

ROBERTO FRITSCHÉ NETO

SELEÇÃO GENÔMICA AMPLA E NOVOS MÉTODOS DE MELHORAMENTO  
DO MILHO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011

ROBERTO FRITSCHÉ NETO

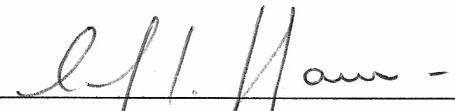
SELEÇÃO GENÔMICA AMPLA E NOVOS MÉTODOS DE MELHORAMENTO  
DO MILHO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

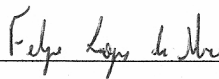
APROVADA: 29 de abril de 2011



Prof. Marcos Deon Vilela Resende  
(Co-orientador)



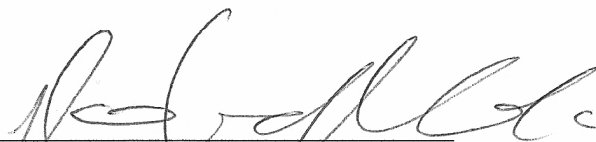
Prof. Carlos Sigueyuki Sedyama  
(Co-orientador)



Felipe Lopes da Silva



Prof. Valterley Soares Rocha



Prof. Glauco Vieira Miranda  
(Orientador)

*“De todos os instrumentos que o homem inventou, o mais assombroso é o livro. Todos os demais são extensões do seu corpo. Só o livro é uma extensão da imaginação e da memória”.*

*- Jorge Luis Borges -*

*Ao meu avô Emílio pelos meus  
primeiros passos na agricultura e à  
minha esposa Liana pela dedicação,  
carinho e compreensão.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Glauco Vieira Miranda, pela orientação e incentivo.

Ao Professores Carlos Sigueyuki Sedyama e Marcos Deon Vilela de Resende pelo exemplo de profissional, amizade e orientação.

Ao Professores Arione da Silva Pereira e Pedro Crescêncio. Souza Carneiro, pelos ensinamentos, exemplo profissional e amizade.

À Edna e à Rita, secretárias do programa de Pós-Graduação, sempre dispostas a ajudar.

A todos os professores que já tive em toda a minha vida acadêmica, por terem contribuído com a minha formação e crescimento.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial ao Luciano, pela competência e compromisso com o trabalho.

À minha mãe Cleiri e meus sogros Beto e Ângela, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos amigos Felipe Bermudez, Flávia e Julio DoVale, Lucimar Oliveira, Luciano Resende, Paulo Coutinho, Rodrigo DeLima, Daniele, Gustavo Fialho e Eder Lanes, pela agradável convivência, ensinamentos e momentos de descontração.

A todos aqui não mencionados que, de certa forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

ROBERTO FRITSCHÉ NETO, filho de Cleiri da Silva Padilha e Roberto Fritsche Filho, nasceu em 29 de dezembro de 1983, em Erechim, Rio Grande do Sul.

No ano de 2006 graduou-se em Agronomia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS e *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento de Plantas, no ano de 2008, pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP.

No ano de 2009 iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, com a orientação do Professor Glauco Vieira Miranda, defendendo a tese em abril de 2011.

Atualmente é Professor Substituto do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, na área de melhoramento de plantas alógamas.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	Vii
ABSTRACT.....	Ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	05
2.1 Material genético e condução experimental.....	05
2.2 Análise de deviance e componentes de variância.....	07
2.3 Genotipagem da população de estimação.....	09
2.4 Seleção Genômica Ampla (GWS).....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1 Análises de deviance e estimativas dos parâmetros genéticos.....	14
3.2 Acurácia seletiva da GWS.....	17
3.3 Ganhos com a seleção.....	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

## RESUMO

FRITSCHÉ NETO, Roberto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011.  
**Seleção genômica ampla e novos métodos de melhoramento do milho.**  
Orientador: Glauco Vieira Miranda. Co-orientadores: Carlos Siqueyuki Sedyama e Marcos Deon Vilela de Resende.

