância e mostrar que a amostra representa a população da qual foi selecionada. O critério de seleção fenotípica permitiu que se selecionassem 35 plantas (Tabela 3), cuja média de altura das espigas foi de $1,00 \pm 0,05$ m, com uma redução de 0,22 m quando comparada com a média da população. As 35 plantas selecionadas fenotipicamente foram genotipadas (Figura 2) utilizando-se 27 pares de *primers* SSRs (Tabela 1A), gerando uma média de recuperação do genoma recorrente de $74,02 \pm 5,92$ % (Figura 3), em concordância com a média esperada no RC₁, que é de 75%.

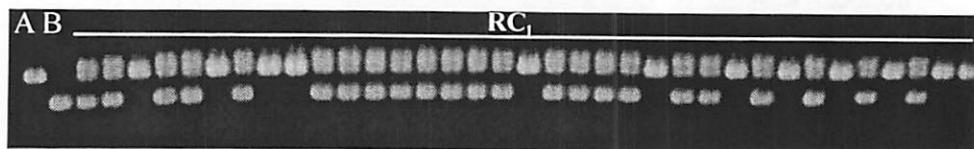


FIGURA 2 – Padrão de amplificação do loco *bnlg176*, usado na genotipagem das 35 plantas RC₁ selecionadas fenotipicamente. A: genitor recorrente (L11) e B: genitor doador (L13).

TABELA 3 – Plantas RC₁ selecionadas fenotipicamente e genotipadas com seus respectivos valores de altura de espiga (cm), e porcentagem de recuperação do genoma recorrente (% recuperação).

Planta RC ₁	AE (cm)	% recuperação
RC ₁ -30	1,05	85,50
RC ₁ -31 *	1,02	84,40
RC ₁ -29 * Ψ	1,02	83,30
RC ₁ -02 * Ψ	0,95	82,15
RC ₁ -22 * Ψ	0,98	80,30
RC ₁ -51 *	1,05	79,90
RC ₁ -54 Ψ	1,05	79,65
RC ₁ -18 Ψ	1,05	79,45
RC ₁ -44 Ψ	0,98	79,00
RC ₁ -17 Ψ	0,97	77,75
RC ₁ -26	1,03	77,30
RC ₁ -04 Ψ	1,00	77,20
RC ₁ -20	1,05	76,75
RC ₁ -40	1,05	76,75
RC ₁ -32	1,00	76,40
RC ₁ -59	0,93	76,10
RC ₁ -14	0,90	75,35
RC ₁ -67	0,97	75,30
RC ₁ -07	1,00	74,25
RC ₁ -77	1,05	72,45
RC ₁ -64	0,90	71,90
RC ₁ -47	0,98	70,75
RC ₁ -45	1,03	70,65
RC ₁ -48	1,00	70,40
RC ₁ -63 Ψ	1,03	70,05
RC ₁ -94	1,05	69,85
RC ₁ -03	1,00	69,65
RC ₁ -86	1,05	67,30
RC ₁ -28	1,05	67,05
RC ₁ -08	1,00	66,75
RC ₁ -34	0,83	66,55
RC ₁ -316	1,05	66,35
RC ₁ -374	1,05	65,50
RC ₁ -324	1,05	65,15
RC ₁ -382	1,05	63,60

*Plantas RC₁ selecionadas para a obtenção do segundo ciclo de retrocruzamento.

Ψ Plantas RC₁ retrocruzadas que participarão do topcross.

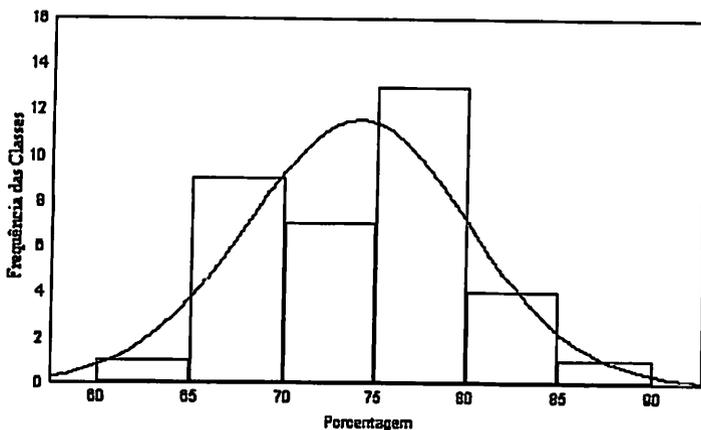


FIGURA 3 – Porcentagem de recuperação do genoma recorrente dos 35 indivíduos RC_1 genotipados com 27 marcadores SSRs, apresentando uma média de 74% e distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($W= 0,9570$).

Usando como critério de seleção genotípico um desvio padrão (5,92%) acima da média de recuperação do genótipo do genitor recorrente (74,02%), foram selecionadas cinco plantas RC_1 (Tabela 3). A média de recuperação do genótipo recorrente das plantas selecionadas foi de 82,03%, o que equivale a um avanço de, aproximadamente, dois ciclos de retrocruzamento convencional. Portanto, é de se esperar que as progênies obtidas a partir destas plantas selecionadas genotipicamente apresentem maior semelhança fenotípica com o genitor recorrente (L11), exceto para a característica sob transferência (baixa inserção de espiga). Foi identificada uma planta com 85,5% de recuperação (RC_1-30) que, por não ter produzido sementes suficientes, não foi utilizada nas gerações subsequentes.

As cinco plantas selecionadas genotipicamente apresentaram uma média de altura de espiga (1,00 m) igual à das 35 plantas selecionadas fenotipicamente,

indicando que os alelos responsáveis por essa característica foram mantidos nas plantas com maior recuperação do genótipo recorrente.

4.2 Obtenção e seleção na segunda geração de retrocruzamento assistido

A segunda geração de retrocruzamento assistido por marcadores foi obtida a partir das cinco plantas genotipicamente selecionadas no RC₁ (Tabela 3). A população RC₂ foi constituída por 241 plantas, cuja análise estatística referente aos dados fenotípicos revelou haver distribuição normal da característica AE, apresentando uma média de $0,83 \pm 0,10$ m. As demais características também foram analisadas e apresentaram semelhante distribuição. Aplicando-se o mesmo critério de seleção de um desvio padrão abaixo da média da AE da população, foram selecionadas 31 plantas RC₂ (Tabela 4), cuja média de altura da espiga foi de $0,70 \pm 0,06$ m.

As 31 plantas RC₂ selecionadas foram genotipadas utilizando-se 68 pares de *primers* SSRs (Tabela 2A), com uma média de 6,8 marcadores por cromossomo e uma distância média de 14 cM entre os marcadores. Dentre os 27 pares de *primers* utilizados na genotipagem das plantas RC₁, aqueles que identificaram indivíduos heterozigotos foram também utilizados na genotipagem dos indivíduos RC₂. Na Figura 4 é apresentado um *primer* com padrão monomórfico para todos os indivíduos RC₂, indicando ser aquela uma região genômica já fixada em todos os indivíduos selecionados. Os indivíduos genotipados apresentaram uma média de recuperação do genótipo recorrente de $91,98 \pm 3,89\%$ (Figura 5), enquanto que a média esperada no retrocruzamento convencional é de 87,5%. Tal ganho é plenamente justificável, considerando que as plantas que deram origem ao segundo ciclo de retrocruzamento já apresentavam, em média, 82,01% de recuperação do genótipo recorrente.

TABELA 4 – Plantas RC₂ genotipadas com marcadores SSRs e suas respectivas alturas de espiga (AE) e porcentagens de recuperação do genoma do genitor recorrente (% recuperação).

Plantas RC ₂	AE	% Recuperação
RC ₂ -31-148 *	0,74	98,20
RC ₂ -31-156 *	0,70	98,20
RC ₂ -51-213 *	0,74	96,85
RC ₂ -31-171 *	0,75	96,50
RC ₂ -31-170 *	0,70	95,85
RC ₂ -31-159 *	0,75	95,35
RC ₂ -31-188 *	0,75	95,35
RC ₂ -31-150 *	0,70	95,25
RC ₂ -2-37 **	0,60	94,95
RC ₂ -31-164	0,73	94,65
RC ₂ -31-161	0,70	94,50
RC ₂ -22-82	0,72	94,10
RC ₂ -22-83	0,70	93,15
RC ₂ -29-115	0,75	93,05
RC ₂ -31-187	0,75	93,05
RC ₂ -22-85 **	0,64	92,80
RC ₂ -51-232	0,75	92,30
RC ₂ -31-168 **	0,65	91,60
RC ₂ -31-190 **	0,63	91,60
RC ₂ -31-191 **	0,56	91,15
RC ₂ -2-36 **	0,60	90,15
RC ₂ -2-7	0,67	89,65
RC ₂ -51-204	0,75	88,75
RC ₂ -51-239	0,70	88,70
RC ₂ -2-15	0,75	88,05
RC ₂ -29-139 **	0,60	87,80
RC ₂ -2-22 **	0,65	87,65
RC ₂ -29-112	0,72	87,10
RC ₂ -22-41	0,75	86,40
RC ₂ -51-240	0,70	84,75
RC ₂ -29-104	0,75	84,00

* Plantas RC₂ selecionadas com base na avaliação genotípica que participarão do topcross.

** Plantas RC₂ selecionadas fenotipicamente que participarão do topcross.

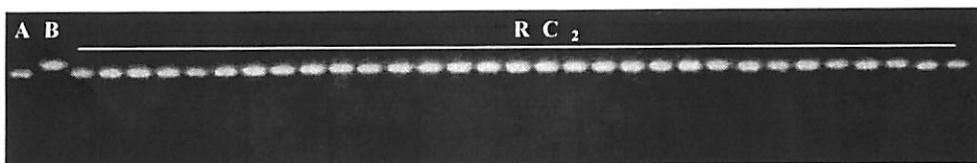


FIGURA 4 – Padrão de amplificação do loco phi037 das 31 plantas RC₂ selecionadas fenotipicamente, sendo A: o genitor recorrente (L11) e B: o genitor doador (L13).

