

Tecnologia de duplo haploide na determinação da herança da resistência à podridão de colmo (*Fusarium verticillioides*) em linhagens de milho

Luciano Rodrigo Rosa^{1,2}; Marcus Reis Sena³; Humberto Franco Shiomi⁴

¹Luciano Rodrigo Rosa – Mestrando em agronomia - Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT, campus Sinop. ²Parte de dissertação de mestrado. ³Marcus Reis Sena - Melhorista da empresa Dow Agrosiences Sementes Biotecnologia Brasil LTDA. Sorriso – MT. ⁴Humberto Franco Shiomi - Professor Adjunto nas áreas de Microbiologia e Nematologia Agrícola, nos cursos de graduação em Agronomia, Engenharia Agrícola e Ambiental e Zootecnia e em Nematologia e Doenças das Grandes Culturas, no curso de Pós-Graduação em Agronomia (Mestrado) - Área de Concentração - Fitotecnia, da Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT, campus Sinop.

Autor para correspondência: Luciano Rodrigo Rosa (lrrosa@dow.com)

Data de chegada: 21/05/2015. Aceito para publicação em: 29/07/2015.

10.1590/0100-5405/2096

RESUMO

Rosa, L.R.; Sena, M.R.; Shiomi, H.F. Tecnologia de duplo haploide na determinação da herança da resistência à podridão de colmo (*Fusarium verticillioides*) em linhagens de milho. *Summa Phytopathologica*, v.42, n.1, p.59-66, 2016.

Foram utilizadas no trabalho quatro populações sintetizadas pelo cruzamento de duas linhagens homocigotas contrastantes quanto a resistência a *F.verticillioides*. Para a obtenção das linhagens haploides destas populações as mesmas foram cruzadas com indutor de haploidia, os haploides foram então duplicados e autofecundados, sendo as sementes colhidas fonte de origem das linhagens usadas no trabalho. Aos 70 dias após a semeadura as linhagens foram inoculadas com suspensão de esporos do patógeno *F.verticillioides* em concentração de 2×10^6 esporos por mL e com 70 dias após a inoculação as espigas foram colhidas e pesadas e os colmos foram coletados, pesados e medidos em comprimento e diâmetro e

seccionados longitudinalmente para avaliações dos sintomas, onde também foram medidos os comprimentos das lesões. Foram estimadas as variâncias fenotípica, ambiental, genotípica total e entre e dentro famílias, além da herdabilidade e da variância aditiva e de dominância. A variância devido a efeitos genéticos dominantes foram de maior magnitude, sendo que a herdabilidade no sentido restrito foi de 0,28. A distribuição de frequência observada podem indicar efeitos epistáticos envolvidos no controle genético da resistência a *F.verticillioides*. Os maiores ganhos esperados com a seleção foram alcançados com o emprego de seleção entre família e seleção massal.

Palavras-chave: Safrinha, Herdabilidade, *Zea mays L*

ABSTRACT

Rosa, L.R.; Sena, M.R.; Shiomi, H.F. Double haploid technology to determine the inheritance of resistance to stalk rot (*Fusarium verticillioides*) in corn inbred lines. *Summa Phytopathologica*, v.42, n.1, p.59-66, 2016.

Were used in the study four populations synthesized by crossing two contrasting inbred lines as resistance to *F.verticillioides*. To obtain haploid inbred lines of these populations were crossed with haploid inducer, the haploid lines were then duplicated and selfed, and the seeds harvested were the of origin of the inbred lines used in the study. Seventy days after sowing the inbred lines were inoculated with a suspension of spores of the pathogen in *F.verticillioides* concentration of 2×10^6 spores and 70 days after inoculation the ears were harvested and weighed and stalks were collected, weighed and measured in length and diameter and longitudinally sectioned

for evaluation of symptoms, which were also the lengths of the lesions measured. They were estimated to phenotypic, environmental variances, full genotypic and between and within families, as well as heritability and additive variance and dominance. The variance due to dominant genetic effects was greatest magnitude, and the heritability in the narrow sense was 0.28. The observed frequency distribution may indicate epistatic effects involved in the genetic control of resistance to *F.verticillioides*. The biggest gains expected with the selection were achieved with the use of selection among families and mass selection.

Keywords: Off season, Inheritability, *Zea mays L*.

Para a obtenção do milho híbrido, existem três etapas sendo a primeira delas a obtenção das linhagens endogâmicas, depois o teste de capacidade de combinação para identificar as melhores combinações, e por fim a produção e comercialização das cultivares híbridas. Dentre estas etapas, a obtenção de linhagens é a mais demorada e de custo elevado. Isto porque, para atingir a homocigose, são necessárias de seis a oito gerações de endogamia (13).

No Brasil, a safrinha de milho vem ganhando espaço ano após ano. Nos últimos anos houve um crescimento na área plantada em 49,3%, sendo responsável atualmente, por 58% dos grãos de milho

produzidos. (4)

Este sistema de cultivo se consolidou no estado de Mato Grosso, onde a cultura é plantada após a colheita da soja de verão. Na última safra ocupou 37,4% (4) da área semeada com soja, tornando o estado o maior produtor de milho safrinha do país.

