

MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL

EFEITO XÊNIA EM HÍBRIDOS DE MILHO VISANDO AO AUMENTO DA PRODUTIVIDADE POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ⁽¹⁾

REGINALDO ROBERTO LÜDERS ⁽²⁾; JOÃO CÂNDIDO DE SOUZA ⁽³⁾; MARCIO BALESTRE ⁽⁴⁾;
MARCELO SFEIR AGUIAR ⁽⁵⁾; EDSON PERITO AMORIM ⁽⁶⁾; LUCIANA LASRY BENCHIMOL ⁽⁷⁾

RESUMO

Foram desenvolvidos dois experimentos, um com polinização natural e outro com polinização controlada, em duas localidades do Estado de Minas Gerais (Campo Experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA e Fazenda Experimental da UFLA, conhecida como "Vitorinha") em 2004/2005, para verificar e quantificar o efeito xênia em milho. Nos dois experimentos, marcadores microssatélites foram utilizados para distinguir grãos de origem cruzada dos resultantes de autopolinização. Para o estudo foram utilizados três híbridos simples, P 30F90, A 2555 e DKB 333 B, realizando todos os cruzamentos possíveis entre eles, incluindo os recíprocos. Nos dois ensaios, avaliaram-se amostras compostas de grãos coletados na região mediana de 10 espigas, tomadas aleatoriamente nas parcelas. Com base nos dados obtidos, por meio de análises de variância e o teste "t" para médias de dados não emparelhados, foi estimado o efeito xênia sobre o peso de grãos individuais e a massa de cem grãos. A utilização dos marcadores microssatélites foi eficiente, sendo possível diferenciar os cruzamentos dos híbridos em todos os arranjos. Conforme os híbridos envolvidos nos cruzamentos e a condição polinizador/receptor de cada um, foram observados efeitos xênia de diferentes magnitudes. Cruzamentos envolvendo 100% de alopólen provocaram aumentos de 7,3% (2,8 g) na massa de cem grãos, comparados com a mistura de 50%, demonstrando a influência da maior pressão de pólen estranho no incremento dessa característica. Em condições de polinização livre, observou-se um efeito médio de 12,6% (variando de 7,4% a 16,5%) no aumento da massa de grãos individuais. Com 100% de pólen estranho, o efeito xênia médio foi de 13,1% na massa de cem grãos e de 8,7% na massa de grãos individuais, tendo ocorrido, todavia, aumentos de 15,4% e 16,6% respectivamente, nessas características, nos cruzamentos mais favoráveis.

Palavras-chave: *Zea mays*, efeito xênia, híbridos simples, produção de grãos.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 28 de novembro de 2006 e aceito em 30 de novembro de 2007.

⁽²⁾ Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Grãos e Fibras, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa postal 28, 13012-970 Campinas (SP). E-mail: rrluders@iac.sp.gov.br (*) Autor correspondente. Bolsista CNPq.

⁽³⁾ Departamento de Biologia, UFLA, Caixa Postal 37, 37200-000 Lavras (MG). E-mail: cansouza@ufla.br

⁽⁴⁾ Graduando do Departamento de Biologia, UFLA, Lavras (MG). E-mail: marciobalestre@hotmail.com

⁽⁵⁾ EPAGRI-Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1347, Itacorubi, 88034-901 Florianópolis (SC). E-mail: marceloaguilar@epagri.sc.gov.br

⁽⁶⁾ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa s/n.º, 44380-000 Cruz das Almas (BA). E-mail: edson@cnpmf.embrapa.br

⁽⁷⁾ Centro de Recursos Genéticos, IAC, Campinas (SP). E-mail: llasry@iac.sp.gov.br

ABSTRACT**XENIA EFFECT IN MAIZE HYBRIDS AIMING INCREASED YIELDS
BY MICROSATELLITE MARKERS**

Two experiments, with natural and controlled pollination, were carried out at two sites in the State of Minas Gerais (in Experimental area of Biology Department of Universidade Federal de Lavras - UFLA and UFLA farm, known as "Vitorinha") during 2004/2005, in order to verify and quantify the xenia effects in maize. In both experiments microsatellite markers were used to discriminate kernels derived from crosses and from self-pollination, to detect the xenia effect. Three single cross hybrids were used P 30F90, A 2555 and DKB 333 B, and all possible crosses between them were established, including reciprocal ones. In both trials, composite kernels samples taken from the mid-region of 10 randomly collected ears were evaluated. Based on the evaluated obtained data, through analyses of variance and test "t" for means from unpaired data, the xenia effect on the individual grain weight and the weight of 100 kernels was estimated. The use of microsatellite markers could effectively differentiate the crosses from the selfings in both experiments in all possible combinations of the commercial hybrids used. According to the hybrids involved in the crosses, and the condition pollinator/receptor of each one, xenia effects of different magnitudes were observed. Crosses with 100% allopollen resulted in a 7.3% (2.8 g) increase of the weight of 100 grains compared to those with only 50% allopollen, demonstrating an influence of the greater pressure of foreign pollen on the trait increase. In open-pollinated plants, a mean effect of 12.6% (varying from 7.4 to 16.5%) was observed in the increase of individual grain weight. With 100% foreign pollen, the mean xenia effect was 13.1% on the weight of 100 grains and 8.7% on the individual grain weight, while increments of 15.4% and 16.6% in these traits, respectively, were observed in the most favorable crosses.