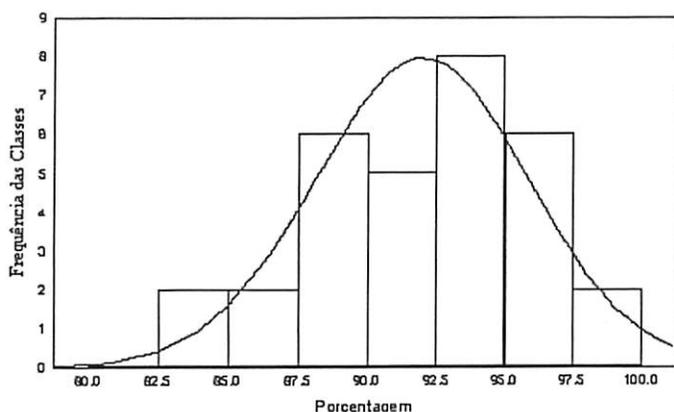


FIGURA 5 – Porcentagem de recuperação do genoma recorrente dos 31 indivíduos RC₂ genotipados com 68 marcadores SSRs apresentando uma média de 91,98% e distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($W = 0,9593$).

Os dados moleculares obtidos no presente trabalho mostraram, no RC₁, um ganho de quase duas gerações de retrocruzamento (82,01%), ao passo que, no RC₂, obteve-se uma recuperação de 96,44%, valor este próximo a quatro gerações de retrocruzamentos. Duas plantas apresentaram proporção de recuperação de 98,20% (Figura 6). Tal valor equivale a uma proporção de recuperação do genoma do pai recorrente a ser obtida no quinto ciclo de retrocruzamento, representando um ganho de três ciclos, em relação ao retrocruzamento convencional. Estas informações são concordantes com os

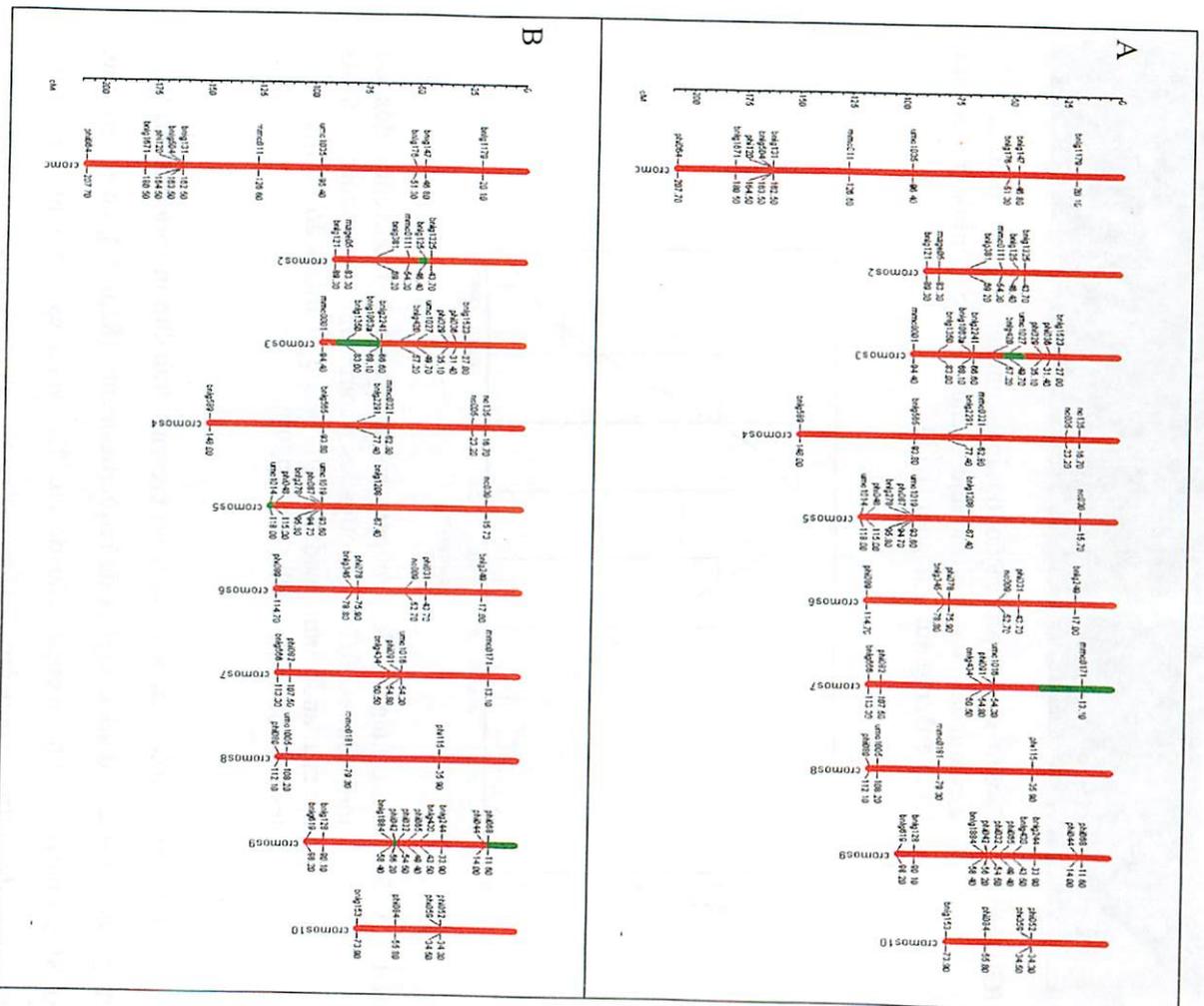


FIGURA 6 – Representações genótipicas das plantas RC₂-31-148 (A) e RC₂-31-156 (B) que apresentaram 98,20% de recuperação do genótipo recorrente. As regiões cromossômicas em vermelho estão em homocigose para o genitor recorrente e em verde estão em heterocigose.

resultados obtidos por Opershaw et al. (1994), que também obtiveram um ganho de três gerações em termos de recuperação do genoma recorrente, utilizando retrocruzamento assistido por marcadores. Resultados semelhantes foram obtidos por Visscher et al. (1996) e por Fisch et al. (1999), que conseguiram alto grau de recuperação do genoma recorrente com um ganho de uma a duas gerações de retrocruzamento, ao usarem marcadores SSRs espaçados de 10 a 20 cM.

Foram utilizados no segundo ciclo de retrocruzamento, em média, sete pares de *primers* por cromossomo, com uma distância entre eles em torno de 14 cM. Essa densidade de marcadores está coerente com o sugerido por estudos de simulação publicados na literatura (Opershaw et al., 1994; Visscher et al., 1996; Fisch et al., 1999) .

Na primeira geração de retrocruzamento, houve uma redução significativa na média da altura de espigas em torno de 18,5%. Já no segundo ciclo, essa redução foi de cerca de 15,66%, totalizando uma redução média de 17,08%, quando comparada com a média da população original. Isso demonstra que ocorreu a transferência dos alelos de interesse e que a seleção fenotípica foi eficiente para essa característica.

4.3 Análise dos híbridos topcrosses

Para efeito de comparações quanto aos ganhos obtidos pela seleção assistida por marcadores SSRs em relação à seleção fenotípica, foram selecionadas plantas de cada uma das gerações de ambos esquemas de retrocruzamento, conforme a Tabela 5. No retrocruzamento convencional, a seleção foi realizada apenas com base em dados fenotípicos, sendo selecionadas as plantas com menor altura de espiga. No retrocruzamento assistido por

marcadores, além da seleção fenotípica, as plantas foram genotipadas e selecionadas aquelas com maior proporção de recuperação do genoma recorrente.

Com o objetivo de avaliar a capacidade específica de combinação (CEC) e confirmar se os ciclos de retrocruzamentos haviam sido suficientes para recuperar a capacidade produtiva do genitor recorrente (L11), foi realizado um topcross com os 33 materiais selecionados nos dois ciclos de retrocruzamento (Tabela 5), usando como testador a linhagem L161.

Os resultados das análises de variância dos 33 híbridos topcrosses quanto a AE e PROD nos três locais estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Os coeficientes de variação experimental (CVe) para altura de espiga oscilaram entre 3,99% e 6,32%, indicando que houve uma boa precisão na condução dos experimentos. Para peso de espiga despilhada os CVe variaram de 12,29% a 13,96%, indicando uma precisão média, segundo Scapim et al. (1995). Dentre os fatores que podem ter contribuído para a menor precisão experimental da característica produção está a sua complexidade genética, sendo altamente influenciada pelas condições ambientais. Observou-se a ocorrência de variabilidade para as características altura de espiga e produção, mostrando o comportamento diferenciado dos híbridos topcrosses nos vários ambientes. Tal fato pode ser notado pela significância dos quadrados médios dos tratamentos e pela observação da distribuição de freqüências das médias em cada local, que é apresentada nas Figuras 1A a 3A.

TABELA 5 – Plantas selecionadas nas gerações de retrocruzamento e que participaram na obtenção dos híbridos topcrosses.

Tratamentos	Materiais	Origem	
1	L11	País	
2	L13		
3	L161	Testador	
4	RC ₁ -2	(9) RC ₁ M	
5	RC ₁ -17		
6	RC ₁ -18		
7	RC ₁ -22		
8	RC ₂ -29		
9	RC ₁ -4		
10	RC ₁ -63		
11	RC ₁ -44		
12	RC ₁ -54		
13	RC ₁ -45		(7) RC ₁ F
14	RC ₁ -77		
15	RC ₁ -44		
16	RC ₁ -47		
17	RC ₁ -59		
18	RC ₁ -64		
19	RC ₁ -67		
20	RC ₂ -31-148	(7) RC ₂ M	
21	RC ₂ -31-150		
22	RC ₂ -31-156		
23	RC ₂ -31-159		
24	RC ₂ -31-170		
25	RC ₂ -31-188		
26	RC ₂ -51-213		
27	RC ₂ -2-22	(8) RC ₂ F	
28	RC ₂ -2-36		
29	RC ₂ -2-37		
30	RC ₂ -22-85		
31	RC ₂ -29-139		
32	RC ₂ -31-168		
33	RC ₂ -31-190		
34	RC ₂ -31-191		
35	P30F33		Testemunha

M: plantas selecionadas com base nos marcadores SSR.

F: plantas selecionadas com base nas características fenotípicas.

(): número de plantas selecionadas em cada retrocruzamento.

TABELA 6 – Resumo da análise de variância para a característica altura de espiga em Goiânia, Janáuba e Sete Lagoas.