Para redução dos custos de produção, os agricultores se aproveitam do clima seco de final do ciclo, para que os grãos atinjam umidade ideal de armazenamento. Para isso as plantas permanecem por prolongados períodos expostas por mais tempo à ação de fungos causadores de podridões de colmo. As podridões de colmo na cultura do milho são

as maiores responsáveis pela redução de produtividade, afetando o rendimento potencial e a qualidade dos grãos e dificultando a colheita. (11).

Após o enchimento dos grãos, as perdas se devem ao tombamento das plantas, que dificulta a realização da colheita mecânica, causando prejuízos pelo apodrecimento das espigas em contato com o solo ou elevando os custos de produção em casos de necessidade de catação manual das espigas. (6).

Para se ter sucesso neste sistema de produção, híbridos comerciais devem possuir tolerância às doenças de colmo, principalmente às podridões causadas por *F.verticillioides*, visto que as condições de campo são favoráveis ao desenvolvimento deste patógeno.

A podridão por *F. verticillioides* ocorre em tecidos senescentes, pois estes apresentam baixos teores de carboidratos e substâncias fungistáticas (8). Esta condição ocorre no final de ciclo ou quando as plantas sofrem estresse. Normalmente, os sintomas aparecem após a polinização, aumentando a severidade próxima à maturação (9). Os tecidos dos nós e entrenós tornam-se avermelhados, progredindo da base para o ápice (15). Com o avanço da doença, ocorre o fendilhamento dos tecidos, os quais adquirem semelhança à consistência de isopor. O enfraquecimento do colmo causa a quebra prematura das plantas (9). As condições ambientais que favorecem o desenvolvimento do fungo são temperaturas em torno de 30^o C e altitudes abaixo de 700 m (8, 15) condições estas que predominam em grande parte da área plantada com a cultura do milho no estado de Mato Grosso.

No processo de desenvolvimento de híbridos comerciais de milho a obtenção de linhagens endogâmicas é a etapa mais demorada e que apresenta maiores custos devido à necessidade de grande mão de obra para realização do processo de autofecundação (13). São necessários sete ciclos sucessivos de autofecundação e cruzamentos de progênes com testadores para identificar linhagens com potencial produtivo elevado.

Dentro dos programas de melhoramento das empresas de sementes de milho, uma ferramenta que tem se destacado nos últimos anos é a tecnologia de duplo-haploide. Essa tecnologia vem sendo amplamente utilizada para a geração de grande quantidade de linhagens endogâmicas em um período mais curto de tempo quando comparado ao método convencional. Esta tecnologia tem potencializado os programas de melhoramento pois permite uma drástica redução de mão de obra, ganho de tempo e possibilidade de se avaliar um maior número de indivíduos devido à maior rapidez em que os híbridos podem ser gerados.

A determinação da herança à podridão de colmo causada por *F.verticillioides* seria uma forma de aumentar a eficiência da metodologia, tornando a ferramenta mais eficiente e assim contribuindo para o controle desta doença importante no sistema de produção de milho.

O presente trabalho teve por objetivo determinar a herança da podridão de colmo causada por *F.verticillioides* em linhagens de milho obtidas através da tecnologia duplo haploide.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no município de Sorriso-MT no ano de 2014, na estação de pesquisa da empresa de sementes Dow AgroSciences. O plantio foi realizado no mês de fevereiro, período que corresponde ao plantio da segunda safra no estado. A estação de pesquisa situa-se a 12° 32' 43" S de latitude, 55° 42' 41" W de longitude e 350 m de altitude.

O delineamento experimental empregado foi o de blocos

casualizados com três repetições. As parcelas experimentais foram constituídas por linhas de 1,2 m de comprimento, espaçadas a 0,50 m com estande médio de cinco plantas por linha, correspondendo a densidade de plantas de 83.300 ha⁻¹. O plantio foi realizado com semeadoras manuais colocando-se uma semente por cova. A adubação de semeadura foi de 36 kg·ha⁻¹ de N, 72 kg·ha⁻¹ de P₂O₅ e 72,0 kg·ha⁻¹ de K₂O. A adubação de cobertura foi efetuada com 90 kg·ha⁻¹ de N, divididos em duas aplicações aos 15 e 25 dias de plantio respectivamente.

O tratamento das sementes foi realizado com o inseticida Imidacloprido + Tiodicarbe (0,3 L. ha⁻¹) e também o fungicida Fludioxonil + Mefenoxam (0,3 L. ha⁻¹) Para o controle de pragas, três aplicações de inseticidas foram necessárias, sendo a primeira entre os estádios V6 e V7, com o inseticida Espinosade (0,1L ha⁻¹). A segunda aplicação foi efetuada no estágio V12, de pré-pendoamento com o inseticida Clorpirifos (60 mL ha⁻¹) e a terceira aplicação, no início do florescimento, R1, com os inseticida Lambda-Cialotrina (0,1 L ha⁻¹) Para o controle de plantas daninhas foi realizada a aplicação dos herbicidas Tembotriona (240 mL ha⁻¹) e Atrazina (2 L ha⁻¹) e o adjuvante Aureo (600 mL ha⁻¹), entre os estádios V6 e V7.