Key words: maize, xenia effect, single-cross hybrids, grain yield.

1. INTRODUÇÃO

Em trabalhos cujo objetivo é verificar o efeito xênia, a não ser que se promova rigoroso controle da polinização, é necessário demonstrar que os efeitos observados se devem efetivamente à presença de pólen estranho no processo de fecundação. Há diversos processos para isso, cada um contendo vantagens ou inconvenientes em relação aos outros.

No caso do milho, marcadores morfológicos permitem identificar os cruzamentos nos próprios grãos, sem a necessidade de avaliação de características reveladoras do fato nas plântulas (CARDY e KANNENBERG, 1982). O problema com esses marcadores é que podem ocorrer variações por influência do ambiente, além da falta de maiores informações sobre o controle genético envolvido em certos casos (SMITH e SMITH, 1989). Testes eletroforéticos embasados em caracteres bioquímicos também podem ser utilizados (MCDONALD JUNIOR, 1990), embora impliquem custos apreciáveis e exijam boa representatividade das amostras analisadas, além de perfeito conhecimento das enzimas dos parentais envolvidos (SMITH e WEISSINGER, 1984). Atualmente, as tecnologias de marcadores moleculares estão entre os métodos mais adequados para tal finalidade. Os mais utilizados nesses processos são os microsatélites ou SSR's ("Simple Sequence Repeats", TAUTZ e RENZ, 1984), os AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism; VOS et al., 1995), os RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams et al., 1990).

No entanto, os AFLP's e RAPD's apresentam expressão dominante, não diferenciando, portanto, genótipos homozigotos dos heterozigotos. Além disso, os AFLP's exigem uma análise bastante sofisticada para obtenção de bons resultados. A única desvantagem dos marcadores microsatélites, em relação aos demais, é que seu uso exige disponibilidade de seqüências conhecidas, o que nem sempre ocorre para muitas culturas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo WRIGLEY e BATEY (1995), marcadores genéticos eficientes devem ter pelo menos seis atributos: (a) não ser afetado pelo ambiente e pelo estágio de desenvolvimento das plantas; (b) permitir alto grau de discriminação entre genótipos e baixo dentro do genótipo; (c) compreender métodos rápidos e fáceis de execução; (d) não estar sujeito à variação entre laboratórios; (e) apresentar ligação com informações sobre caracteres qualitativos; e (f) possibilitar a utilização de testes estatísticos objetivos para detectar misturas e o coeficiente de similaridade entre genótipos. Em virtude de atenderem a todos esses requisitos, numerosos microsatélites foram desenvolvidos para milho e são hoje amplamente utilizados nessa cultura (SIBOV et al., 2003).

O presente trabalho teve por objetivo verificar e quantificar o efeito xênia no aumento da produtividade de híbridos comerciais de milho, utilizando marcadores microsatélites para distinguir os grãos de origem cruzada dos resultantes de autofecundação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento, foram selecionados três híbridos simples de alta produtividade e com boas características agronômicas, que se destacaram em testes desenvolvidos no Brasil. Tais híbridos são oriundos de três grandes empresas que detêm parte do mercado de sementes de milho no País, sendo então considerados como representativos dos híbridos atualmente utilizados pelos agricultores brasileiros. São eles: híbrido simples P30F90 pertencente à empresa Pioneer, denominado neste trabalho de Hs-A, com somatório térmico de 925 graus dia para o florescimento; híbrido simples A 2555 pertencente à empresa Bayer Seeds (Hs-B), com 930 graus-dia de ciclo e o híbrido simples modificado DKB 333 B pertencente à empresa Monsanto (Hs-C), com somatório térmico de 945 graus dia até o florescimento.

Foram desenvolvidos dois experimentos no Estado de Minas Gerais, sendo um, sob polinização natural, na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Lavras -UFLA, conhecida como "Vitorinha" e o outro, onde foram realizados cruzamentos manuais, na área experimental do Departamento de Biologia (DBI), ambos localizados na UFLA, em Lavras, a 21° 14' latitude Sul, 45° 00' Longitude Oeste e altitude de 918 m. A temperatura média anual é de 19,4 °C e a precipitação pluvial média anual de 1.529,7 mm.

Visando identificar os grãos de origem cruzada, foram utilizados 110 microssatélites (SSR's), com o intuito de observar alelos que diferenciem os três híbridos comerciais, dos quais apenas um - UMC 1638 - conseguiu diferenciar os três híbridos simultaneamente. Alguns destes SSR's estão associados a QTL's para rendimento e outras características agronômicas de interesse (SIBOV et al., 2003) ou são derivados de genes. As seqüências dos microssatélites utilizadas constam do MAIZE DATA BANK (2006).

