

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ESTUDOS GENÉTICOS EM MILHO SOBRE O CARÁTER TOLERÂNCIA AO
ENCHARCAMENTO DO SOLO

Sérgio Delmar dos Anjos e Silva
Engenheiro Agrônomo, M.Sc./UFPeI

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2003

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores José Fernandes Barbosa Neto e Maria Jane Cruz de Melo Sereno, pela orientação, estímulo e amizade.

Aos professores Antônio Costa de Oliveira (Universidade Federal de Pelotas), Luiz Carlos Federizzi e Maria Jane Cruz de Melo Sereno (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pela colaboração e participação na comissão de orientação.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

À Marisa Bello pela colaboração e o gentil atendimento sempre prestado.

À Embrapa pela oportunidade e apoio financeiro.

Aos colegas e funcionários da Embrapa Clima Temperado, especialmente aos que contribuíram na realização deste trabalho.

Ao Instituto Riograndense do Arroz, pela disponibilização de áreas para condução dos ensaios, em especial aos colegas Sérgio Lopes e Valmir Menezes e aos técnicos José Mauri e Zé do Galo.

Ao Luiz Anderson Teixeira de Mattos, grande amigo, pela colaboração sempre que solicitado.

A todos os colegas da pós-graduação pela colaboração e amizade, em especial, Adriane Amaral, Alexandre Voltz, Caren Lamb, Cícero Carlos, Élbio Cardoso, Léo Conceição, Mara Lopes, Mariângela Santos, Mário Bianchi, Renata Cruz, Sérgio Lopes e Vanderlei Tonon.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular Cândida Raquel Montero, Daniele Silva, Emerson Limberger, Luiz Marcelo Tisian, Paulo Roberto da Silva, Tatiana Boff e Vinícius Sortica.

Aos estagiários Agenor Wernz e Luciano Guerine pela colaboração na condução dos ensaios e à Daniela Mansour, pela colaboração nos trabalhos de laboratório.

Aos colegas da Embrapa Carlos Reisser Júnior, Francisco Mandelli e Paulo Fagundes pela amizade e colaboração durante o curso.

À Clause Fátima de Brum Piana, pela contribuição no acabamento deste trabalho.

À toda minha família que de alguma forma contribuiu para a realização deste trabalho, em especial, a minha mãe Jozephina e a minha irmã Maria Eulália.

À minha esposa Cláudia e ao meu filho Matheus, pelo carinho, amor e compreensão, os quais foram fundamentais durante a realização deste trabalho.

ESTUDOS GENÉTICOS EM MILHO SOBRE O CARÁTER TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO¹

Autor: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva
Orientador: Prof. José Fernandes Barbosa Neto

RESUMO

A introdução de culturas de sequeiro em solos de várzea é importante para o desenvolvimento da região sul do Brasil, uma vez que estas áreas estão sub aproveitadas com a cultura de arroz irrigado e a pecuária extensiva. O milho é uma alternativa para o melhor aproveitamento destas terras, logo o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao encharcamento do solo é fundamental para viabilizar esta exploração. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram estudar a genética da tolerância ao encharcamento e identificar marcadores de DNA associados a esse caráter. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, sendo analisados genitores, híbridos F₁ e populações segregantes provenientes de cruzamentos entre linhagens tolerantes e sensíveis ao encharcamento do solo. A análise molecular, através de marcadores de microssatélites, foi realizada com uma população F₃, resultante do cruzamento entre os genótipos mais contrastantes para a tolerância ao encharcamento. A seleção dos marcadores obedeceu ao critério de amostrar todos os cromossomos, com preferência aos que estivessem ligados a genes pertencentes a rotas metabólicas envolvidas com a glicólise e a fermentação. Os genitores demonstraram a existência de variabilidade genética para os caracteres matéria seca de parte aérea (MSP) e matéria seca de raiz (MSR), sendo que os coeficientes de herdabilidades estimados foram elevados. Ambos os caracteres revelaram complexidade quanto ao número de genes envolvidos, onde a análise de QTL indicou a presença de pelo menos três locos envolvidos na manifestação da tolerância ao encharcamento. A ação gênica predominante foi a de dominância e o efeito materno foi pronunciado. Três marcadores explicaram conjuntamente 33,3% da variação para MSP e 19,9% para MSR, podendo ser úteis na seleção assistida para a tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem em milho. De maneira geral, a seleção fenotípica para MSP e MSR poderá ser uma alternativa eficiente na seleção de genótipos de milho com tolerância ao encharcamento do solo.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (71 p.). Março, 2003.

GENETIC STUDIES IN MAIZE ON THE CHARACTER FLOODING TOLERANCE²

Author: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva
Adviser: Prof. José Fernandes Barbosa Neto

ABSTRACT

The introduction of upland crops in lowland areas is important for the development of southern Brazil, since these areas are under exploited, being lowland rice and extensive cattle among the few existing alternatives for farmers. The maize crop would be an important crop for better use of these lands, once flooding tolerant genotypes become available. Therefore, the objectives of this work were to study the genetics of flooding tolerance and to identify associated DNA markers. The work was carried out in the greenhouse, being analyzed parents, F₁ hybrids and segregating populations originated from crosses between soil flooding tolerant and sensitive inbred lines. The molecular analysis was performed using microsatellite markers on a F₃ population, resulting from crosses between the most contrasting genotypes for flooding tolerance. The selection of markers aimed to cover all maize chromosomes, with preference to those linked to genes belonging to the metabolic pathways involved with the glycolysis and fermentation. The parent data indicated the existence of genetic variability for the characters shoot dry matter (SDM) and root dry matter (RDM), and the estimated heritabilities are high. Both characters revealed complexity regarding the number of genes involved, where the QTL analysis indicated the presence of at least three loci involved in the flooding tolerance. The predominant gene action was dominance but a maternal effect was also evident. A set of three markers explained together 33.3% and 19.9% of the variation for SDM and RDM, respectively, and could be useful in the selection for flooding tolerance in young maize plants. In general, the phenotype selection for SDM and RDM can be an efficient alternative in the selection of maize genotypes with flooding tolerance.

² Doctoral Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (71 p.) March, 2003.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
RELAÇÃO DE TABELAS	vii
RELAÇÃO DE FIGURAS	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
– O MILHO.....	2
– SOLOS DE VÁRZEA.....	4
– TOLERANCIA AO ENCHARCAMENTO.....	5
– MAPEAMENTO GENÉTICO.....	14
CAPÍTULO 1. CAPACIDADE COMBINATÓRIA PARA O CARÁTER TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM MILHO	16
1.1. INTRODUÇÃO.....	16
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
1.4. CONCLUSÕES.....	30
CAPÍTULO 2. HERANÇA DO CARÁTER TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM MILHO	31
2.1. INTRODUÇÃO.....	31
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
2.4. CONCLUSÕES.....	47
CAPÍTULO 3. IDENTIFICAÇÃO DE QTL PARA TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO EM MILHO	48
3.1. INTRODUÇÃO.....	48
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.4. CONCLUSÕES.....	59
CONCLUSÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1.1. Resumo da análise de variância, média e coeficiente de variação (CV) para as variáveis matéria seca da parte aérea (MSP), matéria seca da raiz (MSR), conteúdo de clorofila (CL), estatura de planta (EP) e comprimento de raiz (CR) em 16 genótipos de milho conduzidos em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.....	24
1.2. Médias de matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) em 16 genótipos de milho conduzidos em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.....	25
1.3. Médias de estatura de planta (EP), comprimento de raiz (CR) e conteúdo de clorofila (CL) e suas correlações com matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR), em 16 genótipos de milho conduzidos em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.....	27
1.4. Efeito de capacidade geral de combinação para as variáveis matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) de quatro linhagens de milho conduzidas em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.....	28
1.5. Efeito de capacidade específica de combinação (CEC) e recíproco para as variáveis matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) entre as combinações de quatro linhagens de milho conduzidas em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.....	29
2.1. Médias das linhagens genitoras para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) e média geral do experimento conduzido em casa de vegetação, nos anos de 2000 e 2001, Embrapa clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.....	36
2.2. Médias e variâncias de matéria seca da parte aérea (mg/planta) para os pais e as gerações F ₁ , F ₂ , RC ₁ e RC ₂ em três populações de milho avaliadas para tolerância ao encharcamento do solo, nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.....	39

2.3. Médias e variâncias de matéria seca da raiz (mg/planta) para os pais e as gerações F ₁ , F ₂ , RC ₁ e RC ₂ em três populações de milho avaliadas para tolerância ao encharcamento do solo nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.....	40
2.4. Variância fenotípica (VP), variância genética (VG), variância aditiva (VA), herdabilidade ampla (h _a ²) e herdabilidade restrita (h _r ²) para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) estimadas em três cruzamentos de milho nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.....	45
2.5. Média (m), aditividade (a), dominância (d) e valor de χ^2 para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) estimadas em três cruzamentos de milho, nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.....	46
3.1. <i>Primers</i> de microssatélites utilizados na análise molecular de linhas de milho visando à identificação de QTL para tolerância ao encharcamento do solo. UFRGS, 2003.....	53
3.2. Média e desvio padrão de matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR), para genitores, população F ₃ e testemunhas (híbridos comerciais). Embrapa Clima Temperado, 2002. UFRGS, 2003.....	55
3.3. Estimativas de variância fenotípica (σ^2_P), variância genética (σ^2_G) e herdabilidade (h ²) para matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) das famílias F ₃ . Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2002. UFRGS, 2003.....	55
3.4. Localização cromossômica de três marcadores relacionados a QTL para matéria seca da parte aérea (MSP) e para a matéria seca da raiz (MSR), valor genotípico médio do genitor tolerante, híbrido e do genitor sensível, valor da probabilidade e do coeficiente de determinação. UFRGS, 2003.....	58

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
2.1. Distribuições de frequências para matéria seca da parte aérea (mg) nas gerações P ₁ , P ₂ , F ₁ e F ₂ dos cruzamentos R2 x S5 (<i>a e b</i>), R2 x S6 (<i>c e d</i>) e S5 x S6 (<i>e e f</i>) nos anos 2000 (<i>a, c e e</i>) e 2001 (<i>b, d e f</i>). UFRGS, 2003.....	41
2.2. Distribuições de frequências para matéria seca da raiz (mg) nas gerações P ₁ , P ₂ , F ₁ e F ₂ dos cruzamentos R2 x S5 (<i>a e b</i>), R2 x S6 (<i>c e d</i>) e S5 x S6 (<i>e e f</i>) nos anos 2000 (<i>a, c e e</i>) e 2001 (<i>b, d e f</i>). UFRGS, 2003.....	42

INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea Mays* L.) é uma espécie amplamente difundida, sendo cultivado nas Américas e em, praticamente, todas as regiões de mundo. O maior produtor mundial é os Estados Unidos, com o Brasil ocupando o terceiro lugar na produção de milho; entretanto, sem atender a demanda nacional pelo grão (Bisotto, 2001). As importações crescentes desse cereal nos últimos anos levam a crer que novas alternativas, aliadas a melhores produtividades, devem ser perseguidas pelos programas de melhoramento desta espécie.

O aumento na produção de grãos de milho é uma demanda de alta importância, principalmente para os estados do sul do Brasil, e pode ser obtido com o incremento da produtividade ou da área plantada. O aumento na produtividade de grãos pode ser obtido através do manejo da cultura, como também por cultivares com alto potencial de rendimento de grãos e bem adaptados às condições edafo-climáticas. O aumento na área de cultivo, principalmente em terras tradicionalmente de culturas de sequeiro, é mais difícil pela condição de concorrência com a soja. Neste sentido, os solos de várzeas da região sul do Brasil, que ocupam uma área aproximada de 6.800.000 ha, aparecem como alternativa viável para o incremento da área cultivada com milho, sendo que essa espécie tem mostrado potencial de produtividade em torno de 6.000 kg/ha, quando em condições ambientais favoráveis.

– O MILHO

A origem do milho ainda não é bem conhecida. Existem evidências de que seu centro de origem é o continente americano, mas, embora esta seja a mais aceita, outras evidências indicam sua origem como asiática (Vieira Jr., 1999). As evidências arqueológicas para o milho primitivo na América do Sul são muito limitadas. O milho primitivo na costa do Peru variava de tipos alongados de 12 a 20 fileiras de grãos, na costa norte, a tipos de grãos mais arredondados com até 28 fileiras na costa sul. Em áreas arqueológicas bem estudadas (no sudoeste dos Estados Unidos até a parte central do México) são encontrados estágios semelhantes da evolução do milho. Inicialmente, há aproximadamente 5.000 anos A.C., os sabugos eram pequenos e pouco consistentes. Num período de cerca de 3.000 anos, o milho se transformou de um tipo muito pequeno, frágil e com oito fileiras de grãos, para uma espécie muito mais produtiva, robusta e variável.

O milho pertence à família *Poaceae*, tribo *Maydeae*, a qual pertencem também o teosinto, o tripsacum e várias outras gramíneas. Milho e teosinto têm um número básico de dez cromossomos, enquanto o tripsacum apresenta o número básico de nove cromossomos. Os cromossomos básicos do milho podem ser distinguidos através do comprimento relativo, relação de braços, posição dos knobs, presença de determinados cromômeros mais evidentes e grau de heteropicnose em regiões adjacentes aos centrômeros (Aguiar-Perecin, 1987). A primeira análise morfológica dos cromossomos de milho feita em 1929 menciona a presença de knobs nos cromossomos. Os knobs são estruturas de natureza heterocromáticas, de tamanhos variados, localizadas em posições fixas nos cromossomos. Um determinado knobs, quando presente em um cromossomo, representa uma característica constante e sua herança é

tão precisa quanto à de um gene, sendo os knobs considerados como marcadores citológicos (Aguiar-Perecin, 1987).

O cruzamento entre algumas espécies de tripsacum e milho é possível, porém, o retrocruzamento do híbrido com o milho resulta em perda de cromossomos. No cruzamento entre teosinto e tripsacum isso também ocorre. O cruzamento espontâneo entre milho e teosinto ocorre com relativa facilidade, sendo seus descendentes férteis (Vieira Jr., 1999). A genética clássica sugere alternativas para os processos de evolução. Basicamente, há três hipóteses competitivas para explicar a origem do milho e do teosinto, embora existam várias interpretações próprias para cada uma delas. A “origem comum” ou hipótese da “evolução divergente” sugere que o milho, teosinto e tripsacum originaram-se de um ancestral comum. Embora ninguém, aparentemente, esteja em desacordo com isso, opiniões contundentes foram apresentadas aos fatos subseqüentes. A hipótese da “descendência do teosinto”, descrita por diversos autores, sugere que o milho originou-se direto (e unicamente) do teosinto, por seleção feita pelo homem. A hipótese do “milho como antepassado do teosinto”. Esta hipótese, apresentada de início por Mangelsdorf e aperfeiçoada mais tarde, é de que o teosinto (ou pelo menos o teosinto anual do México) pode ter se originado do milho. Na verdade, a segunda e a terceira hipótese são simplesmente modificações da primeira. Ambas aceitam que tripsacum divergiu logo, ao passo que o milho e teosinto divergiram bem mais tarde.

O milho é uma planta C-4 com ampla adaptação a diferentes condições de ambiente. Para a máxima expressão do seu potencial produtivo, a cultura requer temperatura entre 24 à 30°C, radiação solar elevada e adequada disponibilidade hídrica no solo. Botanicamente, o grão de milho é um fruto denominado cariopse, em que o

pericarpo está fundido com o tegumento da semente propriamente dita. O grão do milho é essencialmente energético sendo o amido o seu principal componente. O teor de proteína encontra-se entre 9 e 11% sendo deficiente em lisina e triptofano (Silva, 2001).

O ciclo de desenvolvimento do milho compreende os períodos vegetativo, reprodutivo e formação e enchimento de grãos. A duração do ciclo é dependente de cultivar, época de semeadura, região de cultivo, fertilidade e umidade do solo. No que se refere à tolerância ao encharcamento em milho, o início da fase vegetativa é o que sofre os maiores danos (Ali, 1976; Singh & Ghildyal, 1980; Kanwar et al., 1988; Mukhtar et al., 1990).