Para evitar influência no desenvolvimento do patógeno não foi aplicado fungicida no experimento.

Para obtenção das linhagens utilizadas no trabalho foram sintetizadas quatro populações cada qual oriunda do cruzamento de duas linhagens homozigotas contrastantes quanto a tolerância ao patógeno *F.verticillioides*. Foram cruzadas 20 plantas de cada um dos parentais e estas populações foram denominadas de J24/T61, J14/J77, G23/M20 e J67/T66 (Tabela 1) sendo o número de tratamentos avaliados em cada uma delas, incluindo-se os parentais e o F1 de 49, 80, 58 e 21 respectivamente.

As populações F1 foram induzidas à haploidia, sendo cruzadas com o indutor. Posteriormente as sementes putativas haploides de cada uma das populações foram selecionadas, observando-se a marcação nos grãos, onde aqueles com endosperma roxo e embrião branco foram selecionados como putativos haploide. Os putativos foram levados ao laboratório seguindo o protocolo proposto por Deimling et al; (7) onde após pré-germinação as plântulas foram tratadas com solução de colchicina a 0,06% + 0,5% de dimetil sulfóxido, por 12 horas no escuro e mantidas em temperatura ambiente. Após a duplicação, as plântulas foram lavadas por 20 minutos em água corrente e então, transplantadas em bandejas plásticas com substrato vegetal e levadas para casa de vegetação. Após 10 dias as plantas foram levadas a campo para o desenvolvimento. Quando as plantas floresceram, foi realizada a autofecundação e as sementes colhidas deram origem às linhagens endogâmicas utilizadas no trabalho.

Teste de patogenicidade

Foi realizado um teste prévio para checar o nível de patogenicidade do isolado que poderia ser utilizado na inoculação do experimento. Este isolado foi obtido de plantas coletadas em lavouras de milho no município de Sorriso – MT e o desenvolvimento em placa de petri com meio de cultura BDA. O inóculo foi preparado e a inoculação em uma linhagem suscetível foi realizada aos 70 dias de plantio, utilizando-se de três tratamentos, sendo o primeiro a injeção no centro do segundo internódio 1 mL de suspensão de esporos de *F.verticillioides* na concentração de 2 10⁶ esporos por mL. O segundo tratamento também foi a injeção no segundo internódio de água destilada esterilizada e o terceiro tratamento a testemunha sem inoculação. Após 70 dias da inoculação foi realizada a avaliação, onde os colmos foram coletados e seccionados longitudinalmente para a avaliação dos sintomas, onde se

Tabela 1. Nível de resistência dos parentais e Grupos Heteróticos de populações sintetizadas.

Nome das Linhas Parentais	Nível de Resistência a <i>Fusarium verticillioides</i> *	Grupo heterótico	Nome das Populações	Nº de linhas Geradas
J24	R	Tuxpeño		
T61	MS	Tuxpeño	J24/T61	46
J14	R	Suwan		
J77	MS	Suwan	J14/J77	77
G23	MR	Tuxpeño		
M20	MS	Tuxpeño	G23/M20	55
J67	R	Tuxpeño		
T66	S	Cateto	J67/T66	18

* Nível de tolerância a *Fusarium verticillioides* onde R= Resistente, S = Suscetível, MR= Médio Resistente, MS = Médio Suscetível.

pode observar que o tratamento onde foi inoculado as áreas lesionadas de tamanho satisfatório, mostrando a capacidade do patógeno em causar a doença com severidade suficiente para uma avaliação consistente e confiável.

Produção e preparo do inóculo.

O patógeno foi multiplicado em meio de cultura de grãos de sorgo com objetivo de obtenção do volume necessário para realizar a inoculação do experimento. Os grãos utilizados como meio de cultura foram colocados em volume de 250 mL em *Erlenmeyers* de capacidade de 500 mL. A estes foi adicionado 100 mL de água destilada e então foram levados à esterilização em autoclave por meia hora a 121 °C. Após resfriamento o patógeno, previamente cultivado em placas de Petri em meio de cultura BDA, foi transferido para os *Erlenmeyers* em câmara de fluxo laminar e levados para câmara de crescimento B.O.D para incubação onde permaneceram em regime alternado de luz de 12 horas por 15 dias à temperatura de 25 °C.

O inóculo foi preparado para a inoculação utilizando-se água destilada com adição de Tween 80 na concentração de 1 mL por litro. Duzentos e cinquenta mililitros de água esterilizada foram então adicionados aos *Erlenmeyers* onde o patógeno foi incubado, sendo agitados manualmente para a liberação dos esporos em suspensão. A suspensão foi então filtrada em peneira de malha de 2 mm por várias vezes para facilitação de observação ao microscópio. Procedeu-se com o auxílio de *câmara de Neubauer* a estimativa do número médio de conídios para posterior calibração da suspensão de esporos ajustando a concentração utilizada para a inoculação com 2 10⁶ esporos por mL.

Inoculação

Aos 70 dias pós-plantio, período correspondente ao término do florescimento das plantas, foi realizada a inoculação injetando-se 1 mL da suspensão de esporos, no centro do segundo internódio, utilizando inoculador apropriado à penetração no colmo das plantas.