2.1 Plantio dos experimentos de campo e de polinização manual

O experimento na área experimental da UFLA foi semeado no fim de outubro de 2004, em uma área que possui um longo histórico de plantio direto, em rotação com braquiária, milho e feijão. O plantio ocorreu quinze dias após a dessecação da braquiária com glifosato e a colheita foi feita em abril de 2005.

Um segundo experimento, envolvendo cruzamentos manuais, foi semeado na área

experimental do Departamento de Biologia da UFLA, no fim de novembro de 2004. Neste experimento foram semeadas três linhas de 60 m de cada híbrido, espaçadas de 0,80 m entre linhas e de 0,20 m entre plantas.

Em ambos os experimentos, realizou-se adubação de 400 kg ha⁻¹ da fórmula 8-28-16 de N-P₂O₅-K₂O + Zn na semeadura e, em cobertura, 200 kg ha⁻¹ de sulfato de amônio, 20 dias após a emergência. Os demais tratos culturais foram os normalmente recomendados para a cultura do milho no sistema de plantio direto para região de Minas Gerais.

2.2 Cruzamentos e amostragem das parcelas

No experimento de campo da área experimental da UFLA todos os cruzamentos ocorreram de forma natural. No experimento desenvolvido no Departamento de Biologia, foram realizados cruzamentos manuais entre os híbridos, com o intuito de repetir os cruzamentos que ocorreram de maneira espontânea nos ensaios de produção dentro dos lotes isolados.

Com o objetivo de garantir a máxima uniformidade possível, os cruzamentos foram feitos em blocos, isto é, de cada linha foram selecionados blocos de três plantas, em que uma delas foi autofecundada, para garantir o máximo de endogamia, ou seja, o mesmo processo que ocorreria no campo do híbrido *per se*. A segunda planta recebeu 50% de pólen dela mesma e 50% de pólen de outro híbrido, com o objetivo de verificar a preferência pelo alopólen na planta e também o efeito final deste alopólen na massa do grão. A terceira planta foi polinizada com 100% de pólen estranho, garantindo o máximo possível de efeito xênia.

Para garantir eficiência e precisão dos cruzamentos, o pendão das plantas dos híbridos foi coletado no dia anterior e colocado sob luz intensa, com o objetivo de obter a máxima liberação de pólen.

O pólen liberado foi peneirado e seu volume medido em recipientes de precisão (tubos de ensaio graduado); posteriormente, foram separados, de modo a conter, num caso, o pólen separadamente de cada híbrido, para o uso nas autofecundações e nos cruzamentos com 100% de pólen estranho; e, no outro, as misturas, em arranjos, dois a dois, dos híbridos, contendo 50% de pólen de cada um. Para garantir o máximo de enchimento em cada espiga, foram utilizados 2 mL de pólen em cada cruzamento. Os cruzamentos em blocos de três plantas, foram repetidos 15 vezes para cada arranjo de híbridos.

No experimento realizado na área experimental da UFLA, foram amostradas espigas das parcelas onde, presumivelmente, ocorreu cruzamento devido à pressão de pólen. No total foram coletadas 10 espigas e de cada uma retirou-se uma subamostra da região mediana. As dez subamostras foram então misturadas, para formar uma amostra composta de cada cruzamento. Posteriormente, cem grãos de cada cruzamento foram identificados e pesados individualmente em balança de precisão. O procedimento da amostragem de campo está detalhado na Figura 1.

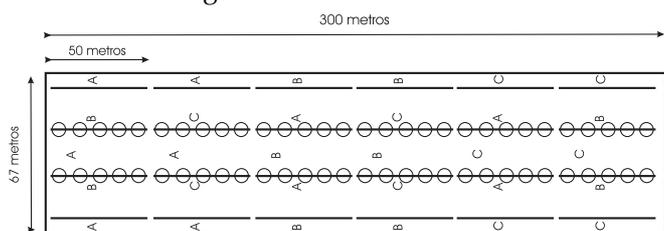


Figura 1. Disposição das espigas nos cruzamentos de campo da área da Fazenda Experimental da UFLA, para B x A, C x A, A x B, C x B, A x C e B x C, linhas centrais da área experimental da UFLA. Lavras (MG), safra de 2004/2005

O mesmo procedimento foi realizado no experimento com cruzamentos manuais, em que foram selecionadas as melhores espigas de cada um, e debulhada a região mediana para compor as 10 subamostras. No entanto, nesse caso, apenas 50 grãos foram pesados e identificados. O procedimento da amostragem dos cruzamentos manuais está detalhado na Figura 2.