– SOLOS DE VÁRZEA

Os solos de várzea, encontrados nas planícies de rios e lagoas no Rio Grande do Sul, apresentam como característica comum a formação, em condições variadas, de deficiência de drenagem (hidromorfismo). Ocupam extensas áreas, com relevo variando de plano a suavemente ondulado, abrangendo aproximadamente 5,4 milhões de hectares, o que representa 20% da área total do Estado. São áreas mais ou menos contínuas, mecanizáveis e facilmente irrigadas, sendo encontradas, principalmente, nas regiões Litoral, Encosta do Sudeste, Depressão Central, Campanha e Campanha/Missões (Gomes et al., 2002).

Associado à má drenagem, os solos de várzea ou hidromórficos apresentam ainda, em sua maioria, uma densidade naturalmente elevada, uma relação micro/macroporos muito alta e baixa capacidade de armazenamento de água na camada superficial. Outro aspecto relevante que caracteriza estes solos é a fertilidade natural de média a baixa, o que dificulta a utilização de uma agricultura diversificada. Assim, em tais condições, desenvolveu-se o sistema produtivo pecuária de corte extensiva e arroz irrigado, que apresentam baixa rentabilidade (Gomes et al., 2002).

Nas condições do RS, a possibilidade de uso mais intensivo e racional dos solos de várzea está diretamente relacionada à implantação de um sistema de rotação de culturas, associada a uma cobertura permanente da superfície do solo e o manejo eficiente da água superficial (drenagem e irrigação). Em levantamento realizado por pesquisadores da Embrapa Clima Temperado, em lavouras de 120 a 180 ha, foram observados incrementos na produtividade do arroz de 2,67 e 2,16 t/ha, com um e dois anos de rotação com o milho, respectivamente, entre as safras de 1993/94 e 1996/97. O incremento na produtividade do arroz, em termos gerais, situa-se em torno de 20 a 25%, quando em rotação com a lavoura de milho, seja por um, dois ou três anos, dependendo do nível de desinfestação do solo. Os produtores citam que as principais vantagens do uso da rotação com o milho são: o aumento na produtividade do arroz, a visível redução na infestação de arroz daninho na lavoura de arroz comercial subsequente, o decréscimo de inóculo de fungos de solo, a redução da necessidade de adubação da lavoura de arroz, a facilidade de adoção do plantio direto para ambas as culturas e a consequente diminuição dos custos de preparo do solo. (Gomes et al. 2002).

– TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO

Inundações e submergência, comuns em solos de várzea, levam a redução de trocas gasosas entre o tecido da planta e a atmosfera. O O₂ é difundido dez mil vezes mais lentamente em água do que no ar (Armstrong, 1979). O desequilíbrio entre a lenta difusão do oxigênio e a velocidade com que o mesmo é consumido por microorganismos e raízes torna o solo inundado desprovido de oxigênio nas camadas superiores, ficando os tecidos das raízes deficientes de oxigênio em poucas horas (Visser et al., 2003). Como raízes e rizomas são órgãos essencialmente aeróbicos, a

conseqüência pode ser fatal, porque ao cessar a respiração aeróbica, os níveis de energia caem rapidamente, causando um dramático declínio em absorção e transporte de íons (Huang et al., 2003; Vartapetian et al., 2003).

Para reduzir os impactos do estresse causado por deficiência de oxigênio as plantas podem desenvolver características morfológicas e bioquímicas que são ambas constitutivas ou induzidas pelo evento da inundação. Várias respostas anatômicas facilitam o transporte interno de oxigênio por difusão ou, algumas vezes, por fluxo de massa. Isto permite que órgãos subterrâneos evitem o desenvolvimento de interiores anaeróbicos. De particular importância é o desenvolvimento de aerênquimas, canais que permitem as trocas gasosas entre as partes da planta. Eles criam uma rede de baixa resistência para o transporte de gases da parte aérea, bem aerada, para as raízes que se encontram em condição anaeróbica. A efetividade do aerênquima pode ser aumentada pela formação de barreiras de gás, na epiderme e exoderme nas raízes, que inibem a perda radical de oxigênio das raízes para o solo em condição de hipoxia ou anoxia (Aschi-Smiti et al., 2003; Colmer, 2003).

A maioria das espécies vegetais cultivadas tem seu desenvolvimento e produção prejudicados em solos mal drenados. Sem oxigênio livre, a maioria das plantas não é capaz de sobreviver mais do que poucas horas ou dias e não podem se desenvolver suficientemente para a reprodução sexuada ou assexuadamente (Vartapetian & Jackson, 1997). Outros fatores que contribuem para o desequilíbrio fisiológico das plantas nessas condições são: a baixa disponibilidade de água e de minerais, causada por um decréscimo na permeabilidade das raízes, o desequilíbrio de hormônios relacionados com as raízes, o decréscimo de nitrogênio disponível no solo, o incremento de compostos tóxicos no solo e na planta e o aumento de organismos patogênicos.

Espécies diferem consideravelmente em sua suscetibilidade ao estresse. A tolerância pode variar de somente poucas horas para muitos dias ou semanas,

dependendo da espécie, dos órgãos diretamente afetados, estágio de desenvolvimento e condições de temperatura (Vartapetian & Jackson, 1997). Estudando a reação de diversas espécies vegetais, sob prolongadas condições de encharcamento, Yu et al. (1969) concluíram que, quando o solo está saturado, a difusão de oxigênio é intensamente reduzida. Contudo, algumas plantas são supridas de oxigênio por aeração interna, através de espaços intracelulares (aerênquima). Deste modo, o suprimento de oxigênio é, em parte, dependente da porosidade das raízes e, segundo os autores, esta característica está associada à tolerância ao excesso de água no solo por períodos prolongados. Depois de uma ampla revisão sobre o assunto, Kawase (1981) concluiu que existem claras evidências de que as plantas tolerantes ao encharcamento possuem um sistema de transporte de oxigênio para as raízes bem mais desenvolvido do que as não tolerantes.

Diversos fatores relacionados com a anatomia e metabolismo da planta estão ligados à tolerância ao encharcamento. Nas raízes, o acúmulo de etileno e o metabolismo anaeróbico são os principais fatores. O acúmulo de etileno ocorre devido a sua baixa difusão em água e promove uma série de modificações morfológicas nas raízes, como inibição do crescimento e indução à formação de esclerênquima (Armstrong et al., 1994). A tolerância à anoxia está relacionada com a ação coordenada de adaptações morfológicas, anatômicas e bioquímicas (Bucher & Kuhlemeier, 1993). Foi estabelecido que o estresse anaeróbico induz mudanças no padrão protéico em várias espécies. Isto ocorre porque a síntese de proteínas é alterada devido à dissociação dos poliribossomos, impossibilitando a tradução do mRNA e afetando o metabolismo e o nível energético celular (Kennedy et al., 1992).

Ao nível metabólico, a baixa disponibilidade de oxigênio induz alterações na expressão de genes nas plantas. Um grupo de 20 polipeptídios anaeróbicos (ANP's) foram seletivamente sintetizados em raízes primárias de milho após cinco horas de anoxia (Sachs et al., 1980). No mesmo tempo, a síntese de proteínas aeróbica foi na sua maioria reprimida. Esses polipeptídios anaeróbicos têm sido bastante estudados em milho e, de maneira geral, estão envolvidos na glicólise e fermentação, tais como álcool desidrogenase (Sachs & Freeling, 1978; Russel & Sachs, 1992; Andrews et al., 1993), lactato desidrogenase (Kennedy et al., 1992), piruvato descarboxilase (Wignarajah & Greenway, 1976; Lazlo & Lawrence, 1983) e frutose-1,6 bifosfato aldose (Kennedy et al., 1992). Crawford (1992) citou que o fenômeno mais associado com o déficit de oxigênio é a indução da síntese e da atividade da enzima álcool desidrogenase, confirmando os dados de Sachs & Freeling (1978), onde esta enzima era o principal polipeptídio anaeróbico sintetizado no milho em condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

Em milho, a enzima álcool desidrogenase (ADH) apresenta dois locos (Adh-1 e Adh-2) que se expressam durante os primeiros estádios do desenvolvimento da semente, cuja atividade enzimática decresce durante a germinação da semente. Estes locos são muito estudados, sob o aspecto de regulação gênica porque têm uma função definida sob condições anaeróbicas, as quais ocorrem em consequência do excesso de retenção de água no solo após chuvas pesadas (Schwartz, 1969; Scandalios, 1974; Freeling, 1983).

Schwartz (1969) mostrou que o loco Adh-1 não tinha uma função essencial no desenvolvimento da planta ou do pólen, entretanto, através de mutações induzidas no loco Adh-1, observou que sementes homozigotas mutantes não eram capazes de

sobreviver sob condições de encharcamento. As sementes com Adh-1 ativo tinham maior capacidade para se desenvolver em condições anaeróbicas do que as com Adh-1 nulo. A interpretação do autor foi de que, embora o gene não fosse importante para o desenvolvimento da planta sob condições normais, era essencial para a sua sobrevivência em condições adversas. Uma possível explicação para o mecanismo de aumento de atividade de Adh-1 em condições anaeróbicas é que, com o bloqueio do ciclo de Krebs (metabolismo aeróbico), há um acúmulo de piruvato, que é descarboxilado para formar acetaldeído, o qual atua como um substrato para induzir a atividade da ADH. Este mecanismo é interessante porque a atividade de Adh-1 favorece o reverso da reação normal em condições aeróbicas, trazendo vantagens em termos de respiração anaeróbia e resistência ao encharcamento (Scandalios, 1974).

Quando o experimento foi estendido para o loco Adh-2, usando-se mutações que inativavam simultaneamente ambos os genes Adh-1 e Adh-2 em plântulas de três dias, Freeling (1983) observou que tais plantas eram extremamente sensíveis ao encharcamento e apresentavam desenvolvimento fraco, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. Isto fez com que se concluísse que ambos os locos contribuíam para a sobrevivência em termos de resistência ao encharcamento, sendo o loco Adh-1 o mais importante.

Durante o estresse de encharcamento a planta fica sujeita a uma situação de hipoxia, na qual necessita utilizar o metabolismo anaeróbico para suprir suas necessidades de energia. A fermentação láctica ocorre nos primeiros 20 minutos de hipoxia (Dennis et al., 1993), mas não persiste devido à acidificação que provoca no citosol. No milho, quando ocorre uma pequena queda de pH, 7,3 para 6,8, entra em ação a fermentação alcoólica, com a atividade das enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e

álcool desidrogenase (ADH), levando o piruvato proveniente da glicólise, primeiro a aldeído acético, pela ação da PDC e, finalmente, a etanol, pela ação da ADH (Kennedy et al., 1992). O etanol, produto final da fermentação alcoólica, é potencialmente tóxico quando se acumula no interior da célula; no entanto, dificilmente chega a níveis fitotóxicos devido às diversas possibilidades da sua eliminação pela planta (Armstrong et al., 1994). Já o aldeído acético, o intermediário entre o piruvato e o etanol, acumula-se causando danos à célula, principalmente quando ocorre a reoxidação do meio e a reação aldeído acético \Rightarrow etanol reverte, ocasionando um excesso deste no citosol (Pfister-Sieber & Bränble, 1994).

A acidose, acidificação do citoplasma, é a principal causa de morte da célula. Ocorre devido ao colapso do gradiente de prótons entre o vacúolo e o citoplasma, que, com o tempo, perde prótons (H^+) do vacúolo para o citoplasma, baixando o pH (Roberts et al., 1984). As plantas tolerantes são aquelas que conseguem passar mais rapidamente da fermentação láctica para a alcoólica e, por mais tempo, não só reter a acidificação, como também alcalinizar o meio (Kennedy et al., 1991). No entanto, a morte pode ocorrer também após o período de hipoxia, por lesões causadas aos lipídios de membrana e proteínas por radicais super óxidos. O tecido primeiro perde a consistência, logo após, desintegra-se. Provavelmente, espécies tolerantes tenham melhor proteção através do acúmulo de anti-oxidantes e pela indução de enzimas superóxido dismutase (SOD) (Armstrong et al., 1994).

Uma ampla revisão sobre os efeitos do encharcamento, em culturas anuais, e sobre as estratégias de melhoramento para superá-los foi realizada por Silva (1986). Segundo o autor, um conjunto de práticas culturais, associadas ao uso de cultivares tolerantes, poderá proporcionar o desenvolvimento da agricultura em áreas hoje

consideradas impróprias, abrindo uma fronteira agrícola de elevada produtividade e estabilidade. Em teste de campo, Ali (1976) concluiu que o encharcamento prejudicava significativamente a produção de grãos de milho e as reduções dependiam do tempo de encharcamento e do estágio de desenvolvimento das plantas. Vários autores relataram que o maior dano e redução de produção de milho acontecem quando o estresse ocorre no início do estágio vegetativo (Joshi & Dastane, 1966; Ritter & Beer, 1969; Chaudhary et al., 1975; Singh & Ghildyal, 1980; Kanwar et al., 1988; Mukhtar et al., 1990).

Em trabalho realizado com encharcamentos do milho na fase vegetativa, de floração e de enchimento do grão, por períodos que variaram de dois a oito dias, foi evidenciado que a cultura é muito sensível ao excesso hídrico do solo, principalmente na fase vegetativa e de floração, e o dano causado aumenta diretamente com a duração do encharcamento (Schild et al., 1999).

Considerando que as pesquisas conduzidas a campo, para determinação de tolerância à deficiência de oxigênio no solo, são necessárias, mas de difícil execução, uma vez que existem fatores nas relações solo-água-clima-plantas que não podem ser quantificadas, nem controladas adequadamente, Lopes et al. (1988) sugerem métodos de "screening" em condições artificialmente controladas, para serem utilizados como ferramentas auxiliares ao trabalho de melhoramento genético de plantas, sob condições de estresse.

Para descrever os sintomas em trigo e avaliar a reação de diferentes cultivares Caetano et al. (1977) e Scheeren (1990) utilizaram vasos com solo encharcado. Os autores observaram grandes diferenças no sistema radicular de plantas provenientes de vários cruzamentos. Houve uma correlação positiva entre as plantas que apresentaram um bom desenvolvimento radicular nessas condições e a sua

sobrevivência e produção. Gama & Parentoni (1992), trabalhando com seleção massal em um composto de milho, após alguns ciclos, identificaram os caracteres transpiração, resistência difusiva, porosidade de raiz e rendimento de grãos como indicadores para a seleção de tolerância ao encharcamento. Na Embrapa Clima Temperado, em 1988, foi iniciado um trabalho de identificação de genótipos de milho tolerantes às condições de excesso de umidade do solo, utilizando, além dos ensaios de campo, o método de seleção em copos como auxiliar para a avaliação de plantas na fase inicial do desenvolvimento. Foi observando, neste trabalho, que existe variabilidade na espécie capaz de ser aproveitada em programas de melhoramento (Porto et al., 1990; Porto et al., 1992). Silva et al. (1997) utilizaram, além do método dos copos, marcadores isoenzimáticos, visando identificar padrões para a enzima ADH, correlacionados com a tolerância ao encharcamento. Resultados preliminares indicam haver diferenças entre os padrões eletroforéticos de genótipos tolerantes e sensíveis.

Nas últimas duas décadas, um grande conteúdo de informação em nível molecular, bioquímico, fisiológico, anatômico e morfológico tem sido acumulado sobre respostas de plantas ao alagamento e anoxia (Kennedy et al., 1992; Vartapetian & Jackson, 1997; Van Toai et al., 2001). No entanto, estudos sobre a genética do caráter tolerância ao encharcamento são escassos. Entre os critérios usados para avaliação da tolerância ao encharcamento, é possível citar: sobrevivência, coloração da folha, estatura de planta, biomassa de raiz e parte aérea, conteúdo de clorofila e rendimento de grãos (Van Toai et al., 2001). A variabilidade genética para tolerância à anoxia ocorre em diversas espécies, como arroz (Setter et al., 1997), soja (Van Toai et al., 1994), trigo (Boru et al., 2001) e milho (Lemke-Keyes & Sachs, 1989; Sachs et al., 1996; Subbaiah & Sachs, 2003). No caso do arroz, Setter et al. (1997) sugerem que um gene para um fator de transcrição poderia estar envolvido na expressão de uma cascata de múltiplos genes que conferiam a tolerância à submergência. Para trigo, Boru et al. (2001) indicam que a tolerância ao encharcamento é um caráter quantitativo. Estudando os aspectos genéticos envolvidos na tolerância ao encharcamento, Scheeren (1990) verificou,

através da análise da capacidade combinatória entre 12 genótipos de trigo, que os efeitos aditivos e não-aditivos eram significativos. Em milho, Sachs et al.(1996) verificaram que a ação gênica era de dominância com poucos genes governando a manifestação do caráter. Segundo Subbaiah & Sachs (2003), resultados de cruzamentos entre os genótipos tolerantes à anaerobiose com a linhagem sensível (Mo20W) e a linhagem (B73Ht) normal mostraram que a característica tolerância à anoxia era dominante, apresentando segregação simples.