Avaliação

A avaliação foi realizada 70 dias após a inoculação, onde as espigas foram colhidas e levadas ao secador de sementes para posterior debulha e pesagem dos grãos. Foram retiradas as folhas já secas e os colmos foram cortados na parte superior no ponto de inserção da espiga e na parte inferior na base do solo. Os colmos devidamente identificados pelo número de parcela foram recolhidos do campo para posterior avaliação. Os colmos foram seccionados no sentido longitudinal para exposição dos sintomas e assim foram realizadas as medições, para determinação

do comprimento e tamanho de lesão, utilizando-se trena, para medir o diâmetro foi utilizado um paquímetro, o peso dos colmo e dos grãos foi avaliado com uma balança digital. Os dados foram utilizados para determinação da densidade, cálculo da porcentagem de área lesionada e produção de grãos.

Os colmos, após as medições, foram colocados em secador de sementes para ventilação até peso constante. O peso final foi utilizado para cálculo da densidade. Por fim, foram coletadas 40 amostras de colmo de forma aleatória para realizar o reisolamento do patógeno e levado ao laboratório, após reisolamento, vindo a confirmar como agente causal das lesões *F.verticillioides*.

Análises de características agronômicas e estimativa de componentes de variância.

Foram avaliadas as quatro populações, incluindo os genitores e as linhagens sintetizadas através de duplo-haploidia para as características: peso de espigas, porcentagem de lesão e densidade de colmo.

Os dados originais destas características não apresentaram distribuição normal. Assim foram necessárias as suas transformações usando-se logaritmo para peso de espigas e raiz quadrada para a porcentagem de lesão e densidade de colmo.

Para a estimativa dos componentes de variância entre os cruzamentos foi utilizada a rotina de Indivíduos Ft e linhas Ft+1 Derivadas dentro de Gerações Segregantes e Não Segregantes do software Genes, descrita por Cruz (5). Com esta rotina foi possível a estimativa da variância fenotípica, ambiental, genotípica total e entre e dentro famílias, além da herdabilidade e da variância aditiva e de dominância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de características agronômicas.

Observou-se, para a variável peso de espiga, (Tabela 2) que todos os tratamentos de todos os cruzamentos apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade. As populações J14/J77 e G23/M20 apresentaram as maiores médias com pesos de 174,53 g e 181,14 g respectivamente. A população J67/T66 apresentou a maior amplitude entre os dados.

Com relação à porcentagem de área lesionada, houve diferença significativa entre as linhagens de todas as populações (Tabela 3) Os dados variaram de 20% na população G23/M20 a 99% na população J14/J77. A maior amplitude de variação foi na população J14/J77 indo de uma lesão de 28% a 99%. A população G23/M20 foi a que

Tabela 2. Resumo da análise de variância do peso de espigas das populações estudadas

FV	J24/T61		J14/J77		G23/M20		J67/T66	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Bloco	2	0,0136	2	0,0472	2	0,1126	2	0,0391
Tratamento	48	0,1974**	79	0,0931**	58	0,1231**	21	0,2126**
Resíduo	96	0,0372	158	0,0221	116	0,0308	42	0,0275
Total	146		239		176		65	
Média		153,73		174,53		181,14		123,05
CV (%)		9,16		6,77		7,99		8,35
Máx.		783,00		395,00		607,00		476,00
Mín.		24,00		32,00		44,00		38,00

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

apresentou a menor amplitude de variância indo de 20% a 53%.

A população G23/M20 apresentou a menor média e variância de porcentagem de lesão mostrando que pode ser uma boa fonte de resistência à podridão de colmo causada por *F.verticillioides*.

Alguns genótipos apresentam características físicas no colmo, como a rigidez dos tecidos que contribuem para à resistência. Alguns trabalhos, como o de Borges et al.(2) mostram que o teor de lignina está diretamente correlacionado com a resistência ao patógeno.

Assim, a fim de se definir as características físicas dos colmos das populações avaliadas, calculou-se a densidade dos mesmos. Os dados de densidade evidenciaram que das quatro populações avaliadas, duas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. (Tabela 4.) Apesar destas diferenças, as médias gerais ficaram bem próximas. Apesar da não significância, a população J24/T61 também foi a que apresentou a maior amplitude de variação.

Na Tabela 5, no teste de média da população J24/T61 pode-se observar a produtividade média de grãos, a densidade média de colmo e a porcentagem de comprimento de lesão dos parentais, F1 e linhas derivadas.

Para peso de espiga, observou-se segregação transgressiva significativa, já que algumas linhagens tiveram produção de espigas maiores que os parentais, (P1 e P2) sendo que 17 linhagens tiveram

produtividade acima do melhor parental, no caso, J24.

No caso de seleção de novas linhagens mais produtivas e sadias, que é o objetivo do melhoramento, as linhagens 1 (JT11346), 11 (JT11355) e 35 (JT11384) apresentaram, em média, melhor produtividade *per se* e menores porcentagem de lesão se comparadas com seus parentais, assim, estas linhagens poderiam ser usadas para geração de populações com melhores produtividades de grãos e mais resistentes a podridão de colmo.