F. V.		G. L.		
Rep	2	24,8033 ^{ns}	31,9016 ^{ns}	352,8008 ^{**}
Trat	33	115,2880 ^{**}	287,7524 ^{**}	216,1778 ^{**}
Entre os grupos	3	349,4174 ^{**}	502,4108 ^{**}	453,8429 ^{**}
Dentro dos Pais	1	2147,0416 ^{**}	5221,5000 ^{**}	4347,0416 ^{**}
Dentro dos RC ₂	15	22,2007 ^{ns}	112,7158 ^{**}	43,9569 ^{ns}
Dentro dos RC ₃	14	19,7285 ^{ns}	76,8827 ^{ns}	54,7103 ^{ns}
Resíduo	66	25,4927	50,2514	64,4058
Cv (%)		3,9900	4,9500	6,3200
Média Geral (cm)		126,6879	143,3148	127,0528

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.
 ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.
 ns não significativo

TABELA 7 – Resumo da análise de variância para a característica peso de espigas despalhadas em Goiânia, Janáuba e Sete Lagoas.

F. V.		G. L.		
Rep	2	16218247,1843 ^{**}	2069877,8639 ^{ns}	3564837,3763 ^{ns}
Trat	33	3053835,0678 [*]	3751029,2006 [*]	3072320,7529 ^{ns}
Entre os grupos	3	444455,3890 ^{ns}	22146192,7668 ^{**}	14935039,2944 ^{ns}
Dentro dos Pais	1	6717665,2816 ^{ns}	12012302,9228 [*]	3004441,3014 ^{ns}
Dentro dos RC ₂	15	4348305,3919 [*]	45557,6277 ^{ns}	509100,8154 ^{ns}
Dentro dos RC ₃	14	1964353,2078 ^{ns}	3189265,5700 ^{ns}	3281465,2449 ^{ns}
Resíduo	66	2108597,7926	2235596,3388	2574875,5664
Cv (%)		12,5100	12,2900	13,9600
Média Geral (Kg ha ⁻¹)		11606,7407	12169,4839	11492,6376

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.
 ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.
 ns não significativo

A fonte de variação tratamentos foi desdobrada entre os grupos testados (pais, testemunha, RC₂ e RC₃) e dentro de cada um desses grupos. O primeiro grupo é composto pelas linhagens parentais topcruzadas com o testador (L161); o segundo contém a testemunha (P30F33), o terceiro contém os híbridos RC₂ e o quarto contém os híbridos RC₃.

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentadas as comparações entre as médias para altura de espiga e produção, com seus respectivos agrupamentos gerados pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade, em cada local. Nota-se que, para AE (Tabela 8), em Goiânia, foram formados três grupos, sendo que os híbridos topcrosses obtidos pelos cruzamentos das linhagens parentais com o testador se situam nos extremos desses grupos. A mesma tendência nos agrupamentos foi mantida em Janaúba, onde foram formados quatro grupos. Em Sete Lagoas, embora tenha sido formado apenas um grupo, verifica-se que os híbridos originados das linhagens parentais também se posicionaram nos extremos. Para produção (Tabela 9), o teste de média não detectou diferenças significativas nos três locais, indicando que os híbridos tiveram a mesma performance produtiva.

O resumo da análise de variância conjunta para todas as características avaliadas é apresentado na Tabela 10. Para a característica altura de espiga, a análise evidenciou que a precisão experimental, medida pelo C_{Ve} (5,16%), foi alta. Observou-se uma diferença altamente significativa para a fonte de variação Local, o que demonstra que a altura de espiga foi influenciada pelas condições ambientais. Entretanto, a interação entre locais e tratamentos para a característica AE foi não significativa, indicando que não houve mudanças na classificação dos materiais para essa fonte de variação nos diferentes locais. A Tabela 11 apresenta o resultado do teste de média Scott Knott, a 5% de probabilidade, utilizando as médias dos três locais, onde se destaca a formação de quatro grupos para essa característica. Os híbridos obtidos entre as linhagens

TABELA 8 – Comparação entre médias de AE (cm) nos três locais, com seus respectivos testes de média.

Tratamento	Materiais	Médias (AE)					
		Goiânia		Janaúba		Sete Lagoas	
1	L11	146.16	a3	178.66	a4	160.00	a1
2	L13	108.33	a1	119.66	a1	106.16	a1
4	RC ₁ -2 M	128.83	a2	137.93	a2	125.00	a1
5	RC ₁ -17 M	128.83	a2	150.33	a3	130.16	a1
6	RC ₁ -18 M	131.16	a2	148.66	a3	125.33	a1
7	RC ₁ -22 M	121.20	a2	156.33	a3	131.83	a1
8	RC ₂ -29 M	125.16	a2	141.50	a2	126.83	a1
9	RC ₁ -4 M	128.00	a2	146.33	a3	121.83	a1
10	RC ₁ -63 M	127.00	a2	147.90	a3	131.50	a1
11	RC ₁ -44 M	125.16	a2	135.50	a2	125.50	a1
12	RC ₁ -54 M	128.16	a2	137.33	a2	127.77	a1
13	RC ₁ -45 F	122.00	a2	139.00	a2	130.50	a1
14	RC ₁ -77 F	127.33	a2	141.83	a2	136.50	a1
15	RC ₁ -44 F	129.83	a2	134.66	a2	126.33	a1
16	RC ₁ -47 F	126.00	a2	136.50	a2	124.83	a1
17	RC ₁ -59 F	125.16	a2	138.00	a2	127.83	a1
18	RC ₁ -64 F	127.00	a2	142.20	a2	122.83	a1
19	RC ₁ -67 F	123.83	a2	143.66	a2	124.33	a1
20	RC ₂ -31-148 M	128.00	a2	148.33	a3	128.00	a1
21	RC ₂ -31-150 M	130.50	a2	148.66	a3	121.00	a1
22	RC ₂ -31-156 M	134.16	a2	150.50	a3	125.91	a1
23	RC ₂ -31-159 M	126.83	a2	140.00	a2	126.50	a1
24	RC ₂ -31-170 M	128.66	a2	139.50	a2	124.50	a1
25	RC ₂ -31-188 M	129.00	a2	144.16	a2	132.16	a1
26	RC ₂ -51-213 M	130.33	a2	136.16	a2	125.66	a1
27	RC ₂ -2-22 F	127.00	a2	140.00	a2	134.09	a1
28	RC ₂ -2-36 F	126.50	a2	147.33	a3	120.83	a1
29	RC ₂ -2-37 F	125.33	a2	149.50	a3	125.16	a1
30	RC ₂ -22-85 F	129.16	a2	152.33	a3	134.66	a1
31	RC ₂ -29-139 F	128.50	a2	150.26	a3	131.50	a1
32	RC ₂ -31-168 F	126.66	a2	140.16	a2	125.33	a1
33	RC ₂ -31-190 F	124.66	a2	141.16	a2	124.08	a1
34	RC ₂ -31-191 F	124.16	a2	144.83	a3	127.66	a1
35	P30F33	108.69	a1	123.73	a1	107.59	a1
Média Geral:		126.68		143.31		127.05	

* Teste de média pelo método Scott Knott, a 5% de probabilidade

M: seleção baseada em marcadores

F: seleção baseada no fenótipo

TABELA 9 – Tabela comparativa das médias de peso de espigas despalhadas (kg/ha) nos três locais, com seus respectivos testes de média.

Tratamento	Materiais	Médias (PROD)		
		Goiânia	Janaúba	Sete Lagoas
1	L11	10677.23 a1	14164.74 a1	12121.93 a1
2	L13	12793.46 a1	11334.86 a1	10706.67 a1
4	RC ₁ -2 M	13533.03 a1	13190.90 a1	12385.26 a1
5	RC ₁ -17 M	11684.76 a1	11986.79 a1	11690.31 a1
6	RC ₁ -18 M	11145.63 a1	11961.02 a1	12201.61 a1
7	RC ₁ -22 M	12571.86 a1	12485.76 a1	13338.28 a1
8	RC ₂ -29 M	11828.96 a1	12952.94 a1	11785.36 a1
9	RC ₁ -4 M	12937.66 a1	12279.61 a1	11303.33 a1
10	RC ₁ -63 M	10580.70 a1	10995.52 a1	10902.91 a1
11	RC ₁ -44 M	11341.43 a1	12179.22 a1	11748.28 a1
12	RC ₁ -54 M	11793.90 a1	10781.02 a1	9865.83 a1
13	RC ₁ -45 F	11477.66 a1	10593.60 a1	11463.64 a1
14	RC ₁ -77 F	13050.13 a1	12764.86 a1	11708.38 a1
15	RC ₁ -44 F	11099.26 a1	12687.57 a1	11545.05 a1
16	RC ₁ -47 F	12207.96 a1	12451.29 a1	11629.89 a1
17	RC ₁ -59 F	11325.50 a1	12416.15 a1	10633.23 a1
18	RC ₁ -64 F	10941.86 a1	10007.95 a1	10966.56 a1
19	RC ₁ -67 F	8341.30 a1	13023.21 a1	12052.81 a1
20	RC ₂ -31-148 M	11368.53 a1	11772.94 a1	11721.51 a1
21	RC ₂ -31-150 M	11408.83 a1	12499.48 a1	12163.64 a1
22	RC ₂ -31-156 M	11763.46 a1	13570.38 a1	10260.10 a1
23	RC ₂ -31-159 M	13741.43 a1	11891.41 a1	11444.84 a1
24	RC ₂ -31-170 M	10386.80 a1	13256.15 a1	12010.42 a1
25	RC ₂ -31-188 M	12284.76 a1	12411.80 a1	12248.28 a1
26	RC ₂ -51-213 M	11299.70 a1	12035.64 a1	11138.97 a1
27	RC ₂ -2-22 F	10635.50 a1	13251.80 a1	12180.10 a1
28	RC ₂ -2-36 F	11228.96 a1	10719.10 a1	9270.63 a1
29	RC ₂ -2-37 F	12137.23 a1	11594.23 a1	11568.59 a1
30	RC ₂ -22-85 F	12511.00 a1	12560.39 a1	13548.59 a1
31	RC ₂ -29-139 F	11221.00 a1	10697.69 a1	12380.10 a1
32	RC ₂ -31-168 F	11299.70 a1	13441.53 a1	10796.25 a1
33	RC ₂ -31-190 F	11458.53 a1	14301.29 a1	10772.81 a1
34	RC ₂ -31-191 F	11582.16 a1	11997.18 a1	12526.98 a1
35	P30F33	10969.18 a1	9504.32 a1	8670.45 a1
Média Geral		11606.74	12169.48	11492.63

* Teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade

M: seleção baseada em marcadores

F: seleção baseada no fenótipo

parentais (L11 e L13) e o testador se posicionaram nos grupos extremos, em relação à altura, apresentando esse comportamento em todos os ambientes testados. Isso indica que o testador foi eficiente em discriminar as linhagens parentais quanto a essa característica.