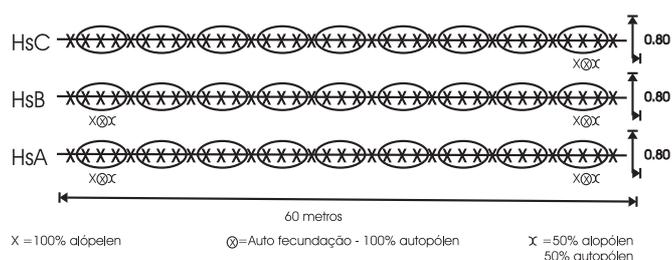


Figura 2. Disposição dos tratamentos nos cruzamentos manuais do Departamento de Biologia da UFLA, para os híbridos autofecundados, Hs A, Hs B e Hs C, e também para os cruzamentos com 50% de autopólen e 50% de alopólen e 100% de alopólen para B x A, C x A, A x B, C x B, A x C e B x C. Lavras (MG), safras de 2004/2005.

2.3 Caracteres avaliados

Para comparação dos tratamentos foi determinado, no experimento com polinização natural, a massa dos grãos individuais. No experimento com cruzamentos manuais, além dessa característica, foi determinado também a massa de cem grãos. Os grãos

identificados e pesados (100, no primeiro experimento e 50, no segundo) foram colocados em bandejas de isopor para germinar e posterior extração do DNA das respectivas plântulas.

2.4 Extração do DNA e ampliações dos microssatélites

O material vegetal foi preparado 15 dias após a germinação, mediante coleta de folhas de 20 plântulas de cada híbrido *per se*, misturando-se, em partes iguais, para a extração do DNA (*Bulk*). Esse DNA extraído dos híbridos *per se* foi utilizado para selecionar o SSR utilizado como "fingerprinting", para identificar os cruzamentos e as autofecundações nos dois experimentos. O DNA, tanto dos híbridos *per se* como dos cruzamentos, foi extraído segundo o protocolo descrito por SAGHAI-MAROOF et al. (1984).

Primeiramente, foram utilizados os 100 SSR's com o intuito de encontrar alelos que diferenciavam os três híbridos comerciais ao mesmo tempo, ou seja, encontrar dentre os SSRs polimórficos um loco capaz de diferenciar os três híbridos simultaneamente, além dos possíveis cruzamentos entre eles. As reações de SSR's foram preparadas para 25,0 mL, sendo 5 mL de DNA diluído para 10 ng μL^{-1} , 2,5 mL tampão de reação 1X (Promega), 0,75 mM de MgCl_2 (Promega), 1,5 mM de cada dNTP (Invitrogen), 2 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 1,0 mM de cada *primer* (Forward e Reverse). O programa utilizado para a amplificação do DNA foi o *Touchdown* (DON et al., 1991; CHIN et al., 1996). Os fragmentos foram separados em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídeo e visualizados em luz ultravioleta.

Uma triagem prévia ajudou a selecionar os pares de *primers* que poderiam ser utilizados na diferenciação dos híbridos *per se*. A maioria dos SSRs testados não conseguiu diferenciar os híbridos *per se*, somente alguns diferenciaram os híbridos aos pares; apenas um dos SSR's avaliados (UMC 1638) conseguiu diferenciar o cruzamento entre os híbridos Hs A e Hs C. Com auxílio desse SSR foi possível diferenciar os híbridos *per se* (Hs A, Hs B e Hs C) e também os cruzamentos entre eles (B x A, C x A, A x B, C x B, A x C e B x C).

2.5 Análise estatística do efeito xênia

Foram feitas análises de qui-quadrado (χ^2) nos experimentos visando comprovar a preferência pelo alopólen nos cruzamentos, e o esperado é que 50% dos grãos fossem de origem cruzada e 50% de autofecundação. Também foram realizadas análises de variância para cada experimento, isto é, para o

experimento da área experimental da UFLA, envolvendo cruzamento natural, e para o experimento do Departamento de Biologia (DBI) envolvendo polinizações controladas, utilizando o software SAS v. 8.1 (SAS INSTITUTE, 2000).

Devido ao esquema utilizado no campo para verificar e quantificar o efeito xênia, quanto à diferença do híbrido autofecundado e o mesmo polinizado por outro, optou-se pelo emprego do teste "t" de Student, aplicado a dados não emparelhados. Esse procedimento foi ajustado conforme as amostras estivessem homogêneas ou não.

Além do teste t, aplicado para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos, com respeito às características avaliadas, foi calculado, em cada caso, o efeito xênia pela expressão utilizada por ANDRADE e PEREIRA (2005).

$$Xe(\%) = \frac{100 * (HsX - Hs\otimes)}{Hs\otimes}$$

Em que:

Xe(%): efeito xênia em porcentagem; HsX: produção de híbridos cruzados; Hs \otimes : produção dos híbridos autofecundados (*per se*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos cruzamentos com auxílio de marcadores moleculares

A utilização dos marcadores microsatélites foi eficiente, sendo possível diferenciar os cruzamentos das autofecundações para ambos os experimentos em todos os arranjos possíveis dos híbridos comerciais utilizados. Dos 100 SSR's testados, apenas alguns conseguiram separar os híbridos aos pares (BNLG 1621, UMC 1397, BNLG 1484, BNLG 615, BNLG 1006, BNLG 240 e BNLG 105). No entanto, apenas o SSR's (UMC 1638) conseguiu separar os três híbridos comerciais quando cruzados, principalmente o cruzamento C x A e A x C. Possivelmente esses híbridos tenham parentais em comum o que dificultou a seleção dos primers.