No caso das linhagens oriundas da população J14/J77, não se observou segregação transgressiva significativa para as três características estudadas. A linhagem que mais se destacou neste grupo foi o tratamento 2 (JJ11658) pois, apesar de não apresentar diferença significativa em relação ao melhor parental (J77) possui média superior, sendo assim, ela poderia ser usada como fonte de maior produtividade *per se* e maior resistência para geração de populações ou híbridos superiores.

Um outro grupo de linhagens é formado pelos tratamentos 14 (JJ11670), 39 (JJ11695) e 61 (JJ11717), que apresentaram desempenho bem interessante do ponto de vista do melhoramento, por terem sido ranqueadas em posições próximas ou até mesmo superiores ao melhor parental, sendo, também, possivelmente, fontes para geração de híbridos e novas populações superiores para as características avaliadas.

Tabela 3. Resumo da análise de variância das porcentagens de área lesionada causada por *Fusarium verticillioides* em colmos de milho das populações estudadas.

FV	J24/T61		J14/J77		G23/M20		J67/T66	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Bloco	2	0,3777	2	0,0402	2	0,0146	2	0,0149
Tratamento	48	0,0163*	79	0,0272**	58	0,0121**	21	0,0269**
Resíduo	96	0,0107	158	0,0060	116	0,0051	42	0,010
Total	146		239		176		65	
Média		52%		58%		36%		47%
CV (%)		14,62		10,32		12,02		14,78
Máx.		75%		99%		53%		76%
Mín.		29%		28%		20%		27%

** * Significativo a 1% e a 5% de probabilidade pelo teste de F, respectivamente.

Tabela 4. Resumo da análise de variância da densidade de colmo das populações estudadas.

	J24/T61		J14/J77		G23/M20		J67/T66	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Bloco	2	0,0065	2	0,0031	2	0,0009	2	0,0025
Tratamento	48	0,0134ns	79	0,0064**	58	0,0053 ns	21	0,0062*
Resíduo	96	0,0079	158	0,0041	116	0,0039	42	0,0029
Total	146		239		176		65	
Média		0,366		0,298		0,286		0,341
CV (%)		15,01		11,85		11,83		9,30
Máx.		0,820		0,746		0,467		0,469
Mín.		0,235		0,213		0,206		0,249

** Significativo a 1% de probabilidade. * Significativo a 5% de probabilidade. Ns - Não significativo

Tabela 5. Teste de Média – População J24/T61 – Seleção de linhagens com melhor potencial agronomico.

TRAT.	NOME	PE(g)	LFM%	DEN (g/cm ³)
1	JT11346	243 b	29% a	0,381 Ns
11	JT11356	304 a	37% a	0,295 Ns
35	JT11384	202 b	44% a	0,308 Ns
P1	J24	163 b	43% a	0,328 Ns
P2	T61	54 c	55% a	0,439 Ns

TRAT= Número do tratamento; NOME = código para nomear a linhagem gerada da população; PE = peso de espiga (g); DEN = Densidade de colmo (g/cm³); LFM% = Porcentagem de comprimento de lesão em colmo causada por *Fusarium verticillioides*; Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 6. Teste de Média – População J14/J77 – Seleção de linhagens com melhor potencial agronomico.

TRAT.	NOME	PE(g)	LFM%	DEN (g/cm ³)*
2	JJ11658	220 a	35% a	0,284 b
14	JJ11670	237 a	39% a	0,320 ab
39	JJ11695	254 a	38% a	0,292 ab
61	JJ11717	234 a	49% b	0,320 ab
P1	J77	163 a	35% a	0,267 b
P2	J14	57c	68% c	0,327 ab

TRAT= Número do tratamento; NOME = código para nomear a linhagem gerada da população; PE = peso de espiga (g); DEN = Densidade de colmo (g/cm³); LFM% = Porcentagem de comprimento de lesão em colmo causada por *Fusarium verticillioides*; Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância. * Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de significância

Tabela 7. Teste de Média – População G23/M20 – Seleção de linhagens com melhor potencial agronomico.

TRAT.	NOME	PE(g)	LFM%	DEN (g/cm ³)
11	GM11943	220 a	32% a	0,322 Ns
22	GM11954	269 a	28% a	0,280 Ns
25	GM11957	213 a	24% a	0,246 Ns
30	GM11962	211 a	25% a	0,248 Ns
32	GM11964	217 a	28% a	0,219 Ns
34	GM11966	212 a	29% a	0,287 Ns
49	GM11981	205 a	20% a	0,290 Ns
55	GM11987	224 a	31% a	0,291 Ns
P1	G23	482 a	28% a	0,257 Ns
P2	M20	261 a	32% a	0,245 Ns

TRAT= Número do tratamento; NOME = código para nomear a linhagem gerada da população; PE = peso de espiga (g); DEN = Densidade de colmo (g/cm³); LFM% = Porcentagem de comprimento de lesão em colmo causada por *Fusarium verticillioides*; Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de significância.

As linhagens oriundas da população G23/M20 não apresentaram segregação transgressiva significativa para as características avaliadas. Mas, seguindo o mesmo raciocínio do grupo anterior, a linhagem que mais se destacou foi a do tratamento 22 (GM11954) com a terceira produtividade de espigas e a nona posição no ranking não diferindo significativamente do parental mais resistente. Outro grupo de linhagens com alto potencial como fonte de resistência e produtividade foi o constituído pelas linhagens dos tratamentos número 11 (GM11943), 25 (GM11957), 30 (GM11962), 32 (GM11964), 34 (GM11966), 49 (GM11981) e 55 (GM11987).