TABELA 10 – Resumo da análise de variância conjunta para as características altura de espiga (AE) e peso de espigas despalhadas (PROD).

F. V.	G. L.	QM	
		AE	PROD
Rep/Local	6	136,5019 ^{ns}	7284320,8082 ^{**}
Local (L)	2	9197,6304 ^{**}	3392944,1442 ^{ns}
Trat (T)	33	511,7194 ^{**}	4488171,1333 ^{**}
Entre os grupos	3	1232,7960 ^{**}	13404605,9782 ^{**}
Dentro dos Pais	1	11350,2222 ^{**}	2266114,7013 ^{ns}
Dentro dos RC ₂	15	63,2502 ^{ns}	4543859,4512 ^{**}
Dentro dos RC ₃	14	63,5268 ^{ns}	2676558,7853 ^{ns}
L x T	66	53,7494 ^{ns}	2694506,9440 ^{ns}
L x Entre os grupos	6	36,4376 ^{ns}	2060540,7361 ^{ns}
L x Dentro dos pais	2	182,6805 [*]	9734147,4022 ^{**}
L x Dentro dos RC ₂	30	57,8116 ^{ns}	2179552,1919 ^{ns}
L x Dentro dos RC ₃	28	43,8974 ^{ns}	2879262,6187 ^{ns}
Resíduo	198	46,7166	2306356,5660
CV (%)		5,16000	12,9200
Média Geral		132,3518	11756,2874

* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

^{ns} não significativo.

TABELA 11 – Teste de média da análise conjunta para altura de espiga (cm) e peso de espigas despalhadas (kg ha⁻¹) dos híbridos topcrosses.

Tratamento	Materiais	Média (Conjunta)			
		Altura de Espiga		Produção	
1	L11	161.61	a4*	12321.30	a2
2	L13	111.38	a1	11611.66	a2
4	RC ₁ -2 M	130.58	a2	13036.39	a2
5	RC ₁ -17 M	136.44	a3	11787.29	a2
6	RC ₁ -18 M	135.05	a3	11769.42	a2
7	RC ₁ -22 M	136.45	a3	12798.63	a2
8	RC ₂ -29 M	131.16	a2	12189.09	a2
9	RC ₁ -4 M	132.05	a2	12173.53	a2
10	RC ₁ -63 M	135.46	a3	10826.38	a1
11	RC ₁ -44 M	128.72	a2	11756.31	a2
12	RC ₁ -54 M	131.09	a2	10813.58	a1
13	RC ₁ -45 F	130.50	a2	11178.30	a1
14	RC ₁ -77 F	135.22	a3	12507.79	a2
15	RC ₁ -44 F	130.27	a2	11777.29	a2
16	RC ₁ -47 F	129.11	a2	12096.38	a2
17	RC ₁ -59 F	130.33	a2	11458.29	a2
18	RC ₁ -64 F	130.67	a2	10638.79	a1
19	RC ₁ -67 F	130.61	a2	11139.10	a1
20	RC ₂ -31-148 M	134.77	a3	11620.99	a2
21	RC ₂ -31-150 M	133.38	a3	12023.98	a2
22	RC ₂ -31-156 M	136.86	a3	11864.65	a2
23	RC ₂ -31-159 M	131.11	a2	12359.22	a2
24	RC ₂ -31-170 M	130.88	a2	11884.45	a2
25	RC ₂ -31-188 M	135.11	a3	12314.94	a2
26	RC ₂ -51-213 M	130.72	a2	11490.77	a2
27	RC ₂ -2-22 F	133.69	a3	12022.46	a2
28	RC ₂ -2-36 F	131.55	a2	10406.23	a1
29	RC ₂ -2-37 F	133.33	a3	11766.68	a2
30	RC ₂ -22-85 F	138.72	a3	12873.32	a2
31	RC ₂ -29-139 F	136.75	a3	11432.93	a2
32	RC ₂ -31-168 F	130.72	a2	11845.82	a2
33	RC ₂ -31-190 F	129.97	a2	12177.54	a2
34	RC ₂ -31-191 F	132.22	a2	12035.44	a2
35	P30F33	113.34	a1	9714.65	a1
Média Geral		132.35		11756.28	

* Teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

M: Retrocruzamento assistido por marcadores.

F: Retrocruzamento clássico.

Ainda com relação à característica AE (Tabela 10), houve diferença altamente significativa para fonte de variação tratamentos, indicando que pelo menos um híbrido topcross difere dos demais nos ambientes avaliados. Para a fonte de variação entre grupos de tratamentos, a análise revelou alta significância, indicando que pelo menos um grupo teve desempenho diferenciado nos vários locais. A confirmação desse fato é a alta significância na fonte de variação dentro dos híbridos obtidos com as linhagens parentais, mostrando que os mesmos tiveram altura de espiga diferenciada nos três locais. Já dentro dos RC₂ e dentro dos RC₃, não ocorreu resultado significativo, indicando que tiveram comportamento semelhante nos locais estudados.

Houve interação significativa entre os locais e os híbridos obtidos com as linhagens parentais para altura de espiga, indicando que os dois híbridos não tiveram desempenho coincidente nos três locais para essa característica. A Figura 7 apresenta o tipo simples de interação entre os locais e os híbridos parentais, mostrando que a classificação dos híbridos não foi alterada nos diferentes ambientes. O híbrido da linhagem L11 apresentou maior altura de inserção de espigas em todos os locais, ao passo que o híbrido da linhagem L13 manteve uma baixa altura de espiga nesses locais.

Embora o teste de média nos três locais para a produção (Tabela 10) não tenha sido significativo, o quadrado médio de tratamentos obtido pela análise de variância conjunta foi altamente significativo (Tabela 11). Esse resultado indica que pelo menos um híbrido topcross teve desempenho produtivo diferenciado nos vários ambientes. Este fato foi comprovado pela significância na fonte de variação dentro de RC₂ e também entre grupos, o que era esperado, uma vez que

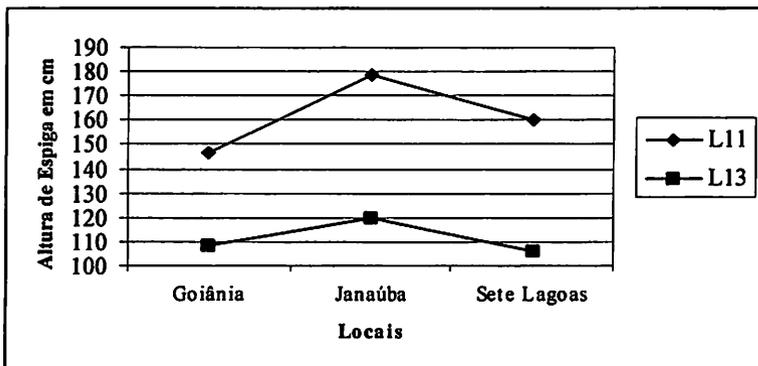


FIGURA 7 – Interação significativa genótipo x ambiente do tipo simples entre os locais e os pais para a característica altura de espiga, obtida com as médias gerais de cada híbrido topcross parental em cada local.

há maior variância genética nessa geração devido às diferenças nas freqüências alélicas. Um outro fato que confirma a existência de diferença significativa entre os híbridos é o resultado do teste de média conjunto que detectou a formação de dois grupos (Tabela 12). Mesmo assim, não se conseguiu observar diferença significativa entre os híbridos obtidos a partir das linhagens parentais para essa característica, provavelmente porque o testador não foi eficiente em discriminar tais híbridos ou porque o número de locais não tenha sido suficiente.

Ainda com relação a produção, à interação entre local e tratamentos não foi significativa, concluindo-se que, em média, os híbridos topcrosses apresentaram o mesmo desempenho produtivo nos vários locais. No entanto, houve interação altamente significativa entre os locais e os pais, indicando que pelo menos um dos híbridos formados pelas linhagens parentais teve comportamento produtivo diferenciado nos diversos locais. Essa interação foi do tipo complexa, porque ocorreu uma inversão no desempenho produtivo, como pode ser claramente visualizado na Figura 8. Observou-se que o híbrido da

linhagem L11 produziu menos em Goiânia, quando comparado ao híbrido formado com a linhagem L13, cujas posições foram invertidas em Janaúba e Sete Lagoas. Nestes locais o híbrido L11 apresentou desempenho superior. Considerando um número maior de ambientes e de cultivares, a presença de interação complexa quase sempre indica a existência de cultivares especificamente adaptadas a ambientes particulares, bem como de outros com adaptação mais ampla, porém, nem sempre com alto potencial produtivo. Tal fato impede que a recomendação de cultivares possa ser feita de forma generalizada, exigindo a adoção de medidas que controlem ou minimizem os efeitos dessa interação, para então se proceder à recomendação com maior segurança. A interação interfere também na obtenção dos verdadeiros valores das estimativas dos componentes da variância genética, o que poderá resultar na obtenção de uma estimativa incorreta do ganho esperado com a seleção (Ramalho et al., 1993).

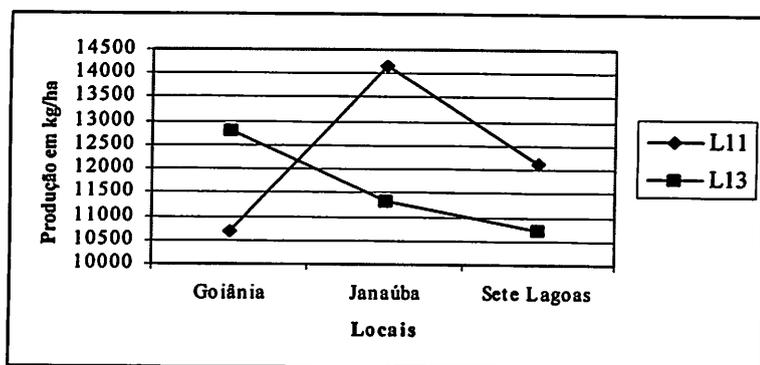


FIGURA 8 – Interação significativa genótipo x ambiente do tipo complexa entre os locais e os pais para a característica produção, obtida com as médias gerais de cada híbrido topcross parental em cada local.