Usando marcadores de peso molecular de 100 pb, foi possível diferenciar os cruzamentos e as autofecundações para cada par de híbridos, sendo para os híbridos Hs A, Hs B e Hs C o padrão de bandas observado nos géis separaram os híbridos em torno de, respectivamente, 350pb, 300pb e 200pb. A diferenciação dos cruzamentos ficou bem nítida em gel de agarose 3,0%, pois as autofecundações foram marcadas pela presença de apenas uma banda e os cruzamentos pela presença de duas bandas, devido ao comportamento codominante do marcador (Figuras 3 e 4).

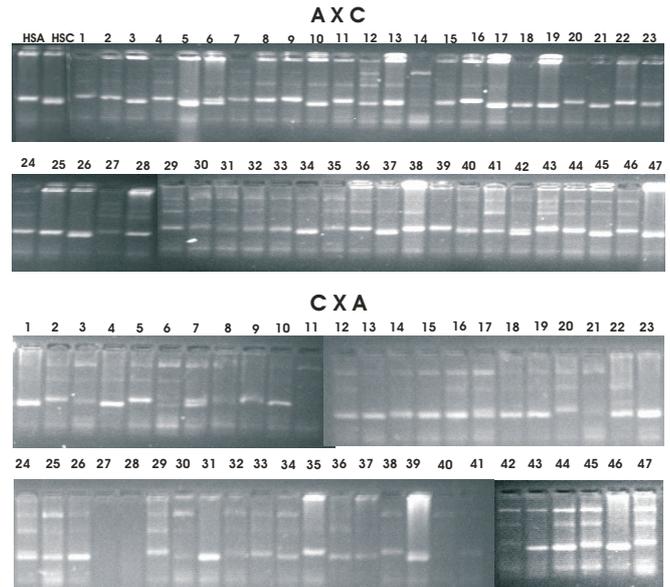


Figura 3. Exemplo de detecção de cruzamentos e autofecundações utilizando o microsatélite UMC 1638. Experimento de polinização livre, cruzamento identificado como A x C, C x A. Área da Fazenda Experimental da UFLA, Lavras (MG), safra de 2004/2005.

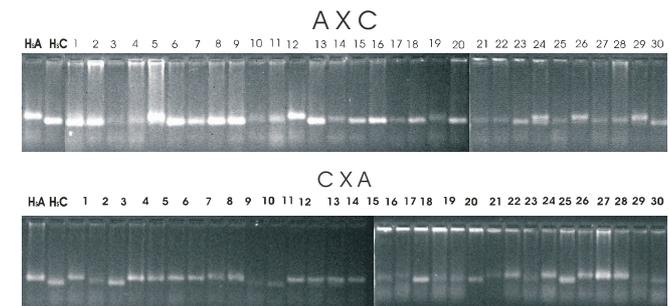


Figura 4. Exemplo de detecção de cruzamentos e autofecundações utilizando o microsatélite UMC 1638. Experimento de polinização controlada do Departamento de Biologia da UFLA, cruzamento identificado como A x C, C x A. Lavras (MG), safra de 2004/2005.

3.2 Experimento com polinização natural

O experimento desenvolvido na Fazenda Experimental da UFLA em 2004/2005, pode ser analisado pela tabela 1 que contém a comparação dos resultados pelo teste "t". Verifica-se que dos seis cruzamentos possíveis, cinco revelaram a presença de efeito xênia significativo e positivo. A exceção foi o cruzamento C x B, com uma redução de 12,94% em relação à massa do grão autofecundado do híbrido Hs C. O efeito xênia variou entre 7,44% (0,0248 g) e 16,45% (0,0499 g) para os cruzamentos A x B e B x C respectivamente (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por MERCER (2001), BULANT e GALLAIS (1998), que estudaram a manifestação do efeito xênia na produtividade.

Tabela 1. Resultados médios da característica massa de grãos individuais (M. grãos), dos híbridos autofecundados e respectivos cruzamentos obtidos por polinização livre, e efeitos xênia (Xe) correspondentes, obtidos da área Fazenda Experimental da UFLA em 2004/05. Lavras (MG), 2004/2005

Polinização livre da área da Fazenda Experimental da UFLA safra 2004/05				
Híbridos	Plantas	M. grão		Xe
	n.º	g		%
Hs A x Hs A ⊗	16	0,3333	a	-
A x B	31	0,3581	b	7,44
Probab (%)		(5,63%)		
Hs A x Hs A ⊗	18	0,3259	a	-
A x C	29	0,3762	b	15,43
Probab (%)		(0,004%)		
Hs B x Hs B ⊗	15	0,3008	a	-
B x A	32	0,3259	b	8,34
Probab (%)		(2,50%)		
Hs B x Hs B ⊗	24	0,3033	a	-
B x C	23	0,3532	b	16,45
Probab (%)		(0,001%)		
Hs C x Hs C ⊗	23	0,2605	a	-
C x B	24	0,2268	b	-12,94
Probab (%)		(0,009%)		
Hs C x Hs C ⊗	19	0,2887	a	-
C x A	28	0,3330	b	15,34
Probab (%)		(0,002%)		

Médias com letras diferentes em relação ao híbrido parental (na faixa) diferem a 5% pelo Teste "t".