Até pouco tempo atrás, os únicos genes descritos em plantas, que são induzidos em condição de anoxia ou hipoxia, codificam enzimas do metabolismo da glicose fosfato, principalmente glicólise e fermentação alcoólica (Sachs, 1993; Sachs, 1994; Sachs et al., 1996). Trabalhando com arroz, Huq & Hodges (2000) identificaram três sistemas de genes que parecem funcionar fora da rota glicolítica.

– MAPEAMENTO GENÉTICO

O uso de marcadores de microsatélites em milho tem obtido muito sucesso e, em alguns casos, com vantagem em relação a outros tipos de marcadores como RFLP e RAPD. As principais vantagens são o elevado conteúdo de polimorfismo, a repetibilidade, o padrão de discriminação, a análise mais rápida e o custo menor que do RFLP (Katzir et al., 1996; Phelps & Buckner, 1996; Smith et al., 1997; Lubberstedt et al., 1998).

Diversos trabalhos de mapeamento de caracteres de importância agrônômica em milho têm sido publicados. Caracteres como rendimento de grãos (Veldboom & Lee, 1994; Ajmone et al., 1995), estatura de planta (Beavis et al., 1991; Koester et al., 1993), ciclo (Koester et al., 1993; Ribaut et al., 1996), altura de inserção de espiga (Veldboom et al., 1994), qualidade de amido e proteína (Goldman et al., 1993), entre outros, têm recebido atenção por parte dos pesquisadores. Nesses trabalhos têm sido

identificadas regiões associadas com a herança de caracteres quantitativos (QTL) com ação gênica de sobredominância e a presença de pleiotropia.

Anualmente, são cultivados, no RS, em torno de um milhão de hectares com arroz irrigado, permanecendo quase a mesma quantidade de área em pousio ou com pecuária de baixo retorno econômico. Se 25% desta área fosse cultivado com milho e considerando o rendimento médio estadual de 3.200 kg/ha, seria obtido um incremento de produção de 800.000 toneladas, o que cobriria o déficit de milho no Estado. Deste modo, desenvolver metodologias para identificar genótipos de milho tolerantes ao encharcamento do solo é de fundamental importância para o avanço rápido na obtenção de populações, linhagens e híbridos adaptados à condição de excesso de água dos solos de várzea de clima temperado.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram determinar a herança do caráter tolerância ao encharcamento e identificar marcadores de DNA associados a esta tolerância, com base nos caracteres matéria seca da parte aérea e da raiz em plantas jovens de milho conduzidas em casa de vegetação.

O trabalho foi dividido em três artigos. No primeiro, intitulado “*Capacidade combinatória para o caráter tolerância ao encharcamento do solo em milho*”, foram avaliados quatro linhagens e seus híbridos, obtidos seguindo um esquema dialélico completo. Os genitores utilizados foram duas linhagens tolerantes ao encharcamento do solo (R1 e R2) e duas sensíveis (S5 e S6) selecionados do programa de melhoramento de milho da Embrapa Clima Temperado. O segundo artigo, “*Herança do caráter tolerância ao encharcamento do solo em milho*”, é resultado do estudo de três populações provenientes de cruzamentos entre a linhagem tolerante (R2) e as sensíveis (S5 e S6). O terceiro artigo, “*Identificação de QTL para tolerância ao encharcamento em milho*”, foi realizado a partir de famílias F₃ provenientes do cruzamento entre a linhagem tolerante (R2) e a sensível (S5). Esta população foi escolhida por apresentar os dois genitores mais contrastantes para o caráter tolerância ao encharcamento do solo.

CAPÍTULO 1

CAPACIDADE COMBINATÓRIA PARA O CARÁTER TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM MILHO

1.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a produção da maioria das espécies vegetais cultivadas são prejudicados em solos mal drenados devido à falta de oxigênio livre no solo, tendo sua sobrevivência e reprodução comprometidas nestas condições (Vartapetian & Jackson, 1997). A falta de oxigênio afeta diretamente raízes, sementes e outros órgãos, uma vez que a água nos poros do solo impede trocas gasosas (Armstrong, 1979). O excesso de água no solo reduz o nível de O₂ e, conseqüentemente, a taxa de difusão (TDO), afetando dessa forma o crescimento e o desenvolvimento das espécies de sequeiro. O comportamento de espécies como milho, soja e sorgo é variável em relação a TDO no solo. Todavia, o crescimento das raízes da maioria das plantas é limitado quando a taxa de difusão de O₂ no solo for menor que 0,2 µg cm⁻² min.⁻¹, ou quando o espaço poroso do solo, ocupado com ar, for menor que 10% (Gomes et al, 2002). A extensão de danos decorrentes do encharcamento do solo depende de vários fatores, incluindo a duração do período de saturação, o estágio de desenvolvimento da planta, a espécie e as condições ambientais. Para a cultura do milho, as reduções no rendimento de grãos em áreas encharcadas são mais pronunciadas quando o estresse ocorre no

início do estágio vegetativo (Ali, 1976; Singh & Ghildyal, 1980; Kanwar et al., 1988; Mukhtar et al., 1990).

No sul do Brasil existe uma grande extensão geográfica ocupada pelas várzeas, as quais contam com infra-estrutura instalada, de irrigação, drenagem e facilidade de escoamento das safras (Winkler, 1986). Neste sentido, a cultura do milho poderia ser uma alternativa para estas áreas, entretanto, o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao encharcamento é condição fundamental para viabilizar economicamente esta opção. A existência de variabilidade genética na cultura do milho para tolerância ao encharcamento do solo foi identificada por vários autores (Lemke-Keyes & Sachs, 1989; Porto et al., 1990; Sachs et al., 1996). Esses autores utilizaram diferentes técnicas, mas os caracteres avaliados têm sido sobrevivência das plantas, biomassa, atividade enzimática, matéria seca de raiz e de parte aérea e conteúdo de clorofila na folha. A herança desta tolerância tem sido investigada e o tipo de ação gênica predominante é a dominância, com poucos genes envolvidos na manifestação do caráter (Sachs et al., 1996).

A realização de uma seleção eficiente depende do entendimento da herança da tolerância e da variabilidade genética existente. Um mecanismo utilizado para estudos de herança é a análise dialélica. Essa análise fornece informações importantes, como capacidade geral e específica de combinação, variâncias genéticas, herdabilidades e efeitos maternos, dependendo do método e do modelo utilizado (Griffing, 1956). A avaliação da capacidade combinatória é fundamental em programas de melhoramento de milho para a seleção de genitores (Vacaro, 1999; Ferreira et al., 1995; Vasal et al., 1992). A

escolha dos genitores para a formação de híbridos ou populações determina o potencial genético que pode ser alcançado nos cruzamentos realizados, influenciando na obtenção de gerações segregantes e híbridos com alta frequência de genes desejáveis (Fehr, 1987).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo determinar a capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e efeito recíproco (ER) para o caráter tolerância ao encharcamento do solo em quatro genótipos de milho, com base nos caracteres matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSP), visando a escolha de genitores, e tipo de ação gênica predominante para o caráter.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

A análise foi baseada em genótipos provenientes de cruzamentos entre quatro linhagens seguindo um esquema dialélico completo. Os genitores utilizados foram duas linhagens tolerantes ao encharcamento do solo, linhagem CT954280 e CT954330, e duas linhagens sensíveis CT966200 e CT966208, denominadas neste trabalho como (R1 e R2) e (S5 e S6), respectivamente. Estas linhagens foram obtidas do programa de melhoramento de milho da Embrapa Clima Temperado. A caracterização destas linhagens quanto à tolerância ao encharcamento foi realizada através de testes no campo e em casa de vegetação com inundação artificial, avaliando o comportamento dos genótipos para os caracteres coloração das folhas, vigor, sobrevivência, matéria seca de raiz e parte aérea e em laboratório foi feita a caracterização através da eletroforese para a enzima álcool desidrogenase (Silva et al., 1997).

O trabalho experimental foi realizado durante dois anos em casa de vegetação localizada na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. O delineamento experimental foi blocos casualizados com duas repetições. Foram avaliadas 14 plantas por repetição de cada geração: genitores, F₁ e recíprocos.

Nos dois anos os experimentos foram conduzidos de julho a setembro, sendo mantidas as temperaturas mínimas em 25°C dentro da casa de vegetação. Para a suplementação de luz, utilizou-se lâmpadas mistas, ligadas no período das 17 às 21 horas. Os genótipos de milho foram semeados em copos plásticos com 10,5cm de altura com capacidade para 200ml, perfurados na base e preenchidos com solo contendo 20% esterco e 80% terra. No segundo ano, visando facilitar a coleta das raízes, não foi utilizado esterco. Os copos foram colocados em tanques de madeira revestidos por lona plástica para evitar a saída da água. Um dia antes da semeadura foi colocada uma lâmina de água de 4cm, ficando o nível da água no tanque abaixo da metade do copo. Na semeadura empregou-se uma semente por copo, com o embrião voltado para cima, à profundidade de 2cm, aproximadamente. Após 11 dias da emergência, foi realizada a primeira inundação com uma lâmina de 12cm de água, deixando os copos submersos e assim foram mantidos por quatro dias. Depois desse período de inundação, foi drenado todo o excesso de água da caixa e foi realizada adubação de cobertura na proporção de 120kg de N/ha. Posteriormente, por um período de dez dias, foi mantida uma lâmina de 4cm de água nos tanques, ao final deste período foi realizada a segunda inundação nas mesmas condições da primeira. Logo após, foi retirada a água dos tanques e, ao final de sete dias, as plantas foram colhidas.

A determinação de variáveis para estudos de estresses abióticos não é uma tarefa fácil, uma vez que o nível de estresse pode invalidar algumas variáveis

relacionadas com o caráter de interesse. Neste trabalho, com base em dados da literatura (Silva, 1999; Dias-Filho & Carvalho, 2000; Vitorino et al., 2001), foram definidas como variáveis principais para determinar o nível de tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem a matéria seca da raiz (MSR) e a matéria seca da parte aérea (MSP). Estas variáveis representam uma medida final do comportamento de vários mecanismos ligados indiretamente à sobrevivência e ao diferencial de comportamento entre genótipos tolerantes e sensíveis. Além destes, foram avaliados outros caracteres como estatura de planta, comprimento de raiz e conteúdo de clorofila na folha. Assim sendo, os genótipos tolerantes foram considerados como aqueles com maiores pesos de matéria seca da parte aérea e de raiz durante as duas inundações alternadas realizadas nos primeiros 35 dias de desenvolvimento das plântulas de milho.

A avaliação das características foi realizada da seguinte maneira: matéria seca da raiz (mg) e matéria seca da parte aérea (mg), obtidas pesando individualmente cada planta após a secagem em estufa por quatro dias a 65°C; estatura de planta (cm), referente à distância entre o nível do solo e a ponta da última folha totalmente desenvolvida; comprimento de raiz (cm), medido entre a ponta da raiz mais longa e o último nó do qual havia emissão de raízes; e conteúdo de clorofila na folha, foi obtido um dia antes da colheita, através da medida direta com clorofilômetro em unidades SPAD, em três pontos da última folha totalmente desenvolvida.

Os dados das variáveis em estudo foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. A análise dialélica foi realizada conforme Griffing (1956), considerando o modelo fixo e o método I, que estima os efeitos de capacidade geral e específica de combinação e efeitos recíprocos para p^2 combinações. O modelo de Griffing considera que:

$$Y_{ij} = m + g_i + g_j + s_{ij} + r_{ij} + e_{ijk},$$

onde: Y_{ij} = valor médio da combinação híbrida ($i \neq j$) ou do genitor ($i=j$); m = média geral; g_i, g_j = efeitos de CGC do i -ésimo ou j -ésimo genitor ($i, j = 1, 2, \dots, p$); s_{ij} = efeito de CEC para os genitores de ordem i e j ; r_{ij} = efeito recíproco que mede as diferenças proporcionadas pelo genitor i , ou j , quando utilizado como macho ou fêmea no cruzamento ij ; e_{ijk} = erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. Neste modelo são considerados $s_{ij} = s_{ji}$, $r_{ij} = -r_{ji}$ e $r_{ii} = 0$.

Os componentes quadráticos para o modelo fixo adotado foram estimados conforme Cruz & Regazzi (1997):

$$\phi_g = (QMG - QMR)/2p$$

$$\phi_s = (QMS - QMR)$$

$$\phi_{rc} = (QMRC - QMR)/2$$

onde:

ϕ_g = componente quadrático associado à capacidade geral de combinação (CGC)

ϕ_s = componente quadrático associado à capacidade específica de combinação (CEC)

ϕ_{rc} = componente quadrático associado ao efeito recíproco (ER)

QMG = quadrado médio da CGC

QMS = quadrado médio da CEC

QMRC = quadrado médio do RC

QMR = quadrado médio do resíduo

p = número de genitores envolvidos no dialélico

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância apresentou significância para os tratamentos em todas as variáveis analisadas, sugerindo a existência de variabilidade genética entre os genótipos cruzados. Assim sendo, a soma de quadrados de tratamentos foi decomposta em capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC) e efeitos recíprocos, onde todas também foram significativas, com exceção do efeito recíproco na variável conteúdo de clorofila (Tabela 1.1). Estes resultados sugerem que o caráter tolerância ao encharcamento é controlado por genes com ação aditiva e não aditiva, existindo um efeito materno pronunciado. Segundo Cruz & Regazzi (1994), os componentes quadráticos expressam a variabilidade genética do material estudado em termos de CGC, CEC e ER. Como visto na Tabela 1.1, a magnitude dos componentes quadráticos associados a CEC e ER, evidencia a maior importância dos efeitos não aditivos para todas as variáveis e genótipos estudados. Para a cultura do milho este resultado, ou seja, maior importância dos efeitos não aditivos, tem duas consequências importantes: Primeiro, em se tratando de obtenção de variedades híbridas de milho, a superioridade dos efeitos não aditivos é muito importante. Por outro lado quando se trata do melhoramento e seleção de linhagem este resultado indica que a seleção é mais eficiente quando realizada em gerações mais avançadas quando os efeitos de dominância são menos pronunciados.

O efeito materno observado pode ser devido à ocorrência de herança citoplasmática ou a genes modificadores presentes em um dos pais, entretanto, no presente trabalho não foi possível explicar esse fenômeno. Existem relatos de que o controle do pH poderia estar relacionado com um

mecanismo de tolerância ao encharcamento, sendo que genes citoplasmáticos envolvidos na manifestação deste caráter foram descritos em feijão, milho, ervilha e soja (Roberts et al., 1985; Roberts et al., 1992). Conforme resultados desses autores, genótipos tolerantes apresentam maior controle do pH, não permitindo a acidose citoplasmática.

Analisando o comportamento das linhagens e híbridos para MSR e MSP, foi verificado que as linhagens R2 e R1 apresentaram o maior valor de matéria seca nos dois anos, sendo a linhagem R2 o melhor genótipo para ambos os caracteres (Tabela 1.2). As linhagens sensíveis S5 e S6 somente diferiram significativamente para a variável MSP no ano de 2000. Os híbridos apresentaram valores superiores ao dos pais, revelando heterose para os caracteres. Uma exceção foi para o híbrido entre as linhagens tolerantes (R1 x R2), que nos dois anos de avaliação apresentou valor inferior ao genitor R2 para MSP e MSR, quando a linhagem R1 era utilizada como genitor feminino, isto sugere que este genótipo não possui um sistema radicular com mecanismo eficiente de tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem. Os híbridos que apresentaram melhor rendimento de matéria seca tinham como genitor comum a linhagem tolerante R2 e os piores híbridos tinham como genitor comum a linhagem R1. Os híbridos entre as linhagens sensíveis apresentaram valores similares ou superiores ao melhor genitor tolerante, linhagem R2, este forte comportamento heterótico sugere que o caráter é governado por mais de um gene, os quais atuam de maneira complementar e com participação importante da ação gênica de dominância. Resultados similares também foram encontrados por Sachs et al. (1996).