4.3.1 Comparações entre médias dos híbridos topcrosses

Embora se tenham feito avaliações para várias características, maior ênfase será dada às comparações entre as médias de AE e de peso de espigas despalhadas, uma vez que o objetivo do presente estudo foi a transferência da característica baixa inserção de espiga da linhagem doadora (L13) e a recuperação da capacidade produtiva da linhagem recorrente (L11).

A Figura 9 mostra que o híbrido originado da linhagem L11 apresentou a maior altura de espiga, em todos os ambientes. Comparando-se o híbrido L11 com o L13, observa-se que o primeiro foi 31,08% mais alto que o segundo, confirmando que o testador utilizado (L161) na obtenção dos híbridos topcrosses foi eficiente em discriminar as linhagens parentais selecionadas com base na característica altura de espiga. Os híbridos RC₂ e RC₃ situaram-se em uma posição intermediária, apresentando tendência a se aproximarem do híbrido L13, mostrando que houve a transferência dos alelos responsáveis pela redução da altura da espiga em função da seleção fenotípica realizada. Porém, em nenhum caso esta transferência foi completa, uma vez que nenhum híbrido RC₂ ou RC₃ apresentou altura de espiga igual ao do híbrido da linhagem parental L13. Dois ciclos não foram suficientes para garantir a transferência da maior parte dos alelos responsáveis pela redução da altura de espiga para as gerações de retrocruzamento.

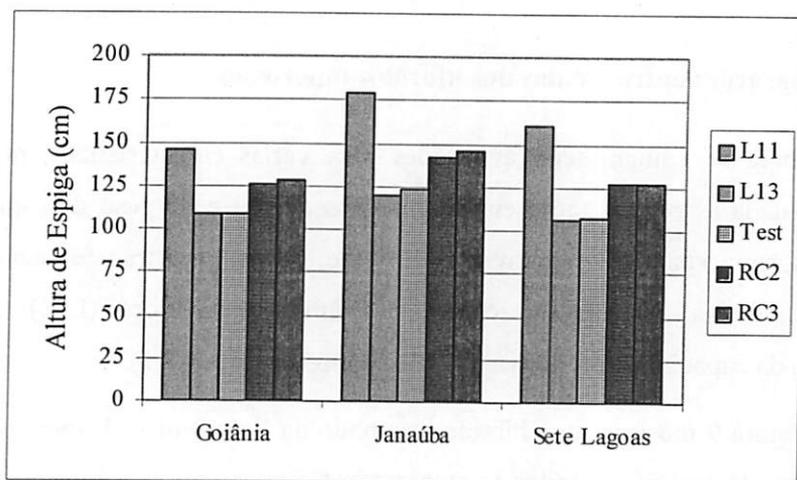


FIGURA 9 – Gráfico comparativo das médias dos topcrosses entre os grupos pais, RC₂, RC₃ e testemunha para a característica altura de espiga.

Observa-se que, em todos os locais (Tabela 12), os híbridos topcrosses superaram, em produção, a testemunha, que é um híbrido simples produtivo e já estabelecido no mercado de sementes, com exceção do híbrido originado da linhagem L11 em Goiânia. Isso mostra que os retrocruzamentos realizados recuperaram parcialmente a capacidade produtiva da linhagem parental L11. Além disso, pode-se inferir que as plantas obtidas por retrocruzamento se combinaram muito bem com o testador, de tal forma a se conseguir materiais com excelente performance produtiva, superiores à testemunha utilizada.

A ocorrência de interação do tipo complexa (Figura 8), na maioria das vezes, indica a existência de materiais adaptados especificamente para determinados locais. Os dados do presente trabalho permitem fazer algumas inferências com relação ao desempenho produtivo de alguns híbridos topcrosses obtidos. Embora sejam necessárias avaliações em vários anos, pode-se observar,

na Figura 10, que o híbrido topcross L11 poderia ser recomendado para cultivo em Janaúba e Sete Lagoas, locais onde sua performance produtiva foi muito melhor. Por outro lado, o híbrido L13 teve um bom desempenho em Goiânia, podendo ser recomendado para esse local.

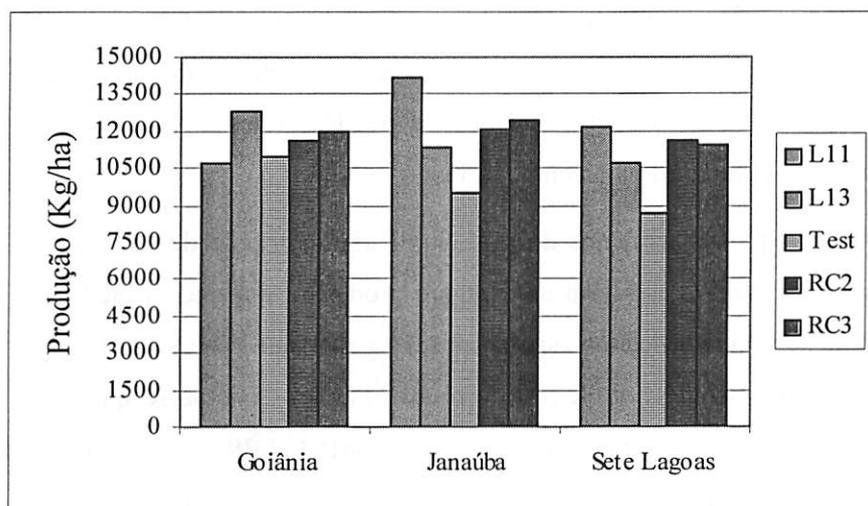


FIGURA 10 – Gráfico comparativo das médias dos topcrosses entre os grupos pais, RC₂, RC₃ e testemunha para a característica produção (kg ha⁻¹).

TABELA 12 – Superioridade de produção dos híbridos topcrosses, em termos percentuais, em relação à testemunha (P30F33), em Goiânia, Janaúba e Sete Lagoas.

Local	Híbridos Topcrosses			
	L11	L13	RC ₂	RC ₃
Goiânia	-2,73	14,26	5,80	9,02
Janaúba	32,90	16,15	26,75	39,54
Sete Lagoa	28,45	19,01	33,46	31,49

A seleção dos materiais que participaram na obtenção dos híbridos topcrosses foi feita de duas formas, conforme indicado na Figura 1. A primeira foi realizada considerando as características fenotípicas anteriormente mencionadas e a segunda foi feita selecionando-se as plantas obtidas por retrocruzamento com maior proporção do genoma do genitor recorrente, aplicando-se ferramentas moleculares, por meio da genotipagem com marcadores microssatélites (SSR). Um dos principais objetivos do presente trabalho foi confirmar se os retrocruzamentos recuperaram a capacidade produtiva da linhagem parental recorrente (L11).

A Tabela 11 mostra os dados do teste de média da análise de variância conjunta para as características altura de espiga e produção, em que as médias seguidas pelo mesmo identificador dos grupos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Observa-se que as médias para AE foram separadas em três grupos: baixo (a1: 111,39 a 113,34 cm), intermediário (a2 e a3: 128,72 a 138,72 cm) e alto (a4: 161,61 cm). No grupo de menor altura de inserção de espiga incluíam-se apenas o híbrido L13 e a testemunha (P30F33) e no de maior altura está o híbrido topcross L11.

A seleção de plantas com maior proporção do genoma do genitor recorrente, utilizando-se marcadores SSRs, para a característica produção, principalmente no segundo ciclo de retrocruzamento, foi possível em função de se ter uma maior variância genética entre as progênies (Tabela 10). Observa-se, na Tabela 11, que, entre os híbridos RC₂ obtidos com auxílio da seleção assistida por marcadores, ocorreram sete que pertenceram ao grupo mais produtivo e apenas dois ao menos produtivo, indicando que os marcadores contribuíram para a identificação de progênies com bom desempenho produtivo. Já nos híbridos obtidos com a seleção fenotípica, notou-se que quatro deles pertenceram ao grupos mais produtivo e três ao menos produtivo. No RC₃ todos os híbridos

selecionados com marcadores foram agrupados entre os mais produtivos, talvez por terem sido obtidos de plantas RC₂ com um elevado grau de recuperação do genoma recorrente. Pode-se observar ainda, na Tabela 11, que foi possível obter híbridos com produtividade 6% superior ao híbrido obtido da linhagem L11 (RC₂-2 M). Esses resultados mostram que a seleção assistida por marcadores foi mais eficiente do que a seleção fenotípica na identificação de plantas, principalmente em RC₂, mais semelhantes ao genitor recorrente e que geraram híbridos de maior performance produtiva. Esse fato reforça a utilização dos marcadores como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento genético vegetal.

5 CONCLUSÕES

- 1 – Os marcadores SSRs foram eficientes na identificação de indivíduos com maior proporção de recuperação do genoma recorrente nas gerações de retrocruzamentos, uma vez que houve um ganho de até quatro ciclos, se comparados com o esperado nos retrocruzamentos convencionais.
- 2 – A seleção fenotípica para baixa AE feita durante as gerações de retrocruzamentos foi eficiente para transferir esta característica para o pai recorrente, apesar de não se ter conseguido transferência completa em nenhum dos retrocruzamentos avaliados.
- 3 – A seleção assistida por marcadores SSRs permitiu identificar híbridos topcrosses com boa performance produtiva, principalmente na fase inicial do programa de retrocruzamento.
- 4 – Todos os híbridos topcrosses obtidos foram superiores, em produção, à testemunha (P30F33), em todos os ambientes, mostrando o potencial produtivo dos materiais testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J. F. M. **Comparação de testadores para avaliar da capacidade de combinação de linhagens de milho (*Zea mays* L.)**. 1990. 166 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, SP.
- AHMADI, N.; ALBAR, L.; PRESSOIR, G.; PINEL, A.; FARGETTE, D.; GHESQUIERE, A. Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 103, n. 6/7, p. 1084-1092, Nov. 2001.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.
- ALLISON, J. C. S.; CURNOW, R. N. On the choice of tester parent for the breeding of synthetic varieties of maize (*Zea mays* l.). **Crop Science**, Madison, v. 6, n. 6, p. 541-544, Nov./Dec. 1966.
- BECKMAN, J. S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, New York, v. 8, n. 10, p. 930-932, Oct. 1990.
- BELLUCCI, A. A. **Avaliação de populações derivadas de híbridos de milho (*Zea mays* L.) em cruzamentos nos esquemas dialélicos e *topcross***. 1995. 133 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, SP.
- BENCHIMOL, L. L.; SOUZA JR, C. L.; MANGOLIN, C. A.; GARCIA, A. G.; SIBOV, S. T.; SILVA, A. R.; SOUZA, A. P. Marker-assited selection using molecular markers in maize backcross breeding programs. In: PLANT & ANIMAL GENOME CONFERENCE, 9., 2001, San Diego, CA. Disponível em: <<http://www.intl-pag.org/9/abstracts/posters.html>>. Acesso em: 28 mar. 2002.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1998. 547 p.
- BRIGGS, F. N. Breeding wheats resistant to bunt by the backcross method. **Journal of the American Society Agronomy**, Madison, v. 22, n. 3, p. 239-244, Mar. 1930.