* Os dados entre parênteses indicam o nível efetivo de significância estatística da diferença em relação ao híbrido respectivo. Híbridos simples comerciais utilizados: Hs A - P 30F90; Hs B - A 2555; Hs C - DKB 333B

Pela análise de χ^2 aplicada das observações, constatou-se que realmente houve uma preferência para o alopólen nos cruzamentos A x B, e B x A (tabela 2), indicando que a influência do pólen estranho realmente pode elevar a produção. Para ambos os cruzamentos, a taxa de polinização cruzada variou entre 66% e 68%. Para outros casos, como o cruzamento C x A, a taxa de cruzamento foi de 62% superior à autofecundação, mas não significativa pelo χ^2 . Para os cruzamentos C x B e B x C a taxa de cruzamento não diferiu da taxa de autofecundação, ficando ambos com 50%. Em alguns casos, a taxa de cruzamento foi superior à autofecundação (cruzamento C x B) mas, mesmo assim o efeito xênia verificado foi negativo (Tabela 3). Uma possível explicação seria o fato de que os mesmos alelos nos

híbridos estão em heterozigose; quando ocorre o cruzamento entre eles esses alelos passam ao estado de homozigose o que pode causar uma depressão por endogamia, que se reflete na massa, ocasionando uma perda de aproximadamente 19,1% na massa de grãos.

O mesmo ocorreu no experimento de livre polinização na Fazenda Experimental da UFLA-"Vitorinha"(Tabela 1), o que pode confirmar esta hipótese.

3.3 Experimentos com polinização controlada

Verifica-se que dos seis cruzamentos possíveis, apenas os cruzamentos A x B e B x A não manifestaram o efeito xênia significativo para massa de grãos individuais (Tabela 3). Estes mesmos cruzamentos que tiveram menores valores para esse efeito, também o fizeram no experimento com polinização natural. No cruzamento C x B ocorreu efeito negativo de 19,1%, e os cruzamentos C x A e B x C sobressaíram com efeitos de xênia de 16,7% (0,0649 g) e 14,7% (0,0500 g) respectivamente. Verifica-se, portanto, considerável semelhança entre os resultados constantes dos dois experimentos.

A análise de χ^2 não mostrou significância para nenhum cruzamento considerado (Tabela 2). Neste caso o teste χ^2 aplicado pode não ter detectado as diferenças observadas em função do tamanho da amostra, possivelmente para detectar essa pequena diferença a amostra utilizada teria que ser maior que 30 plantas.

A utilização de marcadores moleculares para a detecção dos cruzamentos foi eficiente, pois é nesse tipo de experimento (polinização livre) que, muitas vezes, o efeito xênia pode ser confundido com efeitos amostrais, mas neste caso, as amostras comparadas eram de origem cruzada e autofecundada (Figuras 3 e 4). Por esse motivo, os resultados sugerem que há preferência pelo pólen de origem estranha e que esta preferência pode chegar a 63% em média. Do mesmo modo, no experimento de polinização controlada poderia ocorrer uma taxa de alopolinização maior se o número de amostras analisadas com auxílio de marcadores também fosse maior.

De modo geral, esses resultados se repetiram, com muita semelhança, no estudo de massa de cem grãos (Tabela 3), inclusive quanto ao efeito negativo observado no cruzamento B x C. Chamam a atenção, especialmente, os valores mais altos obtidos com 100% de alopólen em comparação com 50%, mostrando claramente que a pressão de pólen estranho está interferindo na manifestação do efeito xênia.

Tabela 2. Tabela de χ^2 referente às observações da massa de grãos individuais para o experimento da área da Fazenda Experimental da UFLA, envolvendo polinização livre e do Departamento de Biologia da UFLA, envolvendo polinização controlada, em 2004/2005. Lavras, (MG)