A avaliação para eficiência no uso (EU) de nutrientes utiliza geralmente métodos destrutivos da planta, não permitindo, dependendo da estrutura genética da população, usar as identificadas como superiores em hibridações. Conseqüentemente, há redução no potencial dos ganhos com a seleção. Além disso, alguns métodos convencionais de melhoramento, como os da seleção recorrente, são muito trabalhosos e apresentam baixos ganhos com a seleção por unidade de tempo. A seleção genômica ampla (GWS) foi proposta visando aumentar a eficiência do melhoramento genético. Com a GWS, a predição e a seleção podem ser realizadas em fases juvenis das plantas, acelerando assim o processo. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i) verificar a eficácia do método da GWS no melhoramento de milho para condições de estresse nutricional; ii) propor novos métodos de melhoramento do milho baseados em GWS. Para isto, foram avaliadas 41 combinações híbridas em dois experimentos, em baixa e alta disponibilidade de N e P, delineados em blocos ao acaso com duas repetições, em esquema fatorial simples (híbridos x níveis de N ou P). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação (20°45'14"S; 42°52'53"W), na Universidade Federal de Viçosa, durante o mês de outubro de 2010. As plantas foram colhidas no estádio V6. A partir do material coletado, foram estimados os dois componentes da EU de N ou P. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas via REML/BLUP, para a obtenção dos componentes de variância e as estimativas dos parâmetros genéticos. Na genotipagem da população de estimação, foram utilizados 80 marcadores microssatélites (SSR). A predição dos valores genéticos genômicos dos híbridos foi obtida via RR-BLUP/GWS. Para os caracteres que a GWS apresentou valores de acurácia seletiva superior a fenotípica, ela foi comparada com os métodos da Seleção Recorrente Intra e Interpopulacional. Com um ciclo de GWS por ano, foi possível obter aumento na eficiência de seleção em relação aos métodos de seleção recorrente, para os caracteres EA e EUt em baixo P (BP) e massa de parte aérea seca (MPS) em alto P (AP) de 1028,01%, 960,21% e 1240,86%, respectivamente. Quando foi considerada a possibilidade de dois ciclos de GWS por ano, estes valores passaram para 3317,05%, 3098,27% e 4003,85%, respectivamente. No experimento do N, com um ciclo de GWS



por ano, para os caracteres EA em baixo N (BN), EA, EUt e MPS em alto N (AN), o aumento na eficiência foi de 306,98%, 393,84%, 816,99% e 363,82%, respectivamente. Na possibilidade de dois ciclos de GWS por ano, estes valores passaram para 990,53%, 1270,80%, 2636,15% e 1173,92%, respectivamente. Com isto, é possível concluir que com a GWS há um aumento significativo na acurácia seletiva, nos ganhos por unidade de tempo e no processo de melhoramento. Conseqüentemente, os métodos Seleção Recorrente Genômica propostos neste trabalho podem modificar significativamente a forma como é feita a seleção nos programas de melhoramento.

## ABSTRACT

FRITSCH NETO, Roberto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2011.  
**Genome wide selection and new methods of maize breeding.** Adviser: Glauco Vieira Miranda. Co-advisers: Carlos Siqueyuki Sedyama and Marcos Deon Vilela de Resende.

The evaluation for nutrient efficiency use (UE) generally use destructive methods of the plant, not allowing, depending on the population genetic structure, using those identified as superior in hybridizations. Consequently, there is a reduction in the potential gains with selection. Additionally, some conventional breeding methods, such as the recurrent selection, are very laborious and have low gains with selection per unit time. The genome wide selection (GWS) was proposed to increase the efficiency of breeding. With the GWS, the prediction and selection can be performed on early plant stages, thus accelerating the process. Given the above, the objectives of this work were: i) verify the effectiveness of the GWS method in maize breeding for nutritional stress conditions, ii) propose new methods to maize breeding based on GWS. For this, 41 single crosses were evaluated in two experiments in high and low availability of N and P, using complete blocks design with two replications, in two-way scheme (single crosses x levels of N and P). The experiments were conducted in a greenhouse (20°45'14 "S; 42°52'53"W), at the Federal University of Viçosa, during the month of October 2010. The plants were harvested at the V6 stage. From the material collected, were estimated the two components of N or P UE. The data were subjected to statistical analysis by REML / BLUP, to obtain the variance components and genetic parameter estimates. In genotyping of estimation population, were used 80 microsatellite markers (SSR). The prediction of genomic breeding values of the single crosses were obtained by RR-BLUP/GWS. For the traits that GWS showed higher selective accuracy values than the phenotypic, it was compared with the methods of intra and interpopulation recurrent selection. With a cycle of GWS per year, it was possible to increase the efficiency of selection in relation to recurrent selection methods for the traits EA and EUt in low (LP) and shoot dry mass (SDM) in high P (HP) of 1028.01%, 960.21% and 1240,86% respectively. When was considered the possibility of two GWS cycles per year, these values changed to 3317.05%, 3098.27% and 4003,85%, respectively. In the experiment of N, with a cycle of GWS per year, for the traits EA in low N (LN), EA, EUt and SDM in high N (HN), the increase in efficiency was 306.98%, 393.84%,