TABELA 1.1. Resumo da análise de variância, média e coeficiente de variação (CV) para as variáveis matéria seca da parte aérea (MSP), matéria seca da raiz (MSR), conteúdo de clorofila (CL), estatura de planta (EP) e comprimento de raiz (CR) em 16 genótipos de milho conduzidos em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.

Causas da variação	GL	Quadrado médio						
		MSP (mg/planta)		MSR (mg/planta)		CL (SPAD)	EP (cm)	CR (cm)
		2000	2001	2000	2001	2001	2000	2000
Genótipo	15	99.201 **	119.859 **	23.170 **	21.414 **	9,38 *	75,0 **	37,5 **
CGC	3	60.184 **	180.295 **	14.348 **	35.056 **	13,05 **	80,0 **	25,0 **
CEC	6	171.027 **	160.812 **	31.381 **	25.056 **	13,18 **	105,0 **	63,0 **
Recíproco	6	46.884 **	48.687 *	19.370 **	10.949 **	3,73	43,0 **	18,0 **
ϕ_g ¹		3.713	10.539	867	2.099	0,690	4,68	1,37
ϕ_s ²		85.128	74.572	15.452	11.797	5,591	49,81	29,92
ϕ_{rc} ³		11.528	9.254	4,723	2.371	0,432	9,62	3,86
Média		805	562	359	236	28,7	59,3	29,9
CV (%)		3,65	19,21	7,15	16,21	5,34	3,56	5,87

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade;

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

¹ Componente quadrático associado à capacidade geral de combinação (CGC).

² Componente quadrático associado à capacidade específica de combinação (CEC).

³ Componente quadrático associado ao efeito recíproco (ER).

TABELA 1.2. Médias de matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) em 16 genótipos de milho conduzidos em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.

Genótipo	2000				2001			
	MSP (mg/planta)		MSR (mg/planta)		MSP (mg/planta)		MSR (mg/planta)	
R1 x R2	550,00	f	289,21	hi	459,40	cde	214,34	bcdef
R1 x S5	911,43	c	386,43	def	342,10	de	138,71	fgh
R1 x S6	715,00	e	342,86	efgh	617,90	bcd	230,42	bcde
R2 x R1	1.040,71	b	601,43	a	602,20	bcd	271,76	bc
R2 x S5	991,43	b	375,71	ef	913,80	ab	424,21	a
R2 x S6	1.029,29	b	397,14	cde	1.196,50	a	465,32	a
S5 x R1	848,57	cd	315,00	gh	450,10	cde	168,02	efg
S5 x R2	1.106,14	a	456,14	b	643,10	bcd	247,24	bcde
S5 x S6	809,05	d	384,52	def	584,50	bcd	264,09	bcd
S6 x R1	832,86	d	370,71	efg	539,00	cde	197,91	cdef
S6 x R2	1.033,50	b	437,50	bcd	782,30	bc	294,58	b
S6 x S5	906,43	c	453,57	bc	489,50	cde	267,14	bcd
R1	531,92	f	249,23	ij	395,40	de	181,82	defg
R2	687,15	e	332,23	fgh	486,70	cde	242,50	bcde
S5	376,15	g	151,54	k	204,80	e	64,23	h
S6	503,85	f	203,08	jk	290,00	de	103,80	gh

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

O comportamento médio dos genótipos, tanto as linhagens quanto os híbridos, para as variáveis MSR e MSP foi diferencial conforme o ano, sendo que no ano de 2000 o nível de manifestação destas variáveis foi superior (Tabela 1.2). Contudo, esta variação não alterou a classificação geral dos genótipos tolerantes, não determinando alterações importantes na análise genética do caráter. O comportamento diferencial de ano para ano pode ser explicado pelas variações de ambiente,

principalmente em relação à temperatura, que foi mais elevada no experimento conduzido em 2001. Este fator é muito prejudicial às plantas em condição de estresse por encharcamento (Lemke-Keyes & Sachs, 1989). Outro fator que pode ter influenciado na redução destas variáveis em 2001 foi o emprego de solo sem esterco.

Os caracteres estatura de planta e comprimento de raiz apresentaram correlação elevada com o peso de matéria seca da parte aérea e da raiz, enquanto que este parâmetro foi médio para o caráter teor de clorofila (Tabela 1.3). Isto sugere que não seria necessário avaliar tais variáveis, uma vez que as variáveis principais relacionadas com a produção de matéria seca têm maior facilidade e precisão de avaliação. Analisando o comportamento dos genitores para estatura de planta, a linhagem R2 foi mais alta do que a linhagem R1, sendo as linhagens S5 e S6 de comportamento intermediário (Tabela 1.3). Esse caráter na fase de planta jovem pode indicar o vigor do genótipo, que neste caso pode estar correlacionado com o comportamento de tolerância ao estresse aplicado. Em relação ao comprimento de raiz não houve diferença significativa entre os genitores. Para a variável conteúdo de clorofila na folha, as linhagens tolerantes R1 e R2 foram significativamente superiores às linhagens sensíveis S5 e S6. A habilidade para conservar os níveis de clorofila na folha sob condições de hipoxia ou anoxia é considerada um mecanismo de tolerância ao encharcamento em gramíneas (Baruah, 1996; Sarkar et al., 1996; Dias-Filho & Carvalho, 2000). Entre os híbridos não houve diferença significativa para conteúdo de clorofila na folha, sendo que todos apresentaram comportamento semelhante aos pais tolerantes.

TABELA 1.3. Médias de estatura de planta (EP), comprimento de raiz (CR) e conteúdo de clorofila (CL) e suas correlações com matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR), em 16 genótipos de milho conduzidos em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.

Genótipo	2000		2001	
	EP (cm)	CR (cm)	CL (SPAD)	
R1 x R2	51,71 f	27,21 fgh	28,45 ab	
R1 x S5	64,57 abc	36,29 ab	28,61 ab	
R1 x S6	55,79 ef	26,93 fgh	29,60 a	
R2 x R1	67,50 a	31,57 cde	31,64 a	
R2 x S5	66,00 ab	37,57 a	28,85 ab	
R2 x S6	63,07 abcd	33,71 abcd	30,12 a	
S5 x R1	64,00 abc	29,93 def	30,46 a	
S5 x R2	65,67 ab	34,43 abc	30,08 a	
S5 x S6	60,38 cde	26,74 fgh	29,67 a	
S6 x R1	58,93 de	32,86 bcd	28,63 ab	
S6 x R2	61,93 bc	31,73 cdef	27,61 ab	
S6 x S5	60,50 cd	28,29 efg	29,46 a	
R1	46,76 g	23,19 h	30,57 a	
R2	58,25 de	27,80 efg	28,19 ab	
S5	52,92 f	24,19 gh	22,88 c	
S6	51,00 fg	25,31 gh	25,03 bc	
r (MSP)	0,88	0,78	0,45	
r (MSR)	0,75	0,56	0,45	

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

As estimativas de CGC para ambas as variáveis MSP e MSR evidenciaram a superioridade da linhagem R2 para o caráter tolerância ao encharcamento (Tabela 1.4), sugerindo que esse genitor poderá contribuir com genes de ação aditiva para o caráter em programas de desenvolvimento de populações ou de formação de variedades híbridas. As demais linhagens

avaliadas neste trabalho apresentaram valores negativos para CGC, indicando que esses genótipos possuem genes de ação aditiva de menor efeito no incremento da tolerância ao encharcamento. No entanto, é importante destacar que essas linhagens possuem genes que contribuem para o caráter, o que está evidenciado no comportamento heterótico de seus cruzamentos. Provavelmente, nesses genótipos a ação gênica predominante seja de dominância, a qual não contribui para a estimativa de CGC.

TABELA 1.4. Efeito de capacidade geral de combinação para as variáveis matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) de quatro linhagens de milho conduzidas em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.

Genótipo	MSP		MSR	
	2000	2001	2000	2001
R1	-59,29	-87,15	-8,63	-37,91
R2	86,08	134,01	43,55	64,30
S5	-13,92	-83,24	-24,84	-31,27
S6	-12,87	36,37	-10,08	4,88

Os resultados de CEC também demonstraram a superioridade do genótipo R2, sendo que todos os cruzamentos com envolvimento dessa linhagem apresentaram CEC elevada (Tabela 1.5), com exceção do cruzamento R1 x R2, onde o genótipo R1 foi empregado como genitor feminino. Os efeitos recíprocos foram pronunciados, sendo que a escolha do genitor masculino ou feminino pode variar conforme a combinação. Estes resultados têm implicação prática no planejamento dos cruzamentos para tolerância ao encharcamento. O genótipo R2 deve ter alguma contribuição de origem

citoplasmática, uma hipótese a ser especulada seria o controle do pH citoplasmático em pontas de raízes, uma vez que Roberts et al. (1984) sugeriram que plantas que possuíam uma boa regulação do pH citoplasmático em pontas de raízes eram mais tolerantes ao encharcamento, comparando com plantas que acidificavam mais rapidamente o citoplasma.

TABELA 1.5. Efeito de capacidade específica de combinação (CEC) e recíproco para as variáveis matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) entre as combinações de quatro linhagens de milho conduzidas em casa de vegetação nos anos de 2000 e 2001. UFRGS, 2003.

Genótipo	MSP				MSR			
	2000		2001		2000		2001	
	CEC	Recíproco	CEC	Recíproco	CEC	Recíproco	CEC	Recíproco
R1 x R2	-36,02	-245,35	-78,41	-71,38	51,25	-156,10	-19,35	-28,71
R1 x S5	148,62	31,43	4,18	-53,99	25,03	35,71	-13,47	-14,65
R1 x S6	41,49	-58,93	66,89	39,46	16,36	-13,92	11,19	16,26
R2 x S5	172,04	-57,36	165,37	135,35	38,07	-40,21	66,69	88,49
R2 x S6	153,59	-2,12	256,68	207,10	24,70	-20,17	74,76	85,37
S5 x S6	79,73	-48,69	21,55	47,48	94,82	-34,52	56,00	-1,52

1.4. CONCLUSÕES

- A tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem em milho, expressa em matéria seca de raiz e de parte aérea, é herdável.
- A ação gênica aditiva como a não aditiva são importantes entre os genótipos estudados.
- Há variabilidade genética entre as linhagens R1, R2, S5 e S6 para o caráter tolerância ao encharcamento, sendo a linhagem R2 a mais indicada como genitor em cruzamentos que visem aumentar a tolerância ao encharcamento.
- O caráter tolerância ao encharcamento apresenta efeito materno e isto deve ser considerado na criação de variedades híbridas de milho.

CAPÍTULO 2

HERANÇA DO CARÁTER TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO DO SOLO EM MILHO

2.1. INTRODUÇÃO

Os solos de várzea do Sul do Brasil ocupam uma área aproximada de 6.800.000 ha e são cultivados, preferencialmente, com arroz irrigado. Segundo Klamt et al. (1985), a característica dominante nestes solos é a má drenagem ou hidromorfismo. Outro aspecto relevante que caracteriza estes solos é a fertilidade natural de média a baixa, o que contribui negativamente para a introdução de culturas de sequeiro nessas áreas (Gomes et al., 1992). Por outro lado, a necessidade de diversificação de culturas, a extensão geográfica ocupada pelas várzeas, sua localização e importância econômica, a infra-estrutura instalada de irrigação, a facilidade de escoamento das safras e a integração entre lavoura e pecuária são fatores que estão exigindo o melhor aproveitamento dessas áreas (Winkler, 1986).

A introdução de culturas de sequeiro em áreas com solos de várzea é problemática, uma vez que estas espécies têm seu desenvolvimento e produção prejudicados em solos mal drenados (Silva, 1986). A principal causa deste prejuízo é a falta de oxigênio livre no solo. No entanto, as espécies vegetais diferem quanto à resposta ao encharcamento do solo. A tolerância pode variar de somente poucas horas a

muitos dias ou semanas, dependendo da espécie, dos órgãos diretamente afetados, do estágio de desenvolvimento e de condições externas de temperatura (Vartapetian & Jackson, 1997).

Há variabilidade na espécie *Zea mays* L. para tolerância ao encharcamento do solo (Lemke-Keyes & Sachs, 1989; Porto et al., 1990; Sachs et al., 1996). Por outro lado, estudos sobre as bases genéticas da tolerância ao encharcamento são escassos. Estudos realizados em plântulas por Lemke-Keyes & Sachs (1989) e Sachs et al. (1996), utilizando cruzamentos entre linhagens tolerantes e sensíveis ao encharcamento, mostraram que o caráter tolerância a anoxia é dominante e apresenta segregação muito simples, indicando que um ou dois genes estão envolvidos na manifestação do caráter

Entretanto, Schild et al. (1999) mostraram que o milho é muito sensível em condições de saturação de água no solo, onde o dano causado aumenta diretamente com a duração do encharcamento. Assim sendo, para que a cultura do milho seja uma alternativa para rotação de culturas em áreas de várzea, é indispensável o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao encharcamento do solo. Este caráter é de difícil avaliação a campo, devido a grande variação de ambiente. Da mesma forma, o caráter tolerância à anoxia é complexo, estando relacionado com a ação coordenada de adaptações morfológicas, anatômicas e bioquímicas (Bucher & Kuhlemeier, 1993). De maneira geral, caracteres complexos apresentam baixa herdabilidade e são difíceis de selecionar diretamente. Uma metodologia que tem alcançado êxito é a da seleção indireta (McNeal et al., 1978; Van Oosterom & Ceccarelli, 1993), a qual consiste na seleção para um caráter que está associado com o caráter a ser melhorado. Esta técnica é vantajosa quando a herdabilidade do caráter indireto e a correlação com o caráter alvo são elevadas.

A matéria seca de raiz e de parte aérea de planta são caracteres de fácil avaliação e são correlacionados com a tolerância ao encharcamento (Silva, 1999; Dias-Filho & Carvalho, 2000; Lizaso et al., 2001; Vitorino et al., 2001; Dias-Filho, 2002).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi determinar a herança e a herdabilidade do caráter tolerância ao encharcamento, com base nos caracteres matéria seca da raiz e matéria seca da parte aérea, em plantas jovens de milho testadas em casa de vegetação.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizadas três linhagens de milho do programa de melhoramento para tolerância ao encharcamento da Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS). Estas linhagens foram previamente selecionadas por apresentarem comportamento diferenciado quanto à tolerância ao encharcamento, sendo a linhagem tolerante CT954330 denominada R2 e as linhagens sensíveis ao encharcamento do solo CT966200 e CT966208 denominadas S5 e S6.

No ano agrícola 1998/99 foram realizados cruzamentos para a obtenção de três populações na geração F_1 (R2 x S5, R2 x S6 e S5 x S6) no campo experimental da Embrapa Clima Temperado. No ano agrícola 1999/2000 os genitores e a F_1 foram semeados no campo experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção da F_2 e dos retrocruzamentos RC_1F_1 (RC_1) e RC_2F_1 (RC_2), onde a linhagem foi utilizada como genitor feminino e o F_1 como genitor masculino.

A avaliação da tolerância ao encharcamento foi realizada através de experimentos conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado nos anos

de 2000 e 2001. O delineamento experimental foi completamente casualizado com duas repetições. Foram avaliadas 15 plantas de cada geração fixa (genitores e F_1), 150 plantas da geração F_2 e 45 plantas de cada retrocruzamento. Os genótipos foram semeados em copos plásticos de 200ml perfurados na base e preenchidos com solo corrigido e adubado. Os copos foram colocados em tanques de madeira, revestidos com lona plástica para evitar o vazamento de água. Um dia antes da semeadura foi colocada uma lâmina de água de 4cm nos tanques. Nessas condições, a semeadura foi realizada com uma semente por copo, com o embrião voltado para cima, a uma profundidade de 2cm, aproximadamente. Após 11 dias da emergência das plantas, foi feita a primeira inundação com uma lâmina de 12cm de água ficando os copos submersos por quatro dias. Depois deste período de inundação, a água foi drenada da caixa e as plantas mantidas com uma lâmina de 4cm de água por dez dias. Em seguida, foi feita a segunda inundação. Após quatro dias de inundação, foi retirado o excesso de água e, ao final de sete dias, foi colhido o experimento.

As características avaliadas no experimento foram matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSP) da planta. Na colheita, as raízes e a parte aérea de cada planta de cada repetição foram colhidas separadamente. Após a lavagem, o material foi colocado em estufa a 60°C por cinco dias e, em seguida, foi realizada a pesagem.