No grupo de linhagens originárias da população J67/T66, observou-se segregação transgressiva significativa para o peso médio de espiga, sendo que o mesmo não foi observado para a densidade de colmo e a porcentagem de lesão. Assim, as linhagens dos tratamentos 2 (JT12139), 4 (JT12142), 9 (JT12147) e 10 (JT12149) apresentaram ranqueamento satisfatório sendo que possuem potencial para serem utilizadas para geração de novos híbridos e populações mais produtivas e mais resistentes.

Estimativa dos componentes de variância

Das quatro populações avaliadas, apenas a população J77/J14 e J67/T66 apresentaram dados com distribuição normal após transformação para arc seno raiz da 10^{-1} . Assim, somente foram estimados os componentes de variância destes dois cruzamentos, sendo que os dados foram tomados por planta e não mais por parcela.

Na Tabela 9 estão as médias dos Pais 1, Pais 2, F1 e suas linhas derivadas. No cruzamento J67/T66 a média da F1 (47%), apesar de graficamente ficar mais próxima do parental suscetível (57%), não diferiu significativamente do parental resistente, sendo que a maior frequência foi de indivíduos resistentes. Já no cruzamento J77/J14, a média da F1 se apresenta bem próxima à média do parental resistente, sendo de 39% e 35%, respectivamente. A maior frequência de indivíduos foi suscetível, sendo resultado do background genético dos cruzamentos avaliados, que no caso do cruzamento J67/T66 foi

uma mistura de dois grupos heteróticos contrastantes e o cruzamento J14/J77 envolveu linhagens do mesmo grupo heterótico.

Na Tabela 10, dos comparando-se as variâncias fenotípicas dos dois cruzamentos, houve maior variância fenotípica dentro do que entre no cruzamento J14/J77. Já no J67/T66 elas possuem a mesma magnitude, sendo que a variância fenotípica total foi maior no cruzamento J67/T66. Apesar de ser menor no cruzamento J14/J77 a variância dentro correspondeu a 63% da variância fenotípica total. Este comportamento foi o inverso quando estimado a variância ambiental. No caso do cruzamento J67/T66 a variância dentro foi 74% da total, sendo que no J14/J77 elas quase se equipararam.

No caso da variância genotípica, o cruzamento J67/T66 possui uma variância genotípica entre bem maior que a dentro, o que seria de se esperar de linhagens originadas de duplo-haploidia, onde a uniformidade é bastante alta com apenas três gerações. Entretanto, no caso do cruzamento J77/J14, a variância dentro foi responsável por 68% da variância total.

As linhagens oriundas desta tecnologia apesar de apresentaram grande uniformidade fenotípica, constatou-se uma grande variação dentro, ou seja, houve diferença entre plantas, que teoricamente, seriam homocigotas para todos os locus para reação da podridão de colmo. Assim, estas linhagens, apesar de apresentarem plantas uniformes, para reação a podridão de colmo constatou-se uma variação de origem genética, o que não era de se esperar, pois teoricamente todas as plantas da linhagem deveriam ser idênticas.

Esta maior estimativa entre plantas influenciou assim, a herdabilidade no sentido amplo, pois houve maior magnitude dentro da linha do que entre linhagens. Na literatura alguns autores como LI et al., (12) relatam que apesar desta técnica gerar linhagens altamente uniformes, pode haver contribuição do genótipo do indutor na produção da linhagem.

Com relação a herdabilidade restrita, que é aquela que importa ao melhorista, para ambos os cruzamentos seus valores foram de mesma magnitude, entretanto, uma delas sendo negativa, (-0,0086).

Tabela 8. Teste de Média – População J67/T66– Seleção de linhagens com melhor potencial agronomico.

TRAT.	NOME	PE(g)	LFM%	DEN (g/cm ³)
2	JT12139	103 c	30% a	0,469 a
4	JT12142	129 b	31% a	0,288 b
9	JT12147	210 b	44% a	0,358 a
10	JT12149	194 b	31% a	0,291 b
P1	J67	93 c	27% a	0,340 a
P2	T66	96 c	57% b	0,357 a

TRAT= Número do tratamento; NOME = código para nomear a linhagem gerada da população; PE = peso de espiga (g); DEN = Densidade de colmo (g/cm³); LFM% = Porcentagem de comprimento de lesão em colmo causada por *Fusarium verticillioides*; Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de significância.

Tabela 9. Médias do Pai 1, Pai 2, F1 e suas linhas derivadas para % de lesão no colmo causada por *Fusarium verticillioides*.

		Populações	
		J14/J77	J67/T66
Pai 1	Resistente	35%	27%
Pai 2	Sucetível	68%	57%
	F1	39%	47%
	Progênes	58%	50%

Tabela 10. Estimativa dos componentes de variância de duas populações estudadas.