Hs's e cruzamentos	χ^2 das observações Lavras safra 2004/05							
	Área da Fazenda Experimental da UFLA (livre polinização)				Departamento de Biologia (cruzamento controlado)			
	Plantas	$\frac{(O-E)^2}{E}$	χ^2	Prob.	Plantas	$\frac{(O-E)^2}{E}$	χ^2	Prob.
	n.º			%	n.º			%
Hs B x Hs B	15	3,074	6,1	1,32	12	0,600	1,200	27,33
B x A	32	-	49	-	18	-	-	-
Total plantas	47	-	-	-	30	-	-	-
Hs A x Hs A	16	2,394	4,7	2,87	11	1,067	2,130	14,41
A x B	31	-	87	-	19	-	-	-
Total plantas	47	-	-	-	30	-	-	-
Hs C x Hs C	23	0,011	0,0	88,41	11	1,067	2,130	14,41
C x B	24	-	21	-	19	-	-	-
Total plantas	47	-	-	-	30	-	-	-
Hs A x Hs A	18	1,287	2,5	10,86	17	0,267	0,533	46,52
A x C	29	-	74	-	13	-	-	-
Total plantas	47	-	-	-	30	-	-	-
Hs C x Hs C	19	0,862	1,7	18,93	13	0,267	0,533	46,52
C x A	28	-	23	-	17	-	-	-
Total plantas	47	-	-	-	30	-	-	-
Hs B x Hs B	24	0,011	0,0	88,41	18	0,600	1,200	27,33
B x C	23	-	21	-	22	-	-	-
Total plantas	47	-	-	-	30	-	-	-

- Número de plântulas amostradas para extração de DNA, a fim de se checar a origem no experimento de polinização livre = 47.

- Número de plântulas amostradas para extração de DNA, a fim de se checar a origem no experimento de polinização controlada = 30.

A respeito das diferenças entre os diversos cruzamentos, vale ressaltar, como fizeram ANDRADE e PEREIRA (2005) e PONELEIT e EGLI (1983) que existem combinações específicas entre pares de genótipos, de forma que a junção de alelos favoráveis resulta em efeito xênia manifestado no aumento da produtividade, tanto maior quanto maior for a quantidade de grãos de origem cruzada. A recíproca é verdadeira, pois se as combinações não forem eficientes, o efeito xênia poderá ser negativo, como ocorreu no cruzamento B x C. Para LENG (1949), essas combinações de alelos específicos, dominantes ou parcialmente dominantes, agiriam afetando as fases de enchimento do grão, tanto para mais como para menos, dependendo das combinações.

Outros pesquisadores (ANDRADE e PEREIRA, 2005; BULANT e GALLAIS, 1998; SEKA, 1995a,b; MERCER, 2001; WEINGARTNER et al., 2002) obtiveram aumentos médios de produtividade da ordem de 18% desconsiderando se os cruzamentos foram entre linhagens, híbridos ou híbridos com linhagens. No

presente estudo, considerando 100% de pólen estranho, observa-se efeito médio de 13,1% para massa de cem grãos e 8,7% para massa de grãos individuais (Tabela 3). Ressalte-se, todavia, que houve efeito de 16,6% para peso de grãos individuais e de 15,4% na massa de cem grãos, nos cruzamentos mais favoráveis, assim como efeito negativo de 19,1% e 38,3% respectivamente (Tabela 3), nas características mencionadas, para o cruzamento C x B.

Por fim, nas tabelas 1 e 3 existe uma coerência de resultados com certos cruzamentos, que se repetem nos dois experimentos, ou seja, com polinização livre e com polinização manual controlada. Por exemplo, nos cruzamentos B x C e C x A há ganhos de produtividade muito semelhantes; já no cruzamento C x B há perda de produtividade bastante semelhante.

Por esse motivo, os resultados sugerem que o efeito xênia para aumento de produtividade em milho existe e que para certas combinações híbridas ele é mais pronunciado.

Tabela 3. Resultados médios das características massa de grãos individuais, massa de cem grãos considerando 100% do cruzamento com alopólen e também da massa de cem grãos considerando 50% de autopólen e 50% de alopólen, dos híbridos autofecundados e respectivos cruzamentos, e efeitos xênia (Xe) correspondentes, obtidos no local Departamento de Biologia em 2004/2005, Lavras (MG)

Híbridos	Massa do grão	Xe	Mass de 100 grãos 100% alopólen	Xe	Massa de 100 grãos 50% autopólen e 50% alopólen	Xe
	g	%	g	%	g	%
Hs A x Hs A	0,4244 a	-	41,66 a	-	41,66 a	-
A x B	0,4296 a	1,23	44,19 b	6,07	43,07 b	3,38
Probab (%)	(75,22%)	-	(1,78%)	-	(4,13%)	-
Hs A x Hs A	0,3953 a	-	33,53 a	-	33,53 a	-
A x C	0,4215 b	6,63	41,72 b	24,4	38,61 b	15,2
Probab (%)	(2,88%)	-	(0,86%)	-	(0,81%)	-
Hs B x Hs B	0,3304 a	-	33,53 a	-	33,53 a	-
B x A	0,3437 a	4,03	34,39 a	2,51	34,29 a	2,27
Probab (%)	(18,12%)	-	(61,64%)	-	(52,34%)	-
Hs B x Hs B	0,3403 a	-	32,85 a	-	32,85 a	-
B x C	0,3903 b	14,7	39,14 b	19,1	35,19 a	7,12
Probab (%)	(0,556%)	-	(0,001%)	-	(6,69%)	-
Hs C x Hs C	0,4509 a	-	41,76 a	-	41,76 a	-
C x B	0,3651 b	-19,1	25,75 b	-38,3	29,32 b	-29,8
Probab (%)	(0,001%)	-	(0,001%)	-	(0,004%)	-
Hs C x Hs C	0,3895 a	-	40,29 a	-	40,29 a	-
C x A	0,4544 b	16,7	45,59 b	13,2	42,55 a	5,61
Probab (%)	(0,004%)	-	(0,005%)	-	(16,81%)	-

Médias com letras diferentes em relação ao híbrido parental (na faixa) diferem a 5% pelo Teste "t".