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando o modelo

$$X_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + (\gamma/\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijkl},$$

onde: X_{ijkl} = valor observado para os caracteres MSR e MSP, μ = média geral do experimento, α_i = efeito do ano i , β_j = efeito da população j , $(\alpha\beta)_{ij}$ = efeito da interação ano x população, $(\gamma/\beta)_{jk}$ = efeito da geração k dentro da população j e ε_{ijkl} = erro

experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. Para o estudo da herança dos caracteres avaliados e obtenção das estimativas dos efeitos gênicos, foram analisadas as distribuições de frequências e obtidas as estimativas de médias e variâncias, assim como, de herdabilidade no sentido amplo e restrito. As distribuições de frequências foram obtidas pelo agrupamento de dados em classes, sendo os intervalos de classe estabelecidos arbitrariamente.

As variâncias foram estimadas com base nas fórmulas

$$VP = VF_2,$$

$$VE = (VP_1 + VP_2 + VF_1)/3,$$

$$VG = VP - VE,$$

$$VA = 2VF_2 - (VRC_1F_1 + VRC_2F_1),$$

onde: VP_1 , VP_2 , VF_1 , VF_2 , VRC_1F_1 e VRC_2F_1 representam as variâncias das gerações P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_1F_1 e RC_2F_1 , respectivamente (Mather & Jinks, 1982; Allard, 1999).

As estimativas de herdabilidade nos sentidos amplo (h^2_a) e restrito (h^2_r) foram calculadas segundo o modelo proposto por Allard (1999): $h^2_a = (VF_2 - VE)/VF_2$ e $h^2_r = [2VF_2 - (VRC_1F_1 + VRC_2F_1)]/VF_2$.

Os parâmetros genéticos média (m), aditividade (a) e dominância (d) foram estimados para cada cruzamento através da análise de média de gerações, utilizando o método dos quadrados mínimos esperados (Mather & Jinks, 1982). A estimativa foi seguida de teste de escala conjunto, comparando as médias observadas com as esperadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento das plantas foi variável conforme o ano de execução do experimento. Em 2000, o crescimento das plantas foi maior, resultando em aumento na

produção de matéria seca de raiz e de parte aérea (Tabela 2.1). Por outro lado, em 2001, foi observado um menor desenvolvimento, com as variáveis analisadas apresentando valores mais reduzidos. Este comportamento diferencial pode ser explicado pelas variações de ambiente, principalmente em relação à temperatura, que foi mais elevada no experimento conduzido em 2001. Temperaturas acima de 27°C são prejudiciais às plantas em condição de estresse por encharcamento (Lemke-Keyes & Sachs, 1989; Lizaso et al., 2001). Segundo Van Toai et al. (1985), as causas do aumento da suscetibilidade das plantas sob estresse de encharcamento sob altas temperaturas podem ser: reduzida solubilidade do oxigênio em água, maiores índices metabólicos na planta, acumulação de produtos tóxicos provenientes do maior metabolismo, elevados índices de expiração, e ou aumento na atividade de patógenos. Outro fator que pode ter influenciado na redução destas variáveis em 2001 foi o emprego de solo sem esterco, o que pode ter resultado em plantas menos vigorosas e mais sensíveis ao estresse.

TABELA 2.1. Médias das linhagens genitoras para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) e média geral do experimento conduzido em casa de vegetação, nos anos de 2000 e 2001, Embrapa clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.

Genótipo	MSP(mg)		MSR(mg)	
	2000	2001	2000	2001
R2	869,23 a	657,31 a	333,08 a	285,77 a
S5	406,15 c	224,12 c	180,38 c	81,37 c
S6	680,37 b	382,57 b	264,81 b	158,86 b
Média geral	825,24 A	609,24 B	341,82 A	264,28 B

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, ou de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

A interação genótipo x ambiente detectada impediu a análise conjunta dos anos, sem, no entanto, alterar a ordem de comportamento dos genitores nos dois anos. Os genitores manifestaram comportamentos bem diferenciados nos dois anos (Tabela 2.1). A linhagem R2 foi o genótipo com maior produção de matéria seca, tanto da raiz, quanto da parte aérea, confirmando a tolerância ao estresse, a linhagem S6 apresentou desempenho intermediário e a linhagem S5 demonstrou o pior comportamento com o encharcamento do solo, revelando maior sensibilidade a esse fator.

O comportamento médio da geração F_1 para o caráter matéria seca de planta foi superior ao dos genitores nas três populações estudadas, sugerindo a presença de ação gênica de sobredominância na manifestação do caráter, no sentido da tolerância (Tabela 2.2). As variâncias das gerações segregantes foram sempre mais elevadas do que aquelas observadas nas gerações fixas (Tabela 2.2), indicando a presença de variabilidade genética para matéria seca de parte aérea nos cruzamentos analisados. De maneira geral, as variâncias observadas nos pais e na geração F_1 foram reduzidas, sugerindo que o ambiente teve manifestação similar em todas as gerações. Os resultados de média e variância obtidos para a variável matéria seca da raiz foram semelhantes (Tabela 2.3), indicando também a presença de variabilidade genética e ação gênica de sobredominância nos três cruzamentos.

A análise de distribuição de frequências da população R2 x S5 demonstrou o comportamento diferencial dos genitores para a variável matéria seca de planta (Figura 2.1), indicando diferença para tolerância ao encharcamento. Os indivíduos da geração F_1 ficaram localizados em classes iguais ou superiores ao genitor tolerante, sugerindo a presença de dominância para o sentido de incrementar o caráter. Na geração F_2 foram observadas variação contínua e segregação transgressiva em relação aos

genitores. Esses resultados indicam que o caráter é determinado por muitos genes, os quais atuam de forma complementar entre os pais. Nesta geração também foi verificado um deslocamento no sentido de maior conteúdo de matéria seca, confirmando a ação gênica de dominância.

Para a população R2 x S6, houve uma pequena sobreposição das curvas dos genitores, sugerindo que a linhagem S6, de comportamento intermediário, também possui genes para tolerância ao encharcamento (Figura 2.1). A geração F₁ confirmou a presença de dominância no sentido da tolerância e a geração F₂ manifestou comportamento similar à população R2 x S5. No ano de 2001, a geração F₁ apresentou valores bem superiores quando comparadas às demais gerações, atingindo valores acima do maior indivíduo da F₂, esse comportamento pode ser atribuído a efeitos da interação genótipo x ambiente. A população S5 x S6 representou o cruzamento entre duas linhagens sensíveis ao encharcamento, sendo que o comportamento de todas as gerações confirmou os resultados anteriores e demonstrou que as linhagens possuem genes diferenciados para o caráter (Figura 2.1).

Para a variável MSR, as distribuições de frequências das três populações apresentaram comportamento similar aos verificados para MSP (Figura 2.2), indicando a presença de variabilidade genética entre os pais e ação gênica de dominância. No entanto, é importante destacar que este comportamento similar, observado entre as duas variáveis medidas, não significa, necessariamente, que os mesmos genes estão envolvidos em sua manifestação.

TABELA 2.2. Médias e variâncias de matéria seca da parte aérea (mg/planta) para os pais e as gerações F₁, F₂, RC₁ e RC₂ em três populações de milho avaliadas para tolerância ao encharcamento do solo, nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.

Geração	R2 x S5				R2 x S6				S5 x S6			
	Média (mg)		Variância		Média (mg)		Variância		Média (mg)		Variância	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
P ₁	885,8	685,7	4.026,5	2.641,8	855,0	624,2	4.826,9	7.299,2	435,4	222,6	2.626,9	5.073,8
P ₂	376,9	225,8	4.706,4	4.042,8	657,7	483,3	2.135,9	4.551,5	701,4	330,0	4.167,0	6.454,5
F ₁	1.007,3	718,8	5.078,1	7.518,3	1.023,0	1.630,4	5.201,1	7.529,4	782,4	621,7	4.199,0	7.571,0
F ₂	875,8	657,0	30.701,3	68.386,9	822,8	722,7	55.942,9	56.896,9	747,0	550,0	34.494,2	38.379,1
RC ₁	1.205,4	1.221,2	11.026,9	32.144,3	1.202,3	628,9	16.552,6	31.047,5	727,1	454,0	15.745,1	27.093,9
RC ₂	763,1	683,1	23.973,1	62.009,2	1.091,4	480,6	17.490,1	23.680,9	855,7	530,5	19.118,7	17.154,0

TABELA 2.3. Médias e variâncias de matéria seca da raiz (mg/planta) para os pais e as gerações F₁, F₂, RC₁ e RC₂ em três populações de milho avaliadas para tolerância ao encharcamento do solo nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.

Geração	R2 x S5				R2 x S6				S5 x S6			
	Média(mg)		Variância		Média (mg)		Variância		Média (mg)		Variância	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
P ₁	304,2	285,0	1.972,0	1.580,8	357,9	286,7	1.556,6	3.224,2	227,7	90,7	1.019,2	1.122,5
P ₂	133,1	70,8	1.023,1	999,3	264,6	150,8	1.426,9	1.226,5	265,0	163,0	1.242,3	1.767,6
F ₁	328,0	362,5	1.788,6	3.673,3	376,5	501,7	2.360,8	4.524,2	356,2	295,0	1.314,8	1.756,5
F ₂	401,3	284,6	8.882,1	13.486,4	316,1	303,7	11.397,9	13.743,2	265,5	261,7	7.713,5	9.406,8
RC ₁	641,5	411,2	7.197,4	11.369,3	606,9	318,4	9.973,1	8.446,2	332,1	208,0	3.741,2	6.987,8
RC ₂	453,8	227,6	3.175,6	5.368,9	445,4	224,9	3.124,9	7.300,5	414,3	262,7	6.226,4	4.752,1

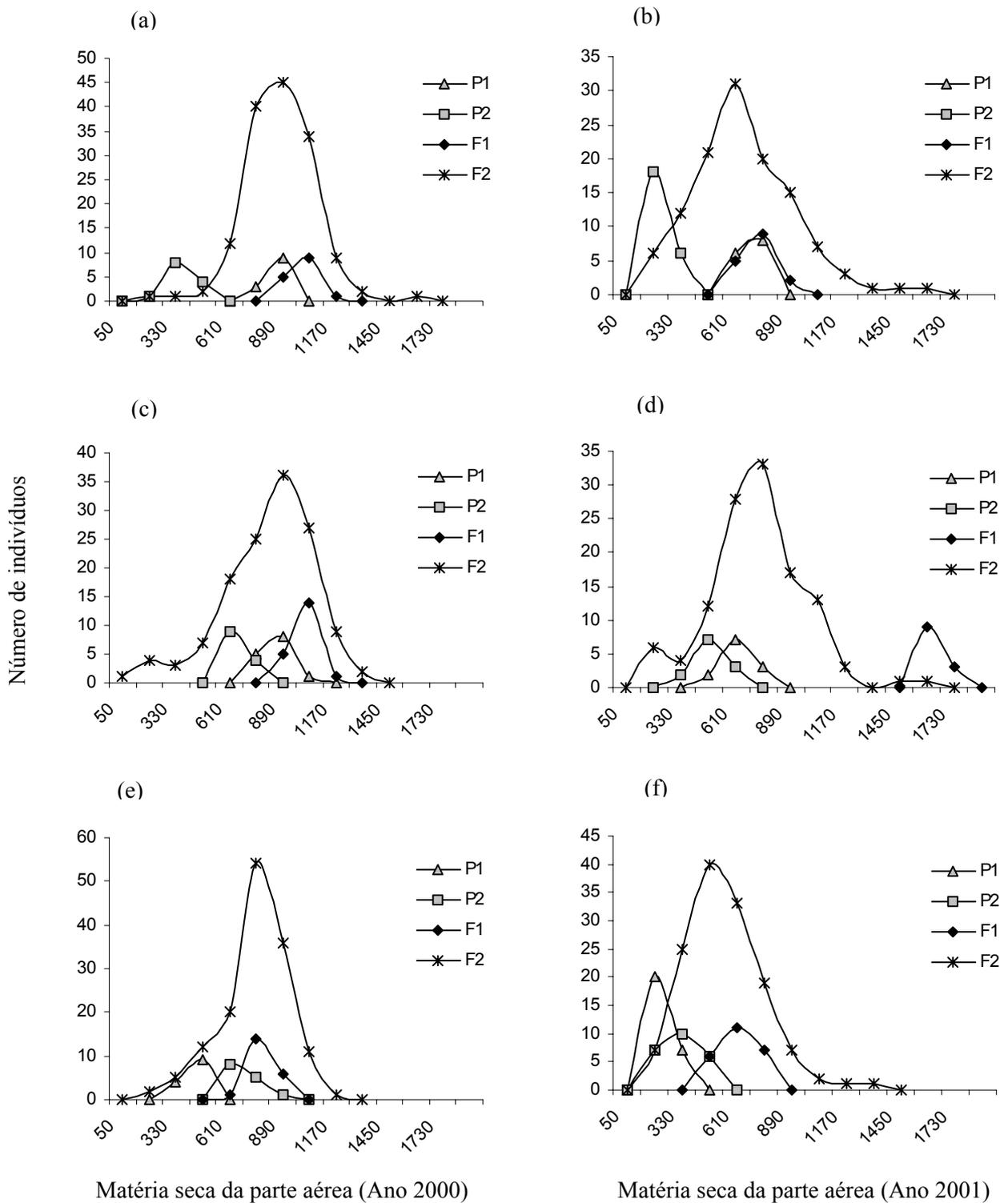
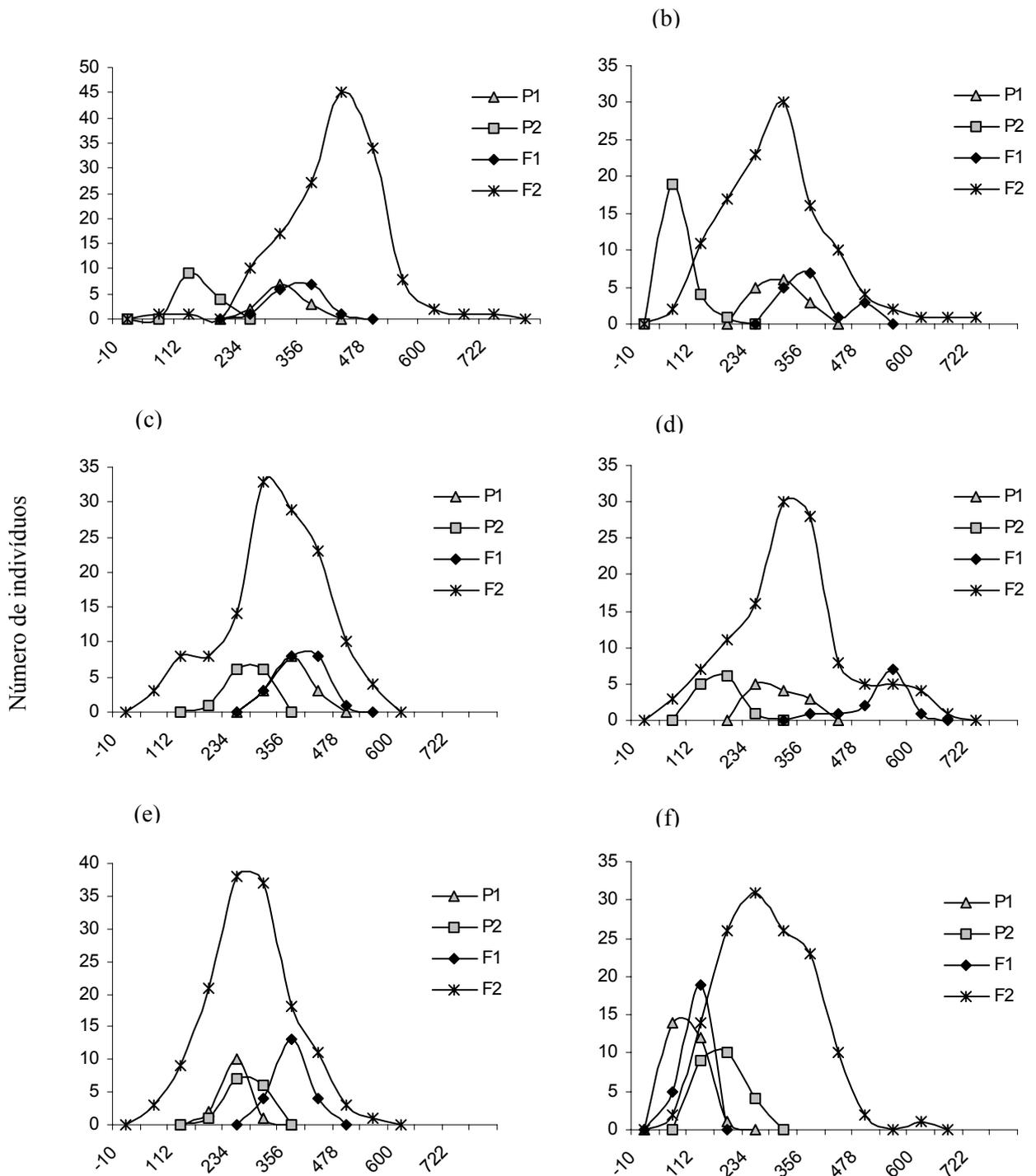


FIGURA 2.1. Distribuições de freqüências para matéria seca da parte aérea (mg) nas gerações P₁, P₂, F₁ e F₂ dos cruzamentos R2 x S5 (a e b), R2 x S6 (c e d) e S5 x S6 (e e f) nos anos 2000 (a, c e e) e 2001 (b, d e f). UFRGS, 2003.