	Populações	
	J67/T66	J14/J77
Variância Fenotípica		
Entre	0,0560	0,0291
Dentro	0,0531	0,0506
Total	0,1091	0,0798
Variância Ambiental		
Entre	0,0141	0,0137
Dentro	0,0404	0,0179
Total	0,0412	0,0237
Variância Genotípica		
Entre	0,0419	0,0154
Dentro	0,0127	0,0327
Total	0,0547	0,0481
Variância Aditiva	0,0152	- 0,0086
Variância de Dominância	0,6207	1,6435
Herdabilidade Ampla		
Entre	0,75	0,5286
Dentro	0,23	0,6458
Restrita Total	0,28	- 0,2129

Tabela 11. Estimativa do ganho de seleção da população J67/T66.

	Seleção entre famílias	Seleção dentro da família	Seleção Massal
Nº de Seleccionados	3	9*	9
Média Seleccionadas	0,7240	0,8299	0,5102
Diferencial de Seleção	- 0,33	- 0,2242	- 0,5439
Herdabilidade Restrita	0,5312	0,0057	0,2755
Ganho de Seleção	- 0,1753	- 0,0013	- 0,1499
Ganho de Seleção (%)	- 16,70	- 0,1217	- 14,22

* Seleção de três plantas dentro de três famílias.

Segundo Barbin (1), citando Searle (14), quando deparamos com estimativa de componente de variância negativa uma das opções a ser utilizada seria considerá-la como zero, ou seja, nula. Como a estimativa da variância aditiva foi negativa esta influenciou a herdabilidade restrita, pois também sua estimativa foi negativa.

Em ambos os cruzamentos a magnitude das estimativas da variância de dominância foi bem maior que a aditiva. Este mesmo comportamento foi observado por Kim & Brewbaker (10), Carson & Hooker (3) e Tesso et al (16).

Analisou-se a distribuição de frequência de indivíduos em relação à porcentagem de lesão causada por *F.verticillioides* das linhagens oriundas dos cruzamentos. Observou-se no cruzamento J14/J77 (Figura 1) que a média do F1 ficou entre os parentais com uma tendência de menor porcentagem de lesão, ou seja, maior resistência. Mas, em situação oposta, se encontra a distribuição de frequência das linhagens, onde há maior frequência de linhagens com maiores porcentagens de lesão, ou seja, suscetíveis à podridão de colmo.

Analisando-se a Figura 2, distribuição de frequência da população J67/T66 observou-se que a média do F1 ficou entre a média dos pais, mas não diferindo significativamente da média do parental mais resistente e que as maiores frequências foram de indivíduos resistentes.

Estes resultados contraditórios podem ser uma indicação de que outras formas de ação gênica, que não foram compreendidas pelo modelo, podem ter influenciado o resultado.

Estimativa do ganho de seleção

Usando os parâmetros genéticos estimados para simular a seleção de linhagens da população J67/T66 pode-se gerar uma tabela sobre o ganho de seleção da população J67/T66. Para selecionar 20% das plantas avaliadas para redução da porcentagem de lesão para um novo ciclo de recombinação usando o método de seleção massal, entre e dentro famílias tem-se os resultados da Tabela 11.

Das linhagens oriundas da população J67/T66 seriam selecionadas apenas três famílias com média de 0,72, diferencial de seleção de -0,33, com herdabilidade no sentido restrito de 0,53, sendo praticamente o dobro da herdabilidade na seleção massal. O ganho de seleção seria de -16,70%, com magnitude próxima a da seleção massal que foi de -14,22% e bem maior que a seleção dentro que foi de -0,12%.

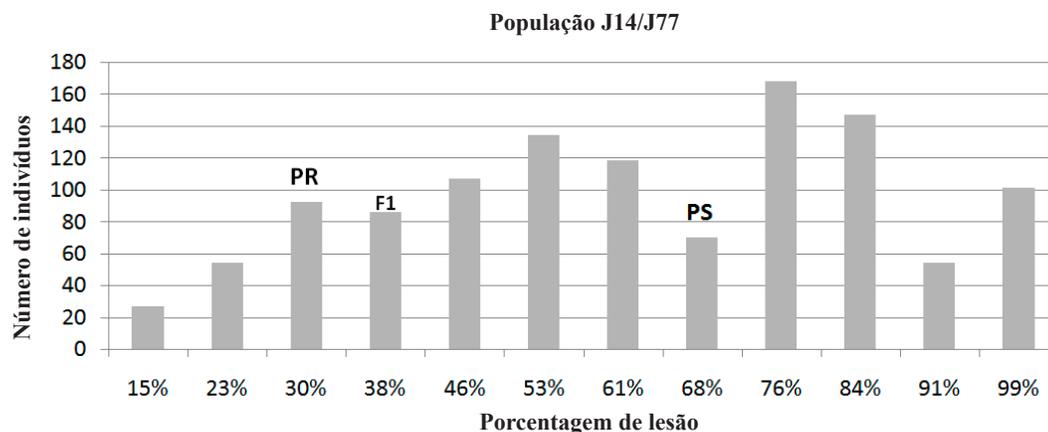


Figura 1. Distribuição de frequência de indivíduos em relação a porcentagem de lesão causada por *Fusarium verticillioides*. Onde: PR = Parental Resistente e PS = Parental Suscetível.