* Os dados entre parênteses indicam o nível efetivo de significância estatística da diferença em relação ao híbrido respectivo.

Híbridos simples comerciais utilizados: Hs A - P 30F90; Hs B - A 2555; Hs C - DKB 333B

4. CONCLUSÕES

1. Marcadores moleculares microssatélites foram eficientes na diferenciação entre grãos autofecundados e cruzados, em estudo do efeito xênia envolvendo três híbridos simples comerciais.

2. Conforme os híbridos envolvidos nos cruzamentos, e a condição polinizador/receptor de cada um (influência materna), efeitos xênia de diferentes magnitudes foram observados com respeito à massa de grãos individuais e à massa de cem grãos.

3. A precisão experimental em ambos os experimentos foi boa, pois os CV's observados foram da ordem de 11,2%; assim, é possível averiguar que os resultados realmente comprovam a presença do efeito de xênia no aumento de produtividade.

4. Existe grande variação entre os resultados verificados quanto à intensidade do efeito xênia, em função do cruzamento utilizado (variando de -19,1% a 16,7%) no aumento da massa de grãos individuais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelo financiamento do Projeto de tese de doutorado do primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J.A.C.; PEREIRA, F.C.D. Uso do efeito xênia em híbridos comerciais de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.1, p.65-78, 2005.
- BULANT, C.; GALLAIS, A. Xenia effects in maize with normal endosperm: I. Importance and stability. **Crop Science**, Madison, v.39, n.6, p.1517-1525, 1998.
- CARDY, B. J.; KANNENBERG, L. W. Allozymic variability among maize inbred lines and hybrids: applications for cultivar identification. **Crop Science**, Madison, v.22, n.5, p.1016-1020, 1982.
- CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SHU, H.; SMITH, J.S.C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, v.39, p.866-873, 1996.

- DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4008, 1991.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.
- LENG, E.R. Direct effect of pollen parent on kernel size in dent corn. **Agronomy Journal**, Madison, v.41, n.12, p.555-558, 1949.
- MAIZE DATA BANK. Disponível em: <http://www.maizegdb.org>. Acesso em: 25 set. 2006.
- MCDONALD JUNIOR, M.B. Validation of starch gel electrophoresis for corn seed purity determinations. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 45., 1990, Washington. **Proceedings...** Washington: American Seed Trade Association, 1990. p. 43-53.
- MERCER, J.R. **Implicações do fenômeno Xênia nos programas de melhoramento de milho**. 2001. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PONELEIT, C. G.; EGLI, D. B. Differences between reciprocal crosses of maize for kernel growth characteristics. **Crop Science**, Madison, v.32, n.5, p. 871-875, 1983.
- SAS INSTITUTE. **SAS language and procedures: usage**. Version 8.1. Cary, NC: SAS: SAS Institute, 2000. 1 CD-ROM.
- SEKA, D.; CROSS, H. Z. Xenia and maternal effects on maize agronomic traits at three plant densities. **Crop Science**, Madison, v.35, n.1, p. 86-90, 1995a.
- SEKA, D.; CROSS, H. Z.; MCCLEAN, P. E. Maize kernel development In vitro: sucrose concentration, xenia, and maternal effects. **Crop Science**, Madison, v.35, n.1, p. 74-79, 1995b.
- SHAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the national Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.
- SIBOV, S. T.; SOUZA JR, C. L.; GARCIA, A. A. F.; SILVA, A. R.; GARCIA, A. F.; MANGOLIN, C. A.; BENCHIMOL, L. L.; SOUZA, A. P. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas**, Copenhagen, v.139, n.2, p.107-115, 2003.
- SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. The description and assessment of distances between inbred lines of maize: II. The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines. **Maydica**, Bergamo, v.34, n.2, p.151-161, 1989.
- SMITH, S.; WEISSINGER, H. Rapid monitoring of purity in seed lots of hybrid maize: modifications of current technologies. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Bloomington, v.58, p.103-105, 1984.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequence repeats are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.4127-4137, 1984.
- WEINGARTNER, U.; PREST, T. J.; CAMP, K. H.; STAMP, P. The plus-hybrid system a method to increase grain yield by combined cytoplasmic male sterility and xenia. **Maydica**, Bergamo, v.47, n.2, p.127-134, 2002.
- WILLIAN, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WRIGLEY, C.W.; BATEY, I.L. Efficient strategies for variety identification. In: WRIGLEY, C.W. (Ed.). **Identification of food-grain varieties**. St Paul: American Association Cereal Chemists, 1995. p.19-33.
- VOS, P.; ROGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPE, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p.4407-4414, 1995.