Neste sentido, Ellis et al. (1999) demonstraram a existência de mecanismos adaptativos distintos para sobrevivência sobre hipoxia em raiz e parte aérea, indicando que o processo de fermentação alcoólica é essencial para as raízes, mas não para parte aérea. Da mesma forma, esses autores sugeriram que o hormônio ABA induz tolerância somente em raízes.

Esses resultados indicam que os genótipos estudados apresentam mais de um gene segregando para tolerância ao encharcamento, sendo que a ação gênica de dominância e a complementaridade dos genes foram aspectos importantes na manifestação do caráter. A literatura não apresenta dados referentes ao comportamento genético para os caracteres MSP e MSR em plantas cultivadas em condições de estresse anaeróbico. Entretanto, avaliando genótipos de milho para tolerância ao estresse anaeróbico, com base na sobrevivência de plantas, Sachs et al. (1996) encontraram que o tipo de ação gênica predominante tem sido a dominância, com poucos genes envolvidos na manifestação do caráter. Esse resultado está de acordo com Boru et al. (2001) e Setter et al. (1997).

As estimativas de variância revelaram que as variâncias genéticas foram altas para todos os cruzamentos estudados (Tabela 2.4), refletindo um alto grau de determinação genética para ambos os caracteres avaliados, conforme as estimativas de herdabilidade no sentido amplo. A variância aditiva, estimada a partir da relação da variância da geração F_2 e dos retrocruzamentos, também foi elevada em todos os cruzamentos, sendo superestimada para a variável MSP no cruzamento R2 x S6 (Tabela 2.4). As estimativas de herdabilidade no sentido restrito também foram elevadas, sendo que esses valores podem estar inflacionados devido a não avaliação da interação genótipo x ambiente. No entanto, em ambos os anos as estimativas foram altas,

superiores a 0,70, sugerindo que os caracteres MSP e MSR podem ser selecionados fenotipicamente com grande probabilidade de sucesso (Tabela 2.4). No caso do cruzamento R2 x S6, a herdabilidade no sentido restrito foi superior à unidade, este fato pode ser devido à interação genótipo x ambiente, a qual pode causar resposta diferenciada na geração F₂ e nos retrocruzamentos, por interações não alélicas ou por erros de amostragem (Ketata et al., 1976). Cruz (2001) também encontrou estimativa de herdabilidade no sentido restrito superior a unidade no estudo da tolerância ao frio na fase de germinação do arroz. Na literatura, dados de estimativa de herdabilidade para matéria seca da parte aérea e da raiz em condição de estresse são escassos. Silva et al. (2001), trabalhando com cinco populações de milho para tolerância ao encharcamento, encontraram estimativas de herdabilidade para MSP variando de 0,55 a 0,91 e para MSR, de 0,78 a 0,95.

As estimativas dos efeitos gênicos pelo modelo de três parâmetros (Mather & Jinks, 1982) foram adequadas para o cruzamento S5 x S6, nos dois anos de avaliação, tanto para MSP como para MSR (Tabela 2.5). Nos demais cruzamentos o modelo não foi adequado para os dados de MSP em 2001 e MSR em 2000. Este comportamento está associado aos efeitos de epistasia e com a interação genótipo x ambiente, que em condições de estresse é mais pronunciada. Os resultados desta análise confirmaram as observações realizadas nas distribuições de frequência, demonstrando a participação efetiva dos efeitos de dominância (Tabela 2.5).

TABELA 2.4. Variância fenotípica (VP), variância genética (VG), variância aditiva (VA), herdabilidade ampla (h_a^2) e herdabilidade restrita (h_r^2) para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) estimadas em três cruzamentos de milho nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.

Parâmetro	R2 x S5				R2 x S6				S5 x S6			
	MSP		MSR		MSP		MSR		MSP		MSR	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
VP	30.701,3	68.386,9	8.882,1	13.486,4	55.942,9	56.896,9	11.397,9	13.743,2	34.494,2	38.379,1	7.713,5	9.406,8
VG	26.097,6	63.652,6	7.287,6	11.401,9	51.888,2	50.436,8	9.616,5	10.751,6	30.829,9	32.012,7	6.521,4	7.857,9
VA	26.402,5	42.620,2	7.391,2	10.234,6	77.843,1	59.065,3	9.697,9	11.739,7	34.124,7	32.510,4	5.459,4	7.073,7
h_a^2	0,85	0,93	0,82	0,85	0,93	0,89	0,84	0,78	0,89	0,83	0,85	0,84
h_r^2	0,86	0,62	0,83	0,76	1,39	1,04	0,85	0,85	0,99	0,85	0,71	0,75

TABELA 2.5. Média (m), aditividade (a), dominância (d) e valor de χ^2 para os caracteres matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) estimadas em três cruzamentos de milho, nos anos de 2000 e 2001. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. UFRGS, 2003.

Parâmetro	MSP						MSR					
	R2 x S5		R2 x S6		S5 x S6		R2 x S5		R2 x S6		S5 x S6	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
[m]	653,39	468,73	777,11	500,19	579,03	284,17	252,82	180,90	327,51	209,86	251,64	131,29
[a]	271,72	236,79	107,35	68,34	-134,28	-56,87	91,07	109,65	44,37	66,01	-20,95	-38,51
[d]	408,59	317,75	307,02	987,67	230,28	357,47	161,34	196,06	100,90	250,90	116,45	173,1
χ^2	5,13	8,29 *	6,68	19,83 *	1,42	0,38	24,51 *	0,61	8,70 *	1,60	2,12	0,43

* Valores significativos para o teste qui-quadrado, ao nível de 5% de probabilidade.

A menor magnitude para os efeitos aditivos, em todas as populações, deve ser interpretada como um sinal de dispersão de genes relacionados à manifestação da MSP e MSR nos genitores, fazendo com que as estimativas do efeito de aditividade ficassem menores (Tabela 2.5). Esta hipótese de dispersão de genes entre os pais pode ser apoiada pela elevada variância aditiva observada nos cruzamentos, a qual não é afetada pela presença de genes que aumentam ou diminuem o caráter. O sinal associado às estimativas de aditividade e dominância indica o genitor que concentra o maior número de genes para o incremento do caráter, sendo convencionado o sinal positivo para o P_1 e o negativo para o P_2 (Falconer, 1989). Assim, o sinal positivo de aditividade nos cruzamentos R2 x S5 e R2 x S6 indica que a linhagem tolerante R2 apresenta o maior número de genes para tolerância ao encharcamento do solo.

2.4. CONCLUSÕES

- A herdabilidade do caráter tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem nos três cruzamentos de milho estudados é alta, indicando possibilidades de ganhos genético através da seleção.
- Por outro lado, os efeitos de não aditivos são mais importantes na determinação das características matéria seca da raiz e parte aérea, indicando que a seleção para o caráter deve ser feita em gerações mais avançada.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DE QTL PARA TOLERÂNCIA AO ENCHARCAMENTO EM MILHO

3.1. INTRODUÇÃO

A tolerância ao encharcamento está relacionada com a ação coordenada de adaptações morfológicas, anatômicas e bioquímicas (Bucher & Kuhlemeier, 1993). Kennedy et al. (1992) indicaram que o estresse anaeróbico, determinado pelo encharcamento do solo, induz mudanças no padrão protéico em várias espécies, devido à dissociação dos poliribossomos, impossibilitando a tradução do mRNA. Um grupo de 20 polipeptídios anaeróbicos (ANP's), designado por Sachs et al. (1980), foi seletivamente sintetizado em raízes primárias de milho após cinco horas de anoxia. Ao mesmo tempo, a síntese de proteínas aeróbicas foi significativamente reprimida. Esses polipeptídios anaeróbicos têm sido bastante estudados em milho e, de maneira geral, estão envolvidos na glicólise e fermentação (Lazlo & Lawrence, 1983; Kennedy et al., 1992; Andrews et al., 1993). Segundo Crawford (1992), o fenômeno mais associado com o déficit de oxigênio é a indução da síntese e da atividade da enzima ADH, confirmando os dados de Sachs & Freeling (1978), onde esta enzima foi o principal polipeptídio anaeróbico sintetizado.

O estresse anaeróbico pode reduzir significativamente a sobrevivência e o crescimento de plântulas em solos alagados. A maioria dos genótipos de milho sobrevive até três dias de tratamento anaeróbico a 27°C (Subbaiah & Sachs, 2003). Por outro lado, mutantes que são nulos para a atividade de ADH sobrevivem somente poucas horas. Resultados de cruzamentos entre genótipos tolerantes e sensíveis sugerem que o caráter tolerância a anoxia é dominante e apresenta segregação simples (Sachs et al., 1996).

Avanços ao nível molecular têm sido feitos através da análise de vários cDNAs e genes envolvidos na resposta anaeróbica (Sachs, 1994; Sachs et al., 1996). Até recentemente, os únicos genes descritos em plantas que eram induzidos em condição de anoxia ou hipoxia, codificam enzimas do metabolismo da glicose fosfato, principalmente glicólise e fermentação (Sachs, 1993; Sachs, 1994; Sachs et al., 1996). Atualmente, Subbaiah & Sachs (2003) estão desenvolvendo linhagens tolerantes à anoxia para análise de genes envolvidos com este caráter. Recentemente, foram descritos três sistemas de genes que parecem funcionar fora da rota glicolítica (Huq & Hodges, 2000).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites vem sendo usados com muito sucesso em milho (Taramino & Tingey, 1996; Smith et al., 1997; Lubberstedt et al., 1998; Pejic et al., 1998). Diversos trabalhos de mapeamento de caracteres de importância agrônômica em milho foram publicados, como rendimento de grãos (Stuber et al., 1992; Veldboom & Lee, 1994; Ajmone et al., 1995;), estatura de planta (Beavis et al., 1991; Koester et al., 1993), ciclo (Koester et al., 1993; Ribaut et al., 1996), altura de inserção de espiga (Veldboom et al., 1994) e qualidade de amido e proteína (Goldman et al., 1993). Nestes trabalhos têm sido identificadas regiões associadas com a herança de

caracteres quantitativos (QTL) com ação gênica de sobredominância e pleiotropia.

A dificuldade em definir os marcadores que devem ser empregados e o efeito do ambiente na análise de QTL têm retardado o avanço desta técnica em programas de melhoramento de plantas. No caso do milho, muitos marcadores de microssatélites estão disponíveis no *Maize DB* (<http://www.agron.missouri.edu>). A partir destes marcadores foi realizado este trabalho, que teve por objetivo identificar QTL envolvidos na tolerância ao encharcamento do solo em plantas jovens de milho.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

A análise fenotípica e a coleta de folhas para a extração de DNA foram realizadas em um experimento em casa de vegetação na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) no período de dezembro de 2001 a janeiro de 2002. No total, foram avaliadas 117 famílias F₃ provenientes de cruzamentos entre duas linhagens de milho, uma tolerante (R2) e a outra sensível (S5) ao encharcamento do solo. Foram avaliados também os genitores e duas testemunhas, os híbridos triplos comerciais AG 5011 e BRS 3060. Esses dois híbridos foram escolhidos por serem testemunhas na rede de experimentação para os ensaios de milho em várzea.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com duas repetições, sendo semeadas 12 sementes por repetição para cada família F₃. A semeadura foi realizada em copos plásticos de 200ml perfurados na base e preenchidos com solo contendo 20% de areia. Os copos foram colocados em tanques de madeira, revestidos com lona plástica para evitar a saída da água. Um dia antes da semeadura foi colocada uma lâmina de água de 4cm. Nessas condições, foram semeadas três sementes

por copo, com o embrião voltado para cima, a uma profundidade de 2cm, aproximadamente.

Após oito dias da emergência, foi coletada uma folha de todas as plantas de cada linha F₃ e formado um *bulk* para representar a planta F₂ de origem. O DNA para a análise molecular foi extraído desse *bulk*. Logo após a coleta das folhas, foi aplicada adubação de cobertura na proporção de 120kg/ha de uréia. Aos 22 dias da emergência das plantas foi realizada a inundação, a qual foi mantida por quatro dias, com lâmina de 1cm de água acima do nível dos copos. Depois deste período de inundação, foi drenado o excesso de água das caixas e as plantas foram mantidas com uma lâmina de 1cm de água por sete dias, sendo, após, colhido o experimento. A parte aérea e a raiz de cada planta foram colhidas separadamente, sendo em seguida colocadas em estufa a 60°C por cinco dias para a avaliação do peso seco. Os caracteres avaliados no experimento foram matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSP). Os dados de MSP e MSR foram submetidos à análise de variância, utilizando o modelo de efeitos aleatórios, o qual permitiu a estimativa de variâncias e da herdabilidade (Paterniani & Miranda Filho, 1980). A variância entre progênes F₃ é dada por: $\sigma_A^2 + (1/4)\sigma_D^2 + \varepsilon$, onde ε é o erro experimental (Hallauer & Miranda, 1988).

A análise com microssatélites foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia/UFRGS. A escolha dos *primers* foi realizada a partir da base de dados de milho (*Maize DB*), sendo testados 44 pares. A seleção dos *primers* obedeceu ao critério de amostrar todos os cromossomos, com preferência aos que estivessem ligados a genes pertencentes a rotas metabólicas envolvidas com a glicólise e a fermentação (Tabela 3.1).

A análise genotípica foi realizada em 74 linhas F₃ selecionadas entre as mais

contrastantes em relação às variáveis MSP e MSR. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Edwards et al. (1991). As reações de PCR foram preparadas para um volume de 25µl. Cada mistura de reação continha: 60ng de DNA genômico; Tampão 10X (Gibco BRL); 1,5mM de MgCl₂ (Gibco BRL); 0,2mM de dNTP (Gibco BRL); 1U de Taq-DNA Polimerase (Gibco BRL); 0,2µl de cada oligonucleotídeos iniciadores. As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC-100, MJ Research, Inc.). O programa utilizado para a amplificação do DNA genômico foi do tipo *touchdown* que consistiu de 18 ciclos de 94°C por 1 minuto seguido de um decréscimo de 1°C a cada 2 ciclos (64°C a 55°C) e 72°C por 1 minuto e mais 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C também por 1 minuto. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 3% e a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada com brometo de etídio em transiluminador. As imagens dos géis foram capturadas com o programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

Os fragmentos amplificados nas progênes F₃ foram identificados conforme a similaridade com os genitores, sendo consideradas homozigotos iguais ao genitor R2, homozigotos iguais ao genitor S5 ou heterozigotos. A identificação de QTL foi através da análise por ponto, a qual consiste no estabelecimento de uma relação estatística entre cada marcador e o fenótipo dos indivíduos. Os dados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$, onde Y_i = valor fenotípico da iésima linha F₃ para os caracteres MSP ou MSR, X_i = valor genotípico da iésima linha F₃, β_0 , β_1 = parâmetros da análise e ε_i = erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. Sempre que a estimativa do parâmetro β_1 foi significativa pelo teste de F a 5% de probabilidade o marcador em questão foi considerado como associado à herança do caráter.

TABELA 3.1. *Primers* de microssatélites utilizados na análise molecular de linhas de milho visando à identificação de QTL para tolerância ao encharcamento do solo. UFRGS, 2003.