CONDON, F.; GUSTUS, C.; SMITH, K. P. Evolution of SSR allelic diversity in Minnesota elite barley germoplasm. In: PLANT, ANIMAL & GENOME CONFERENCE, 10., 2002, San Diego, CA. Disponível em: <<http://www.intl-pag.org/10/abstracts/posters.html>. Acesso em: 28 mar. 2002.

DIWAN, N.; BOUTON, J. H.; KOCHERT, G.; CREGAN, P. B. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1-2, p. 165-172, July 2000.

DOGRAR, R.; AKIN-YALIN, S.; AKKAYA, M. S. Discrimination durum wheat cultivars using highly polymorphic simple sequence repeat DNA markers. **Plant Breeding**, Berlin, v. 119, n. 4, p. 360-362, 2000.

EATHINGTON, S. R. Usefulness of marker-QTL associations in early generation selection. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 6, p. 1686-1693, Nov./Dec. 1997.

FEHR, W. F. **Principles of cultivar development: theory and technique**. New York: MacMillan, 1987.

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

FRISCH, M.; BOLIN, M.; MELCHINGER, A. E. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 4, p. 967-975, July/Aug. 1999.

FRISCH, M.; MELCHINGER, A. E. The length of the intact donor chromosome segment around a target gene in marker-assisted backcrossing. **Genetics**, Baltimore, v. 157, n. 3, p. 1343-1356, Mar. 2001.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-140.

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

HALLAUER, A. R. Relation of gene action type of tester in maize breeding procedures. **Procedure Corn and Sorghum Research Conference**, v. 30, p. 150-165, 1975.

HALLAUER, A. R.; LOPEZ-PEREZ, e. Comparison among testers for evaluating lines of corn. **Proceedings of Annual Hybrid Corn Industry Research Conference**, Washington, v. 34, p. 57-75, 1979.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. R. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1988, 486p.

HARLAN, H. V.; POPE, M. N. The use and value of backcross in small grain breeding. **Journal of Heredity**, Cary, v. 13, p. 319-322, 1922.

HOFFBECK, M. D.; OPENSHAW, S. J.; GEADELMANN, J. L.; PETERSON, R. H.; STHUMAN, D. D. Backcrossing and intermating in an exotic x adapted cross of maize. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 5, p. 1359-1364, Sept./Oct. 1995.

HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1199-1210, Dec. 1992.

LANZA, M. A.; GUIMARAES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicações de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 204, p. 97-108, maio/jun. 2000.

LINDSTROM, E. W. Prepotency of inbreed sires on commercial varieties of maize. **Journal of the American Society of Agronomy**, Madison, v. 23, n. 8, p. 652-661, Aug. 1931.

LONNQUIST, J. H.; RUMBAUGH, M. D. Relative importance of test sequence for general and specific combining ability in corn breeding. **Agronomy Journal**, Madison, v. 50, n. 10, p. 541-544, Oct. 1958.

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

MACAULAY, M.; RAMSAY, L.; POWELL, W.; WAUGH, R. A representative, highly informative genotyping set of barley SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 6-7, p. 801-809, May 2001.

- MAIZE GENOME DATABASE. **SSR sequences**, 2002. Disponível em: <<http://www.agron.missouri.edu/ssr.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2002.
- MAKI, C. S.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Mapping a novel opaque endosperm mutant using SSR markers. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, n. 74, 2000.
- MATZINGER, D. F. Comparison of three types of testers for evaluation of inbred lines of corn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 45, n. 10, p. 493-495, Oct. 1953.
- MIRANDA FILHO, J. B.; VIÉGAS, G. P. Milho Híbrido. In: PATERNIANE, E.; VIÉGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cergill, 1987. p. 277-340.
- NARVEL, J. M.; FHER, W. R.; CHU, W.; GRANT, D.; SHOEMAKER, R. C.; CHU, W. C. Simple sequence repeat diversity among soybean plant introduction and elite genotypes. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 5, p. 1452-1458, Sept./Oct. 2000.
- OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker assisted selection in backcross breeding. In: SYMPOSIUM "ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER DATA" JOIN PLANT BREEDING SYMPOSIA SERIES, 1994, Corvallis. **Proceedings...** Corvallis, Oregon: American Society for Horticultural Science/Crop Science of America, 1994. p. 41-43.
- PARENTONI, S. N.; FRANCA, G. E.; GAMA, E. E. G.; GUIMARAES, P. E. O.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X. Eficiência na utilização de nitrogênio em linhagens elite de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 1996, Londrina, PR. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1996. p. 163
- PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, J. V.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X.; ABADIE, T.; GAMA, E. E. G.; GUIMARÃES, P. E. O.; MEIRELES, W. F.; LOPES, M. A.; VASCONCELOS, M. J. V.; PAIVA, E. Heterotic groups based on yeild-specific combining ability data and phylogenetic relationship determined by RAPD marker for 28 tropical maize open pollinated variaties. **Euphytica**, Dordrecht, v. 121, n. 2, p. 197-208, 2001.
- PATERNIANI, E.; CAMPUS, M. S. Melhoramento de milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 429-486.

PUSHPAVALLI, S. N. C. V. L.; SUDAN, M. L.; SINGH, N. N.; PRASANNA, B. M. Differentiation of elite indian maize hybrids using simple sequence repeat markers. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 61, n. 4, p. 304-308, 2001.

RAMALHO, M. A. P. **Genética quantitativa de plantas alógamas**. Lavras: UFLA, 2000. 100 p. Apostila.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 303 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos.; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética Quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG, 1993. 272 p.

RAWLINGS, J. O.; THOMPSON, D. L. Performance level as criterion for the choice of maize testers. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 3, p. 217-220, May/June 1962.

RIBAUT, J. M.; BETÁN, J. Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 5, n. 6, p. 531-541, Dec. 1999.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSON, R.; ALLAR, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of American Biological Science**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SCAPIM, C. A.; CARVALHO, C. G.; CRUZ, C. D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 05, p. 683-686, maio 1995.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize on agarose gel system. **Crop Science**, Medelin, v. 38, n. 4, p. 1088-1098, July/Aug. 1998.

SINGH, S.; LI, W.; BROWN-GUEDIRA, G.; GILL, B. Simple sequence repeat from wheat ESTs are cross-transferable to rice, maize, and *Sorghum*. In: PLANT, ANIMAL & GENOME CONFERENCE, 10., 2002, San Diego, CA. Disponível em: <<http://www.intl-pag.org/10/abstracts/posters.html>>. Acesso em: 28 mar. 2002.

SHULTZ, J.; WU, C.; LAMONTAGNE, C.; NIMMAKAYALA, P.; TRIWITAYAKORN, K.; SANTOS, F.; HONGBIN, Z.; MENKSEM, K.; LIGHTFOOD, D. The soybean integrated physical and genetic map. In: PLANT, ANIMAL & GENOME CONFERENCE, 10., 2001, San Diego, CA. Disponível em: <<http://www.intl-pag.org/10/abstracts/posters.html>>. Acesso em: 28 mar. 2002.

SMITH, J. S. C.; SENIOR, M. L. The utility of simple sequence repeat (SSR) data to preferentially identify progeny lines of maize (*Zea mays* L.) that are bred from known inbred parents. *Maydica*, Bergamo, v. 45, n. 3, p. 205-213, 2000.

SMITH, S. O.; SULLIVAN, H.; HOBANT, B.; WALL, S. J. Evaluation of a divergent set of SSR markers to product F₁ gain yield performance and grain yield heterosis in maize. *Maydica*, Bergamo, v. 45, n. 3, p. 235-241, 2000.

SOUZA, E. D. **Divergência genética e avaliação de famílias S₁ e topcrosses de milho, utilizando-se caracteres agrônômicos e marcadores RAPD.** 2000. 88 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, J. R. **Avaliação de seis ciclos de seleção para tolerância à acidez na população de milho (*Zea mays* L.) CMS-04C.** 1997. 145 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiás.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-1010.

SPRAGUE, G. F.; TATUM, J. A. General and specific combining ability in single crosses of corn. *Agronomy Journal*, Madison, v. 34, p. 923-923, 1942.

STUBER, C. W.; POLACCO, M.; SENIOR, M. L. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. *Crop Science*, Maddison, v. 39, n. 6, p. 1571-1583, Nov./Dec. 1999.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple Sequence Repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome*, Ottawa, v. 39, n. 2, p. 277-287, Apr. 1996.

TEMNYKH, S.; PARK, W. D.; AYRES, N.; CARTINHO, S.; HAUCK, N.; LIPOVICH, L.; CHO, Y. G.; ISHII, T.; MCCOUCH, S. R. Mapping and genome organization of microsatellite sequence in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 5, p. 697-712, July 2000.

VAN BERLOO, R. GGT: software for the display of graphical genotypes. **Journal of Heredity**, Cary v. 90, n. 2, p. 328-329, Mar./Apr. 1999.

VAN BERLOO, R.; AALBERS, H.; WERKMAN, A.; NIKS, R. E. Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 3, p. 187-195, Oct. 2001.

VAN BERLOO, R.; STAM, P. Comparison between marker-assisted selection and phenotypical selection in a set of *Arabidopsis thaliana* recombinant inbred lines. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 1, p. 113-118, Jan. 1999.

VENKOVSKY, R. Herança quantitativa, In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 137-214.