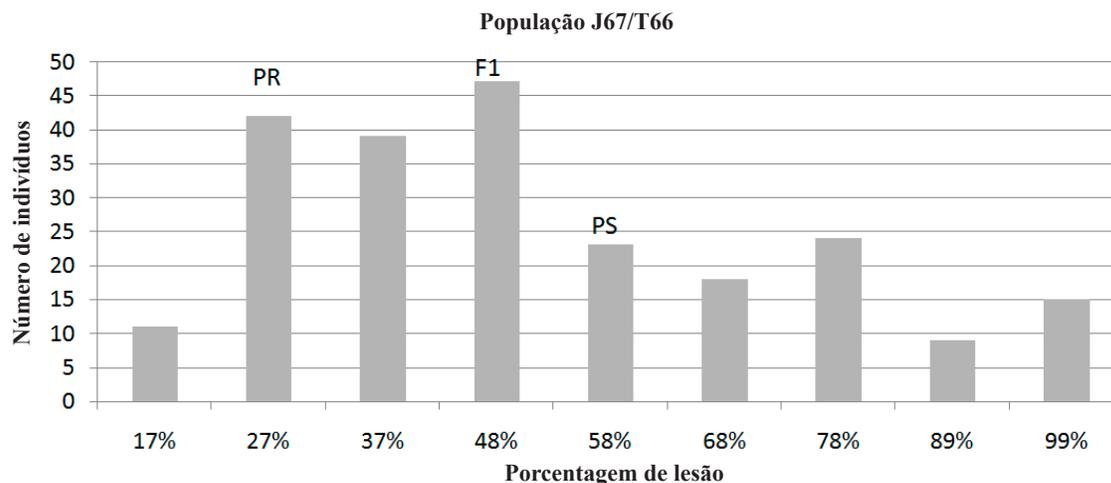


Figura 2. Distribuição de frequência de indivíduos em relação a porcentagem de lesão causada por *Fusarium verticillioides*. Onde: PR = Parental Resistente e PS = Parental Suscetível.

Observou-se variação genética entre plantas da mesma linhagem, o que não era esperado pelo uso da tecnologia duplo haploide.

A variância aditiva negativa também pode ser um indicio que o modelo utilizado não foi o ideal, sendo que para este tipo de estudo, poderia ser utilizado um modelo mais adequado a esta tecnologia de síntese de linhagens.

Os ganhos consideráveis de seleção foram alcançados com o emprego de seleção entre família e seleção massal.

A distribuição de frequência observada pode ser um indicio que os efeitos genéticos relacionados a resistência a *F.verticillioides* podem variar de acordo com o background genético das populações envolvidas.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Dow AgroSciences pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho e também a toda a equipe da estação de pesquisa de Sorriso – MT e Jardinópolis-SP que ofereceu suporte à condução de cada etapa do trabalho e a Carol Foreman por ter dado grande suporte na literatura utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbin, D.; Componentes de variância: teoria e aplicações. 2. Ed. rev. e amp. Piracicaba, 120p.1993.
- Borges, Mirian F.; Resende, Mário Lúcio V.; Von Pinho, Renzo G. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistência a *F.verticillioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 715-720, 2001.
- Carson M.L., Hooker, A.L. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.71: p.1190-1196, 1981.
- Conab. Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries Históricas de Área Plantada, Produtividade e Produção, Relativas às Safras 1976/77 a 2014/15 de Grãos, 2001 a 2014 de Café, 2005/06 a 2014/15 de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos > . Acesso em: 22 de mar. 2015.
- Cruz, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa (MG). Editora UFV. 382p. 2006
- Da Costa, RV.; DA UFLA, Fitopatologia. Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica**, 2008.
- Deimling, S.; Rober, F.; Geiger, H. H. Methodik und genetic der in-vivo haploideninduktion bei mais. **Vortr Pflanzenzuchtung**, Berlin, v. 38, p. 203-204, 1997.
- Fancelli, A. L.; Dourado Neto, D. **Produção de milho**. 2ª ed., Piracicaba, ed. Guaíba, 360p. 2004.
- Fantin, G. M.; Duarte, A. P. **Manejo de doenças na cultura do milho safrinha**. Campinas: Instituto Agronômico, 99p., 2009.
- Kim, S.K.; Brewbaker, J.; Inheritance of general resistance in maize to Puccinia sorghi Schw. **Crop Science**, Madison , v. 7 p.456-461, 1977.
- Kimat, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. **Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005.
- LI, L.; Xiaowei, X.; Jin W.; Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta*, Beijing, v.230, n.2, May., p.367-376, 2009.
- Paterniani, E.; Campos, M. S. **Melhoramento do milho**. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 429-486.
- Searle, S.R.; Fawcett, R.F.; **Expected mean squares in components models having finite populations**. *Biometrics*, Arlington, 26: 243-254, 1970.
- Silva, O.C. da; Schipanski, C.A. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho**. Castro: Fundação ABC, 2006.
- Tesso, T.; Claflin, L.E.; Tuinstra, M.R.; Estimation of Combining ability for resistance to fusarium stalk rot in grain sorghum. **Crop Science**. Madison v.44 p.1195-1199, 2004.