<i>Primer</i>	Gene ligado ao marcador	Cromossomo	Bin*
phi037	<i>umc 128</i>	1	1,08
umc1726	<i>adh1</i> – álcool desidrogenase1	1	1,10
umc1064	<i>fdx3</i> – ferredoxina 3	1	1,11
umc1622	<i>crr1</i> – regulador resposta a Citocinina	2	2,0-2,01
umc1185	<i>ole1</i> – oleosina1	2	2,03
phi029	<i>tpi4</i> – triosefosfato isomerase 4	3	3,04
phi046	<i>npi 257^a</i>	3	3,08
umc1010	<i>plt2</i> – proteína fosfolípido transferase – homóloga2	3	3,09
nc004	<i>adh2</i> – álcool desidrogenase2	4	4,03
phi021	<i>adh2</i> – álcool desidrogenase2	4	4,03
umc1550	<i>pdi1</i> – proteína dissulfeto isomerase1	4	4,03
phi074	<i>zp22.1</i> – zeína 22.1	4	4,04
nc005	<i>gpc1</i> – gliceraldeído3 fosfato desidrogenase1	4	4,05
phi026	<i>gpc1</i> – gliceraldeído3 fosfato desidrogenase1	4	4,05
phi079	<i>gpc1</i> – gliceraldeído3 fosfato desidrogenase1	4	4,05
umc1466	<i>pdh1</i> – piruvato desidrogenase1	4	4,08
umc1173	<i>rpd3</i> – histona diacetilase homóloga	4	4,09
phi006	<i>cat3</i> – catalase3	4	4,11
umc1197	<i>cat3</i> – catalase3	4	4,11
umc1610	<i>cpn10</i> – chaperonina10	4	4,11
umc1056	<i>px13</i> – peroxidase13	5	5,03
phi008	<i>rab15</i> – resposta ao ácido abscísico	5	5,03
umc1564	<i>rps15</i> – proteína ribossomal15	5	5,03
phi085	<i>gln4</i> – glutamina sintetase4	5	5,06
umc1023	<i>fdx2</i> – ferredoxina2	6	6,00
umc1018	<i>gpc2</i> – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase2	6	6,01
nc012	<i>pdk1</i> – piruvato ortoquinase diquinase1	6	6,05
phi081	<i>pdk1</i> – piruvato ortoquinase diquinase1	6	6,05
umc1341	<i>roa2</i> – origem de replicação ativador2	6	6,06
umc 1546	<i>hsp3</i> – proteína tolerância choque de calor3	7	7,00
umc1627	<i>oec23</i> – complexo 23 envolvimento o2	8	8,03
umc1741	<i>rps28</i> – proteína ribossomal	8	8,03
umc1172	<i>pdcl</i> – piruvato	8	8,04
phi060	<i>rip1</i> – inativador da proteína1 do ribossomo	8	8,04
umc1202	<i>rip1</i> – inativador da proteína1 do ribossomo	8	8,04
phi015	<i>gst1</i> – glutationa s-transferase1	8	8,08
phi065	<i>pep1</i> – fosfoenolpiruvato	9	9,03
phi016	<i>sus1</i> – sacarose sintetase1	9	9,04
phi032	<i>sus1</i> – sacarose sintetase1	9	9,04
umc1094	<i>sod9</i> – superóxido dismutase9	9	9,05
umc1733	<i>hbl</i> – haemoglobina1	9	9,06
umc1576	<i>Gdcpl</i> – glicina descarboxilase1	10	10,02
phi071	<i>hsp90</i> – proteína de choque de calor 90 kda	10	10,04
umc1344	<i>crr2</i> – regulador2 de resposta a citocinina	10	10,07

* Bin: medida de localização do marcador dentro de cada cromossomo no mapa do milho. O bin está designado no lado direito, parte decimal, e o cromossomo à esquerda, parte inteira.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram a existência de variabilidade genética entre as famílias F_3 testadas para os caracteres MSP e MSR (Tabela 3.2). A linhagem R2, classificada como tolerante ao encharcamento, não diferiu significativamente dos híbridos testemunha para a variável MSP, mas diferiu da linhagem S5, sensível ao encharcamento, e da média da população F_3 . Para a variável MSR, a linhagem S5 foi a que produziu menos, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Esses resultados confirmam o comportamento contrastante entre os genitores e apóiam o uso deste cruzamento para o mapeamento genético. Em relação ao comportamento das linhagens e dos híbridos comerciais, Fausey & McDonald (1985) indicaram que linhagens eram mais tolerantes ao encharcamento do que variedades híbridas. Por outro lado, Lemke-Keyes & Sachs (1989) observaram que a resposta de linhagens e híbridos parentais para tolerância ao estresse anaeróbico era similar, quando avaliada na fase de pré-emergência das plântulas. Em trabalho anterior, Silva et al. (2001) demonstraram a ocorrência de acentuada heterose e efeito materno para a tolerância ao encharcamento em híbridos F_1 , discordando das afirmações daqueles autores. Provavelmente, as combinações avaliadas e o genótipo empregado como genitor feminino foram decisivos na manifestação da heterose.

Com base na análise de variância, utilizando o quadrado médio entre famílias, foram estimadas as variâncias fenotípicas e genéticas, bem como o valor de herdabilidade para as características MSP e MSR. A herdabilidade estimada para MSP foi de 0,95 e para MSR foi de 0,93 (Tabela 3.3). Esses valores indicam uma reduzida influência do ambiente na manifestação de ambos os caracteres; no entanto é importante

considerar que a interação genótipo x ambiente não foi avaliada, sendo que os valores estimados podem estar inflacionados por essa interação.

TABELA 3.2. Média e desvio padrão de matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR), para genitores, população F₃ e testemunhas (híbridos comerciais). Embrapa Clima Temperado, 2002. UFRGS, 2003.

Genótipo	MSP (mg)		MSR (mg)	
	Média ¹	Desvio padrão	Média ¹	Desvio padrão
R2	338,12 ab	0,884	251,25 a	1,768
S5	207,27 c	0,598	97,67 b	2,203
F ₃	232,17 c	54,951	160,47 ab	48,740
AG 5011	423,00 a	0,661	224,15 a	0,874
BRS 3060	286,98 bc	18,470	218,52 a	4,018

¹ Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3.3. Estimativas de variância fenotípica (σ^2_P), variância genética (σ^2_G) e herdabilidade (h^2) para matéria seca da parte aérea (MSP) e matéria seca da raiz (MSR) das famílias F₃. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2002. UFRGS, 2003.

Parâmetro	MSP	MSR
σ^2_P	0,408	0,177
σ^2_G	0,389	0,166
h^2	0,95	0,93

O polimorfismo entre os genitores R2 e S5 para os 44 marcadores testados foi de 72,7%. Este nível de polimorfismo era esperado, uma vez que a escolha dos marcadores foi direcionada para marcadores ligados a genes envolvidos na glicólise e fermentação. No entanto, diversos marcadores associados a genes de importância para

essas rotas metabólicas foram monomórficos entre os genitores analisados. Como exemplo é possível citar o marcador *umc1726*, ligado ao gene *adh1*, o qual é muito importante na fermentação alcoólica, o *phi006* e o *umc1197*, ligados aos genes *cat3*, que codificam para a enzima catalase 3, o *phi065*, ligado ao gene *pep1*, que codifica para enzima fosfoenolpiruvato, sendo ambas as enzimas envolvidas na glicólise, e o *phi016* e o *phi032*, ligados ao gene *sus1*, que codifica para a enzima sacarose sintetase 1. Este comportamento monomórfico não significa que estes genes apresentem o mesmo produto final em cada genitor, uma vez que sua regulação pode ser diferente em cada um, resultando em produtos finais distintos. Da mesma forma, o gene, mesmo presente, pode não estar ativo ou estar parcialmente ativado. De qualquer forma, esses marcadores não foram considerados importantes na análise realizada, pois não segregaram no cruzamento estudado.

Neste estudo foram identificados três QTL para MSP e dois para MSR (Tabela 3.4). Para MSP, o QTL de maior efeito foi localizado no cromossomo 5 próximo ao marcador *phi085*, o qual exibiu efeito gênico de dominância. Por outro lado, este marcador não foi significativo para a variável MSR, sugerindo que este loco é específico para parte aérea. O segundo maior QTL para MSP foi localizado próximo ao marcador *phi074*. Este QTL foi também significativo para MSR, sendo que, para as duas variáveis, o acúmulo de matéria seca estava ligado ao genótipo do genitor tolerante. O último QTL identificado também foi significativo para ambos os caracteres, sendo localizado próximo ao marcador *phi029*. Da mesma forma, para o segundo QTL, o principal efeito gênico envolvido foi o de dominância.

O QTL identificado através do marcador *phi029*, localizado no cromossomo 3, explicou 14% da variação para matéria seca da parte aérea (MSP) e 11% da matéria

seca da raiz (MSR). Este marcador está ligado ao gene da triose fosfato isomerase 4, enzima que catalisa a isomerização do gliceraldeído fosfato à di-hidroxiacetona fosfato, para a formação de triose fosfato no ciclo de Calvin. Sua atuação está localizada no cloroplasto e no citosol tendo importância na glicólise (Heldt, 1997). O segundo QTL, encontrado com o marcador phi074, está ligado ao gene *zp22.1* e explicou 15% da variação total para MSP e 11% da variação para MSR. Este QTL, localizado no cromossomo 4, é ligado com um grupo de genes de alfa-zeínas e está a 2,5cM do loco do gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase 1, que é um gene estrutural envolvido na resposta ao estresse anaeróbico em milho (Subbiah & Sachs, 2003). O último QTL identificado, phi085, explicou 16% da variação para MSP e apenas 2% para MSR (Tabela 3.4). Este marcador está ligado ao gene *gln4*, também estrutural, sendo considerado um gene que pode influenciar no rendimento de grãos e, conseqüentemente, no tamanho da semente, que tem grande importância na eficiência da germinação. O *gln4* é expresso constitutivamente durante a germinação da semente e em tecidos vegetativos (Sakakibara et al., 1992). Um QTL localizado na mesma região foi identificado para peso de mil grãos, refletindo no desempenho agrônomico de híbridos de milho (Limani et al., 2002).

Por outro lado, marcadores que foram polimórficos, ligados a genes importantes na glicólise e fermentação alcoólica, não foram significativos na análise de QTL, entre esses podem ser citados: *umc1622-crr1*, *phi021-adh2*, *umc1466-pdh1*, *umc1056-px13*, *umc1546-hsp3*, *umc1627-oec23*, *umc1172-pdc1*, *umc1094-sod9*, *umc1733-hb1*, *phi071-hsp90* e *umc1344-crr2*. Esse comportamento também pode estar associado à regulação destes genes ou a erro de amostragem que reduz a precisão estatística.

TABELA 3.4. Localização cromossômica de três marcadores relacionados a QTL para matéria seca da parte aérea (MSP) e para a matéria seca da raiz (MSR), valor genotípico médio do genitor tolerante, híbrido e do genitor sensível, valor da probabilidade e do coeficiente de determinação. UFRGS, 2003.

Cr/Bin	Marcador	Variável	Genitor tolerante	Híbrido	Genitor sensível	Valor P	R ²
3,04	Phi029	MSP	257	210	213	0,01	0,14
		MSR	180	146	138	0,03	0,11
4,04	Phi074	MSP	263	217	212	0,01	0,15
		MSR	184	147	161	0,04	0,11
5,06	Phi085	MSP	228	238	167	0,01	0,16
		MSR	158	161	140	0,60	0,02

R² = proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL.

Marcadores moleculares de DNA não sofrem a influência do ambiente; portanto, o R² do modelo da regressão múltipla pode ser considerado como a proporção da variação genética explicada em relação ao total da variação fenotípica observada. Por outro lado, Anderson et al. (1993) usaram uma estimativa da proporção da variação genética explicada em relação ao total da variação genética presente, obtida da herdabilidade (R²/h²). Essa estatística é importante, do ponto de vista do melhoramento de plantas, porque indica a confiança do modelo de locos múltiplos para seleção genotípica. Segundo Barbosa Neto et al. (2001), modelos eficientes de locos múltiplos para seleção assistida por marcadores deveriam ter altos valores para a R²/h². Neste trabalho, o R² para a regressão múltipla foi de 31,7% para MSP e 18,6% para MSR. A partir destes valores, foi estimado quanto da variância genética era explicada pelos três QTL identificados, que constou de 33,3% para MSP e 19,9% para MSR. Portanto, como as herdabilidades são altas, a proporção da variação genética explicada pelos QTL foi

relativamente baixa, principalmente, para a MSR. Isto indica que outros QTL de menor valor podem também estar envolvidos na determinação destes caracteres.

3.4. CONCLUSÕES

- Foram identificados três QTL que explicaram conjuntamente 33,3% da variação para MSP e 19,9% para MSR.
- Estes QTL podem ser úteis na seleção assistida por marcadores moleculares para o caráter tolerância ao encharcamento na fase de planta jovem de milho.

CONCLUSÕES FINAIS

Os trabalhos realizados possibilitaram a identificação de variabilidade genética entre os quatro genitores para os caracteres MSP e MSR, ambos relacionados com a tolerância ao encharcamento em milho. A herança desses caracteres revelou complexidade quanto ao número de genes envolvidos. No entanto, as estimativas de herdabilidade foram elevadas, sugerindo ganho genético através de seleção.

A análise de QTL demonstrou a participação de três locos, os quais explicaram conjuntamente 33,3% da variação para MSP e 19,9% para MSR. Esses resultados indicam que outros genes de menor efeito estão segregando nos genitores e estão de acordo com as análises quantitativas também realizadas. A ação gênica predominante foi a de dominância, sendo a heterose detectada relacionada com a atuação de genes complementares e com um acentuado efeito materno.

Os resultados sugerem que a seleção fenotípica em plantas jovens pode ser uma alternativa eficiente para a seleção de genótipos tolerantes ao encharcamento do solo em milho, devido à elevada herdabilidade estimada. No entanto, a seleção assistida por marcadores moleculares necessita de um maior número de QTL identificados, uma vez que a percentagem de explicação

de variação genética, obtida com os locos encontrados é insuficiente para justificar os custos de laboratório.

A exploração de híbridos para produzir novas variedades de milho com tolerância ao encharcamento é justificada pela elevada heterose observada, inclusive em cruzamentos entre genitores com sensibilidade ao caráter. No entanto, o pronunciado efeito materno indica que a escolha do genitor feminino é fundamental para garantir o sucesso dos cruzamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M.L.R. de Estrutura dos cromossomos do milho. In PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.81-108.

AJMONE, M.P.; MONFREDINI, G.; LUDWIG, W. et al. In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation for grain yield. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.90, p.415-424, 1995.

ALI, M. Effect of stages and duration of flooding on grain yield of hybrid maize. **Indian Journal of Agronomy**, New Delhi, v.21, n.4, p.477-478, 1976.

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. 2.ed. New York: J. Wiley, 1999. 254p.

ANDERSON, J.A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to pre-harvesting sprouting in wheat. **Crop Science**, Madison, v.33, p.453-459, 1993.

ANDREWS, D.L.; COBB, B.G.; JOHNSON, J.R.; DREWS, M.C. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.407-414, 1993.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. In: WOODHOUSE, H.W.W. (Ed.) **Advances in Botanical Research**, New York, V.7, p.225-332, 1979.

ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE R.; JACKSON, M.B. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.43, n.4, p.307-358, 1994.

ASCHI-SMITI, S.; CHAIBI, W.; BROUQUISSE, R. et al. Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in *Trifolium subterraneum* 'Park', **Annals of Botany**, London, v.91, p.195-204, 2003.

BARBOSA NETO, J.F.; SIRIPOONWIWAT, W.; O'DONOUGHUE, L.S. et al. Chromosomal regions associated with barley yellow dwarf virus resistance in oat. **Euphytica**, Wageningen, v.114, p.67-76, 2001.

BARUAH, K.K. Physiological disorder in rice (*Oriza sativa* L.) I. Effect of flooding. **Indian Journal of Agricultural Research**, Karnal, v.30, p.101-108, 1996.

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.141-145, 1991.

BISOTTO, V. Algumas considerações sobre a cultura do milho. In: INDICAÇÕES técnicas para a cultura de milho no estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: FEPAGRO, EMBRAPA/TRIGO, EMATER/RS, FECOAGRO/RS, 2001. p.6-16. (Boletim Técnico, 7).