VISSCHER, P. M. Proportion of the variation in genetic composition in backcrossing programs explained by genetic marker. **The Journal of Heredity: Brief communications**, Cary, v. 87, n. 2, p. 136-138, Mar./Apr. 1996.

VISSCHER, P. M.; HALEY, C. S.; THOMPSON, R. Marker-assisted introgression in backcross breeding program. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 1923-1932, Dec. 1996.

YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. Restriction fragment length polymorphisms maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 1, p. 95-101, Jan. 1989.

WESTMAN, A. L.; KRESOUVICH, S. Simple sequence repeat (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed population. **Euphytica**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 85-92, 1999.

ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	<i>Primers</i> de microssatélites (27) utilizados na genotipagem das plantas RC ₁ com seus respectivos bins e seqüências.....	63
TABELA 2A	<i>Primers</i> de microssatélites (68) utilizados na genotipagem das plantas RC ₂ com seus respectivos bins e seqüências.....	65

TABELA – 1A Pares de *primers* de microssatélites (27) utilizados na genotipagem das plantas RC₁ com seus respectivos bins e seqüências.

<i>Primers</i>	BIN *	Seqüências (forward/reverse)
bnlg176	1.03	AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG CGGCATCGCATGCTTATCCTA
ph i037	1.08	CCCAGCTCCTGTTGTCGGCTCAGAC TCCAGATCCGCCGACCTCAGTCA
phi064	1.10	CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC
bnlg125	2.02	GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
MAGE.05	2.05	GTGCAAATAATCCAAAGCAA ATGTAGGGACAAAGGAATAAATCA
dup24	2.08	ACTGCAATGCACCTCTCTC ACACAACGGCTTCTAACCTT
phi029	3.04	TTGTCTTTCTTCTCCACAAGCAGCGAA ATTCCAGTTGCCACCGACGAAGAACTT
bnlg420	3.05	CTTGCGCTCTCCTCCCCTT GGCCAGCTCACTGCTCACT
bnlg1350	3.08	TGCTTCAGCGCATTAAACTG TGCTCGTGTGAGTTCCTACG
nc135	4.01	CACAAAGAGCAGCCACTTT AAGTTGCTGACATCGATCC
nc005	4.05	CCTCTACTCGCCAGTCGC TTTGGTCAGATTTGAGCACG
bnlg589	4.11	GGGTCGTTTAGGGAGGCACCTTTGGT GCGACAGACAGACAGACAAGCGCATTGT
bnlg565	5.02	TAAGAACGACGAACGGTAACTG GCTCACTGCACGCCAACAC
bnlg150	5.04	GAAAAACCCCCTCCCATAT AATGGCCGAACACAATTCAA
bnlg278	5,05	CATGCATCAACGTAACCTCCCT CATGTCACGGTTCCACTTG
bnlg249	6.01	CCGGTCGCAGTTAGTAGATGAT TCGGCGTTGATTCGTCAGTA
phi078	6.05	CAGCACCAGACTACATGACGTGTAA GGGCCGCGAGTGATGTGAGT
phi089	6.08	GAATTGGGAACCAGACCACCAA ATTCCATGGACCATGCCTCGTG

...”continua”...

“TABELA 1A. Cont.”

bnlg434	7.03	GTGCAAAGGGGAGAGAGGAA TCGCCGTTCTTCGCCTTAG
phi115	8.03	GCTCCGTGTTTCGCCTGAA ACCATCACCTGAATCCATCACA
bnlg666	8.05	AAAAGGCAAGTAGCTAGCATGCATTGCAG GGCTCACGTCCGTATCCAAACCAACA
phi080	8.08	CACCCGATGCAACTTGCGTAGA TCGTACGTTCCACGACATCAC
bnlg244	9.02	GATGCTACTACTGGTCTAGTCCAGA CTCCTCCACTCATCAGCCTTGA
bnlg128	9.07	CACCTGGAGGGACCCATTCC AGGACCACAGGATCCATCATCCT
bnlg619	9.07	ACCCATCCCACTTTCACCTCCTCCT GCTTTCAGCGAATACTGAATAACGCGGA
phi059	10.02	AAGCTAATTAAGCCGGTCATCCC TCCGTGTA CTGGCGGACTC
phi50	10.03	TAACATGCCAGACACATACGGACAG ATGGCTCTAGCGAAGCGTAGAG

* É um intervalo entre dois loci marcadores núcleo fixados e inclui o loci marcador inicial.

TABELA 2A – Pares de *primers* de microssatélites (68) utilizados na genotipagem das plantas RC₂ com seus respectivos bins e seqüências.

<i>Primers</i>	BIN *	Seqüências (forward/reverse)
Bnlg1179	1.01	GCGATTCAGTCCGAGTAGT GTACTGAACAAACCGTGGGC
bnlg147	1.02	AGGAAGCTTTGGTCAAGTCTTA GCTCACTCGATTGTTGTGCTA
bnlg176	1.03	AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG CGGCATCGCATGCTTATCCTA
bnlg1884	1.05	TTCGGATGCATGTGTAACGT CGGAAGTCCCATCTGTTTGT
umc1035	1.06	CTGGCATGATCACGCTATGTATG TAACATCAGCAGGTTTGCTATTC
MMC0011	1.06-1.12	ACATTCATAATCAGCACCGAG TTCAGGCCTCGTGATGACATG
bnlg1671	1.10	TCACGATCAGCAAGCAATTC CCCCACCAACCTTAGAGTCA
phi064	1.10	CCGAATTGAAATAGCTGCGAGAACCT ACAATGAACGGTGGTTATCAACACGC
bnlg131	1.11	CTCTGCGTACCTTTCTGAGTC GCGGAATCCTTGTGTTCTTG
bnlg504	1.11	CGGCAGCTCCAGCACCGGCAT AGTGTCCACATACCGCCACACAGTTC
phi120	1.11	GACTCTCACGGCAGGTATGA TGATGTCCCAGCTCTGAACTGAC
bnlg1325	2.02	CTAAATGCGCAGCAGTAGCA TGCTCTGCAACAACCTTGAGG
bnlg125	2.02	GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
MMC0111	2.03	TACTGGGGATTAGAGCAGAAG AATCTATGTGTGAACAGCAGC
bnlg381	2.03	TCCCTCTGAGTGTTTATCACAAA GTTTCCATGGGCAGGTGTAT
MAGE.05	2.05	GTGCAAACTAATCCAAGCAA ATGTAGGGACAAAGGAATAAATCA
bnlg121	2.06	AGTTCTACAGGCTTCTTGCCAA CTATAAAGAAGGTAACCTGGTTGCTC
bnlg1523	3.03	GAGCACAGCTAGGCAAAAGG CTCGCACGCTCTCTTCTT
phi036	3.04	CCGTGGAGAGACGTTTGACGT TCCATCACCACTCAGAATGTCACTGA
phi029	3.04	TTGTCTTTCTTCTCCACAAGCAGCGAA ATTTCAGTTGCCACCGCAAGAAGCTT
nc030	3.04	CCCCTTGICTTTTCTTCTCTCC CGATTAGATTGGGGTGCG
bnlg420	3.05	CTTGCCTCTCCTCCCCTT GGCCAGCTCACTGCTCACT
umc1027	3.06	AACTCTGTCTCCGTACCGTGT GACCTCATCTCGGTGGAAATG
bnlg2241	3.06	GTGCACACTCTTGTGATCG TAGTCAGCATCTGCCGTGTC
bnlg1063a	3.06	GGAGACAACCCCGACGAC

...”continua”...

"TABELA 2A. Cont."

		GGTACCAGAGCCACAGATCC
bnlg1350	3.08	TGCTTCAGCGCATTAAACTG TGCTCGTGTGAGTTCCTACG
MMC0001	3.09	ATTGAGAAGATGAGAACCGTC CCTACAAATGCAACAAATGCT
nc135	4.01	CACAAAGAGCAGCCCACTTT AAGTTGCTGACATCGATCC
nc005	4.05	CCTCTACTCGCCAGTCCG TTTGGTCAGATTGAGCAGG
bnlg2291	4.07	CCTCTCGATGTTCTGAAGCC GTCATAACCTTGCTCCCAA
MMC0321	4.08	TAATCCGAGCTGCAGAG CACATGAGCTGAGCATCA
bnlg589	4.11	GGGTCGTTTAGGGAGGCCTTTGGT GCGACAGACAGACAGACAAGCGCATTGT
bnlg565	5.02	TAAGAACGACGAACGGTAACTG GCTCACTGCACGCCAACAC
bnlg1208	5.03	GCTGTGATGGTGAGACGAGA GCAGGCACTACTAAAACCGC
phi087	5.06	GAGAGGAGGTGTTGTTGACACAC ACAACCGGACAAGTCAGCAGATTG
umc1019	5.06	CCAGCCATGTCTTCTCGTCTT AAACAAAGCACCATCAATTCGG
bnlg278	5.05	CATGCATCAACGTAACCTCCCT CATGTACGCGTTCCTACTTG
phi100	5.06	AATCTGCTGACTGTGCCGTTGTC CCATACATATCGCCATGATGCTC
phi048	5.07	GCAAACCTTGCATGAACCCGATTGT CAAGCGTCCAGCTCGATGATTTG
bnlg249	6.01	CCGGTCGCAGTTAGTAGATGAT TCGGCGTTGATTTTCGTCAGTA
umc1014	6.04	GAAAGTCGATCGAGAGACCCTG CCCTCTTTCACCCTTCCTT
phi031	6.04	GCAACAGGTTACATGAGCTGACGA CCAGCGTGCTGTTCCAGTAGTT
nc009	6.04	CGAAAGTCGATCGAGAGACC CCTCTTTCACCCCTTCCTT
phi078	6.05	CAGCACCAGACTACATGACGTGTAA GGGCCGCGAGTGATGTGAGT
bnlg345	6.06	CGAAGCTAGATGTAGAAAACCTCTT CTTACCAACCAACTCCCAT
phi089	6.08	GAATTGGGAACCAGACCACCCAA ATTTCATGGACCATGCCTCGTG
MMC0171	7.00	AATCCTACTTGCTGCCAAAGC CTTTGAGCTTTTTGTGTGGAC
umc1016	7.02	GTGATACCGGTAATCTGGTGC GATGATGGGTGATCATCGGTTG
phi091	7.03	ATCTTGCTTCCATAAGATGCACTGCTCT CTCAGCTTCGGTTCCTACACAGT
bnlg434	7.03	GTGCAAAGGGGAGAGAGGAA TCGCCGTTCTTCGCCCTTAG
phi082	7.05	CACAGCACAGGCAGTTCCG CGCGGCAAAGATCTTGAACACCT
phi115	8.03	GCTCCGTGTTTCGCCTGAA ACCATCACTGAATCCATCACA

..."continua"...