BORU, G.; VAN GINKEL, M.; KRONSTAD, W.E.; BOERSMA, L. Expression and inheritance of tolerance to waterlogging stress in wheat. **Euphytica**, Wageningen, v.117, p.91-98, 2001.

BUCHER, M.; KUHLEMEIER, C. Long term anoxia tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.441-448, 1993.

CAETANO, V.R.; CAETANO V.R.; LUZ, W.C. Observações no sistema radicular de trigo em solo encharcado. In: REUNIÃO ANUAL CONJUNTA DE PESQUISA TRIGO, 9., 1977, Londrina. **Sanidade...** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, v.4, p.171-175, 1977.

CHAUDHARY, T.N.; BHATNAGAR, V.K., PRIHAR S.S. Corn yield and nutrient uptake as affected by water table depth and soil submergence. **Agronomy Journal**, Madison, v.67, p.745-749, 1975.

COLMER, T.D. Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany**, London, v.91, p.301-309, 2003.

CRAWFORD, R.M.M. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. **Advances in Ecological Research**, London, v.23, p.93-185, 1992.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2ª ed. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária, 1997. 390 p

CRUZ, R.P. **Tolerância ao frio em arroz irrigado**: metodologias de avaliação e bases genéticas. 2001. 158 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

DENNIS, E.S.; MILLAR, A.; DOLFERUS, R. et al. Molecular analysis of the response of anaerobic stress. In: KUO, G.C. (Ed.) **Adaptation of food crops to temperature and water stress**. Proceedings of an international symposium. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, 1993. p.59-67. (Publication N.93.410)

DIAS-FILHO, M.B. Tolerance to flooding in *Brachiaria brizantha* accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.439-447, 2002.

DIAS-FILHO, M.B.; CARVALHO, C.J.R. Physiological and morphological responses of *Brachiaria spp.* to flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.10, p.1959-1966, 2000.

EDWARDS, K.; JOHSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v.19, p.1349, 1991.

ELLIS, M. H.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.57-64, 1999.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 3.ed. Harlow: Longman Scientific and Technical, 1989. 463p.

FAUSEY, N.R.; MCDONALD, M.D. Jr. Emergence of inbred and hybrid corn following flooding. **Agronomy Journal**, Madison, v.77, p.51-56, 1985.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development: Theory and technique**. New York: Macmillan, 1987. V.1, 536p.

FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A.C.; SANTOS, M. X. et al. Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.9, p.1189-1194, 1995.

FREELING, M. Isozyme systems to study gene regulation during development: a lecture. In: TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983, p.61-84.

GAMA, E.G.; PARENTONI, S.N. Seleção para tolerância ao encharcamento em milho. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: o milho em perspectiva, 1992, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: Lutador, p.44, 1992.

GOLDMAN, I.L.; ROCHEFORD, T.R.; DUDLEY, J.W. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois Long Term Selection maize strains. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.87, p.217-224, 1993.

GOMES, A. da S.; CUNHA, N.G.; PAULETTO, E.A. et al. Solos de várzeas. Uso e Manejo: problema físico e perspectiva de solução. In: FEDERACITE. **Solos e Irrigação**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS : FEDERACITE, 1992. p.64-79.

GOMES, A. da S.; PORTO, M.P.; PARFITT, J.M.B.; SILVA, C.A.S. da Rotação de culturas em áreas de várzea e indicadores de qualidade de solo. In: ROTAÇÃO de culturas em área de várzea e plantio direto de arroz. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002, 70p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 89).

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to crossing systems. **Australian Journal of Biology Science**, East Melbourne, v.9, n.4, p.463-493, 1956.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2.ed. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468p.

HELDT, H.W. **Plant Biochemistry & Molecular Biology**. New York: Oxford University Press, 1997. 522p.

HUANG, S.; GREENWAY, H; COLMER, T.D. Responses of coleoptiles of intact rice seedlings to anoxia: K⁺ net uptake from the external solution and translocation from the caryopses. **Annals of Botany**, London, v.91, p.271-278, 2003.

HUQ, E.; HODGES, S.C. An anaerobically inducible early (*aie*) gene family from rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.40, p.591-601, 2000.

JOSHI, M.S.; DASTANE, N.G. Studies in excess water tolerance crop plants. II. Effect of different durations of flooding at different stages of growth under different layouts on growth. **Indian Journal of Agronomy**, New Delhi, v.11, p.70-79, 1966.

KANWAR, R.S.; BAKER, J.L.; MUKHTAR, S. Excessive soil water effects at various stages of development on the growth and yield of corn. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v.31, n.1, p.133-141, 1988.

KATZIR, N.; DANIN-POLEG, Y.; TADMOR, Y. et al. Isolation of a new polymorphic TC maize microsatellite located on the long arm of chromosome 10. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n.3, p.291-292, 1996.

KAWASE, M. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **Hortscience**, Alexandria, v.16, n.1, p.30-34, 1981.

KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.1-6, 1992.

KETATA, H.; EDWARDS, L.H.; SMITH, E.L. Inheritance of eight agronomic characters in a winter wheat cross. **Crop Science**, Madison, v.16, n.1-2, p.19-22, 1976.

KLAMT, E.; KAMPF, N.; SCHNEIDER, P. **Solos de várzea no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1985. 42p. (Boletim Técnico de Solos, 4).

KOESTER, R.; SISCO, P.; STUBER, C. Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in two near isogenic lines of maize. **Crop Science**, Madison, v.33, p.1209-1216, 1993.

LAZLO, A.; LAWRENCE, P.S. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. **Molecular and General Genetics**, New York, v.192, p.110-117, 1983.

LEMKE-KEYES, C.A.; SACHS, M.M. Genetic variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germoplasm. **Maydica**, Bergamo, v.34, p.329-337, 1989.

LIMANI, A.M.; ROUILLON, C.; GLEVAREC, G. et al. Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, p.1860-1870, 2002.

LIZASO, J.I.; M ELENDEZ, L.M.; RAMIREZ, R. Early flooding of two cultivars of tropical maize. I. shoot and root growth. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, n.7, p.979-995, 2001.

LOPES, M.A.; PARENTONI, S.N.; MAGNAVACA, R. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas em plantas de maiz sometidas a deficiência de oxigeno en el suelo. In: SEMINÁRIO MEJORAMIENTO PARA TOLERÂNCIA A FACTORES AMBIENTALES ADVERSOS EN EL CULTIVO DEL MAIZ, 2., 1987, Quito. **Anales...** Quito: IICA/BID/PROCIANDINO, 1988. p.106-124.

LUBBERSTEDT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A.E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding**, Berlin, v.117, n.5, p.447-450, 1998.

MATHER, K.; JINKS, J.L. **Biometrical genetics**. 3.ed. London: Chapman and Hall, 1982. 396p.

MCNEAL, F.H.; QUALSET, C.O.; BALDRIGDE, D.E.; STEWART, V.R. Selection for yield and yield components in wheat. **Crop Science**, Madison, v.18, p.795-799, 1978.

MUKHTAR, S.; BAKER, J.L.; KANWAR, R.S. Corn growth as effected by excessive soil water. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v.33, n.2, p.437-442. 1990.

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J.B. Melhoramento de populações. In PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.217-274.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M. et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n.8, p.1248-1255, 1998.

PFISTER-SIEBER, M.; BRÄNBLE, R. Aspects of plant behavior under anoxia and post anoxia. **Proceedings of the Royal Society of Edinburg**, Edinburg, v.102B, p.313-324, 1994.

PHELPS, T.L.; HALL, A.E.; BUCKNER, B. Microsatellite repeat variation within the y1 gene of maize and teosinte. **Journal of Heredity**, Washington, v.87, n.5, p.396-399, 1996.

PORTO, M.P.; CAETANO, V.R.; PINTO, A.S. Identificação de genótipos de milho tolerantes as condições de excesso de umidade dos solos hidromórficos. In: REUNIÃO DO PROGRAMA NACIONAL DE PESQUISA EM TERRAS BAIXAS DE CLIMA TEMPERADO, 3., 1990, Pelotas. **Anais...** Pelotas: EMBRAPA-CPATB, 1990. p.67.

PORTO, M.P.; FRANCO, D.F.; PINTO, A.S. Método de seleção de plantas de milho (*Zea mays* L.) para tolerância ao excesso de água no solo. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 19., 1992, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: IPAGRO/EMATER. p.51.

RIBAUT, J.; HOISINGTON, D.; DEUTSCH, J. et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.905-914, 1996.

RITTER, W.F.; BEER, C.E. Yield reduction by controlled flooding of corn. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v.12, n.1, p.46-50, 1969.

ROBERTS J.K.M.; ANDRADE, F.H.; ANDERSON, I.C. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.77, p.492-494, 1985.

ROBERTS J.K.M.; HOOKS, M.A.; MIAULLIS, A.P. et al. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize roots tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, p.480-487, 1992.

ROBERTS, J.K.M.; CALLIS, J.; JARDETSKY D. et al. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, New York, v.81, p.6029-6033, 1984.

RUSSEL, D. A.; SACHS, M. M. Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, p.615-620, 1992.

SACHS, M. M. Molecular genetics basis of metabolic adaptation to anoxia in maize and its possible utility for improving tolerance of crops to soil water logging. In: JACKSON, M.M.B.; BLACK, C.R. (Eds.) **Interacting stress on plants in a changing environment**. Berlin: Springer Verlag, 1993. p.375-393. (NATO ASI, 16)

SACHS, M.M. Gene expression in maize during anoxia. In: BASRA, A.S. (Ed.) **Stress induced gene expression in plants**. Switzerland: Harwood, 1994. p.87-102.

SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v.161, p.111-115, 1978.

SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, Cambridge, v.20, p.761-767, 1980.

SACHS, M.M.; SUBBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.47, n.294, p.1-15, 1996.

SAKAKIBARA, H.; KAWABATA, S.; TAKAHASHI, H. et al., Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthetase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.33, p.49-58, 1992.

SARKAR, R.K.; DE, R.N.; REDDY, J.N.; RAMAKRISHNAYYA, G. Studies on the submergence tolerance mechanism in relation to carbohydrate, chlorophyll and specific leaf weight in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, Jene, v.149, p.623-625, 1996.

SAS INSTITUTE INC. **SAS User's Guide**: Statistics. Version 6. 4.ed. Cary: NC: Sas Institute, 1989. v.2, 846p.

SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v.25, p.225-258, 1974.

SCHEEREN, P.L. Resposta do trigo (*Triticum aestivum* L.) aos estresses causados por baixa luminosidade e/ou excesso de água no solo: suas implicações com o melhoramento genético. 1990.191p. **Tese Doutorado**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

SCHILD, L.N.; PARFITT, J.M.B.; PORTO, M.P.; SILVA, C.A.S. Comportamento do milho, em planossolo, sob condições de excesso hídrico. I - Desempenho agrônomico **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.2, n.1, p.97-109, 1999.

SCHWARTZ, D. An exemple of gene fixation resulting from selective advantage in suboptimal conditions. **American Naturalist**, Chicago, v.103, n.933, p.479-481, 1969.

SETTER, T.L.; ELLIS, M.; LOURENCE, E.V. et al. Physiology and genetics of submergence tolerance of rice. **Annals of Botany**, London, v.79, p.67-77, 1997.

SILVA, A.R. da Tolerância ao encharcamento. In: SIMPÓSIO SOBRE ALTERNATIVAS AO SISTEMA TRADICIONAL DE UTILIZAÇÃO DAS VÁRZEAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 1984, Porto Alegre. **Trabalhos apresentados...** Brasília: PRO-VÁRZEAS: PROFIR, 1986. p.166-181.

SILVA, C.F.L. e **Variabilidade genética para o caráter tolerância ao encharcamento em aveia**. Pelotas, UFPel, 1999. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

SILVA, P.R.F. da Crescimento e desenvolvimento. In: INDICAÇÕES técnicas para a cultura de milho no estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: FEPAGRO, EMBRAPA/TRIGO, EMATER/RS, FECOAGRO/RS, 2001. p.17-21 (Boletim Técnico, 7).

SILVA, S.D. dos A.; LIMA, M.R.; PORTO, M.P.; SOUZA, A.R. Uso de marcadores protéicos na identificação de genótipos de milho tolerantes ao encharcamento do solo. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1997, Gramado. **Programas e Resumos...** Gramado: REDBIO Sub-região Brasil; 1997, p.227.

SILVA, S.D.A.; BARBOSA NETO, J.F.; SILVA, C.F.L e et al. Herança do caráter tolerância ao encharcamento do solo em milho. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 46., REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO SORGO, 29, 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: FEPAGRO/EMATER, 2001. MELHORAMENTO E PESQUISA VARIETAL – 21. 1 CD-ROM.

SINGH, R.; GHILDYAL, B.P. Soil submergence effects on nutrient uptake, growth and yield of five corn cultivars. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, n.5, p.737-741, 1980.

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H. et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparisons with data from RFLPS end pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.163-173, 1997.

STUBER, C.W.; LINCOLN, S.E.; WOLFF, D.W. et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, Maryland, v.132, p.823-839, 1992.

SUBBAIAH, C.C.; SACHS, M.M. Molecular and Cellular Adaptations of maize to flooding stress. **Annals of Botany**, London, v.91, p.119-127, 2003.

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

VACARO, E. **Capacidade combinatorial de 12 populações de milho (*Zea mays L.*)** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

VAN OOSTEROM, E.J.; CECCARELLI, S. Indirect selection for grain yield of barley in harsh mediterranean environments. **Crop Science**, Madison, v.33, p.1127-1131, 1993.

VAN TOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; McDONALD, Jr., M.B. Alcohol desidrogenase and pyruvate decarboxylase activities in flood tolerant and susceptible corn seeds during flooding. **Agronomy Journal**, Madison, v.77, p.753-757, 1985.

VAN TOAI, T.T.; BEUERLEIN, J.E.; SCHMITTHENNER, A.F.; ST. MARTIN, S.K.; Genetic variability for flooding tolerance in soybeans. **Crop Science**, Madison, v.34, p.1112-1115, 1994.

VAN TOAI, T.T.; ST. MARTIN, S.K.; CHASE, K. et al. Identification of a QTL associated with tolerance of soybean to soil waterlogging. **Crop Science**, Madison, v.41, p.1247-1252, 2001.

VARTAPETIAN, B.B.; ANDREEVA, I.N.; GENEROZOVA, I.P. et al. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v.91, p.155-172, 2003.

VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Plant Adaptations to Anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v.79, p.3-20, 1997.

VASAL, S. K.; SRINIVASAN, G.;CROSSA, j. Et al. Heterosis and combining ability of CIMMIT's subtropical and temperate early-maturity maize germplasm. **Crop Science**, Madison, v.32, N.6, p.884-890, 1992

VELDBOOM, L.E.; LEE, M. Molecular-marker-facilitated studies of morphological traits in maize. II. Determination of QTLs for gain yield and yield components. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.89, p.451-458, 1994.

VELDBOOM, L.E.; LEE, M.; WOODMAN, W. Molecular marker-facilitated studies in an elite maize population. I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, p.7-16, 1994.

VIEIRA JR., P.A. Milho (*Zea mays* L.): Origem e distribuição geográfica. In: CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A. **Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz e mandioca..** São Paulo: Nobel, 1999. p.41-71.

VISSER, E.J.W.; VOESENEK, L.A.C.J.; VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Flooding and plant growth. **Annals of Botany**, London, v.91, p.107-109, 2003.

VITORINO, P.G.; ALVES, J.D.; MAGALHÃES, P.C. et al. Flooding tolerance and cell wall alterations I maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.8, p.1027-1035, 2001.

WIGNARAJAH, K.; GREENWAY, H. Effect of anaerobiosis on activities of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxilase in roots of *Zea mays*. **New Phytologist**, Cambridge, v.77, p.575-584, 1976.

WINKLER, E.I. Sistema de produção de milho (*Zea mays* L.) em várzeas irrigáveis do Rio Grande do Sul - 1976 a 1982. In: SIMPÓSIO SOBRE ALTERNATIVAS AO

SISTEMA TRADICIONAL DE UTILIZAÇÃO DAS VÁRZEAS DO RIO GRANDE DO SUL, 1984, Porto Alegre. **Trabalhos apresentados...** Brasília: PRO-VÁRZEAS: PROFIR, 1986. p.202-215.

YU, P.T.; STOLZY, L.H.; LETEY, J. Survival of plants under prolonged flooded conditions. **Agronomy Journal**, Madison, v.61, p.844-847, 1969.