“TABELA 2A. Cont.”

bnlg666	8.05	AAAAGGCAAGTAGCTAGCATGCATTTGCAG GGCTCACGTCGGTATCCAAACCAACA
MMC0181	8.06	CTAATCACCAACCACCAACAC AGTCCGTCCTCTGTCCTCGTC
phi080	8.08	CACCCGATGCAACTTGCGTAGA TCGTCACGTTCCACGACATCAC
umc1005	8.08	TTTGATCACAGACTTATCCCTGTT CTAATGACGAACCCCTAAAAGGT
phi068	9.01	GTACACACGCTCCGACGATTAC TCTTCTCCACCAGAGCCTTGTAAG
phi044	9.01	TTATTGGTCCCTCTCCCGTCCCAGA AGCATACCCCAATGGTCAACAGGGA
bnlg244	9.02	GATGCTACTACTGGTCTAGTCCAGA CTCCTCCACTCATCAGCCTTGA
bnlg430	9.03	CTTACTGAGCATCTTCTTCTCTCC TCCGGTGATGCTCCAGCGAC
phi065	9.03	AGGGACAAATACGTGGAGACACAG CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC
phi032	9.04	CTCCAGCAAGTGATGCGTGAC GACACCCGGATCAATGATGGAAC
phi042	9.04	ATGTGGCCATCATCAATGCTGTAGAC ACACATGCAGGTGCAGCCAGA
bnlg128	9.07	CACCTGGAGGGACCCATTCC AGGACCACAGGATCCATCATCCT
bnlg619	9.07	ACCCATCCCCTTCCACCTCCTCCT GCTTTCAGCGAATACTGAATAACGCGGA
phi052	10.02	CAGAAATGGGACGACAAGGTCATC GGGACACTTCTAGCAGGATCTGTTT
phi059	10.02	AAGCTAATTAAGCCCGTCAATCCC TCCGTGTAICTGGCGGACTC
bnlg153	10.6	TCCACTGCTCCTCACTGC CACTTCAAACGTCAAATCTCCA

* É um intervalo entre dois loci marcadores núcleo fixados e inclui o loci marcador inicial.



ANEXO B		Página
FIGURA 1A	Distribuição das frequências das médias para altura de espiga e produção em Sete Lagoas.....	69
FIGURA 2A	Distribuição das frequências das médias para altura de espiga e produção em Janaúba.....	70
FIGURA 3A	Distribuição das frequências das médias para altura de espiga e produção em Goiânia.....	71

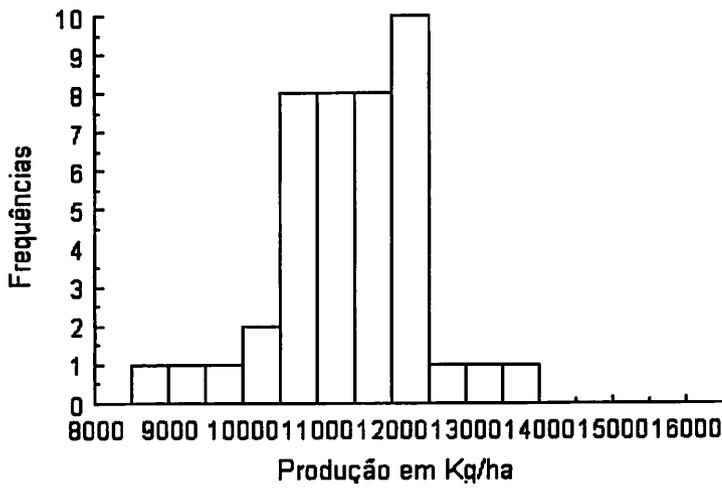
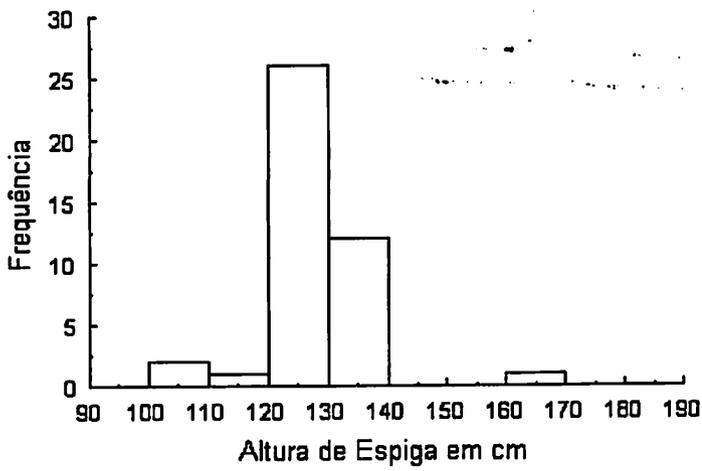


FIGURA 1A – Distribuição das freqüências das médias para altura de espiga e peso de espigas despalhadas em Sete Lagoas

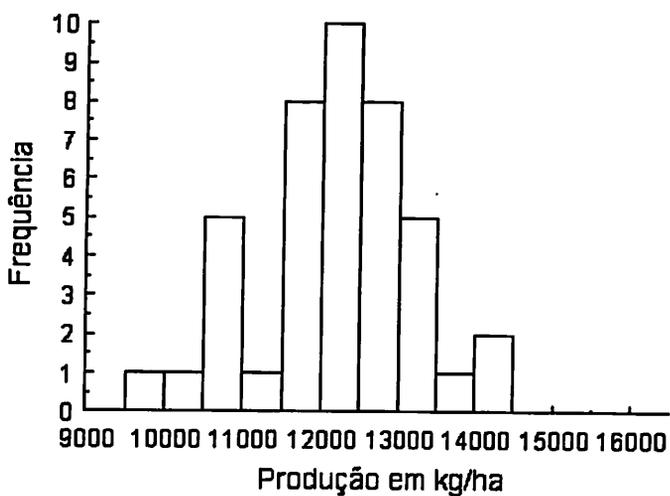
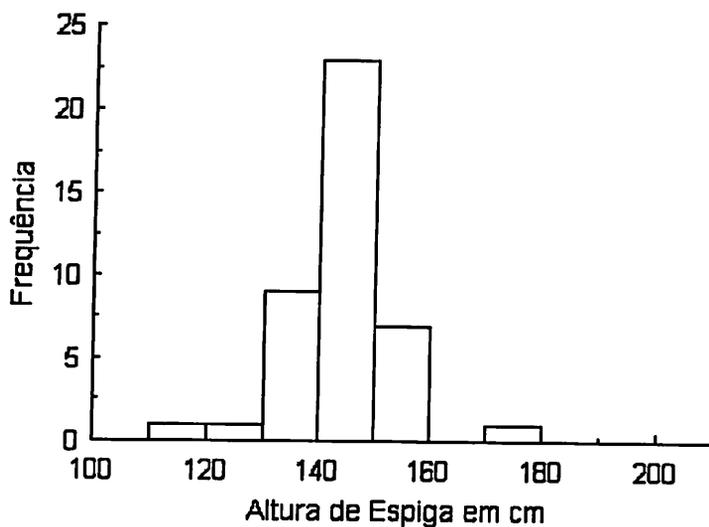


FIGURA 2A – Distribuição das freqüências das médias para altura de espiga e peso de espigas despalhadas em Janaúba.

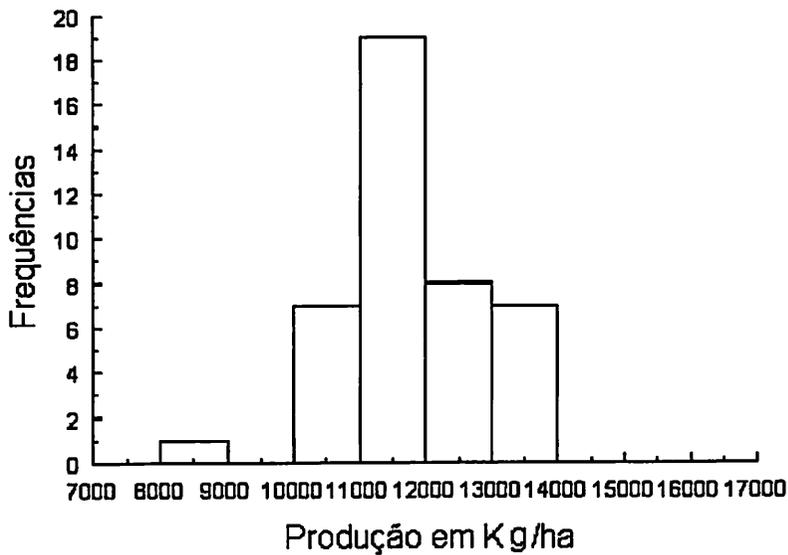
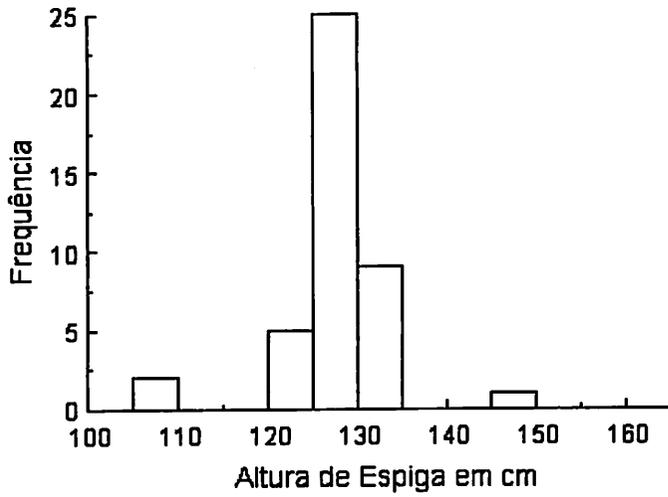


FIGURA 3A – Distribuição das frequências das médias para altura de espiga e peso de espigas despalhadas em Goiânia.