816.99% and 363.82%, respectively. With the possibility of two cycles of GWS per year, these values changed to 990.53%, 1270.80%, 2636.15% and 1173,92%, respectively. Thus, we conclude that with the GWS is a significant increase in selective accuracy, earnings per unit of time and process improvement. Therefore, the recurrent selection genomic methods proposed in this work can modify significantly the way as done the selection in breeding programs.

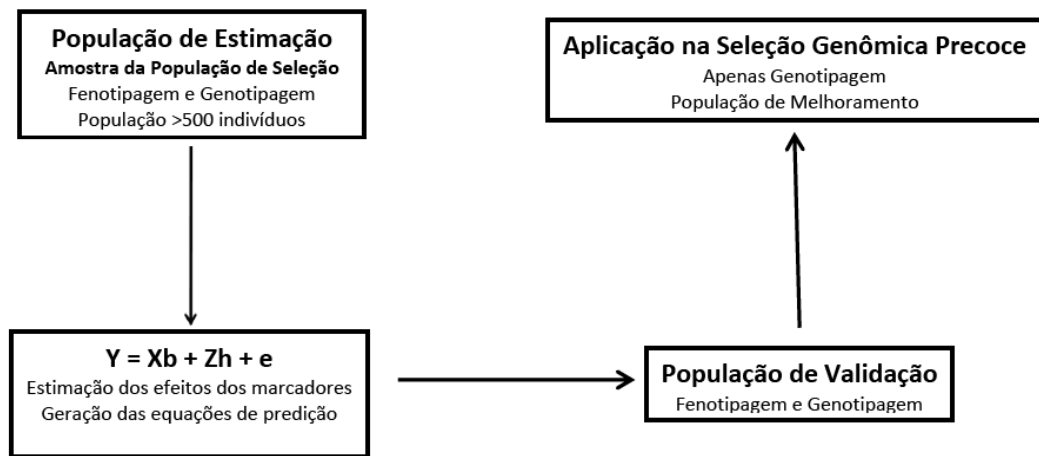
## 1. INTRODUÇÃO

Uma das primeiras propostas para aumentar a eficiência na seleção fenotípica, por meio da Seleção Assistida por Marcadores (SAM), foi descrita por Lande e Thompson (1990). Esta técnica utiliza simultaneamente dados fenotípicos e de marcadores moleculares em ligação gênica a locos controladores de caracteres quantitativos (QTL). A SAM apresenta as seguintes características: i) requer a análise de ligação da associação marcadores-QTL para cada família em avaliação e ii) precisa explicar grande parte da variação genética de um caráter quantitativo. Estas características, somadas à detecção de um pequeno número de QTL de grande efeito e à alta influência ambiental nos caracteres quantitativos, conduziram ao insucesso deste método.

Visando a contornar estas dificuldades, Meuwissen *et al.* (2001) propuseram um novo método de seleção denominado Seleção Genômica Ampla (Genome Wide Selection – GWS). A GWS pode ser aplicada a todas as famílias em avaliação nos programas de melhoramento, apresenta alta acurácia seletiva para a seleção baseada exclusivamente em marcadores moleculares e não exige prévio conhecimento das posições (mapa) dos QTL. Esta técnica em plantas, por meio de dados simulados, tem apresentado excelentes resultados (Bernardo e Yu, 2007; Wong e Bernardo, 2008; Resende *et al.*, 2008; Heffner *et al.*, 2009;). No entanto, são poucos os trabalhos com dados reais em plantas, sejam estas anuais (Albrecht *et al.*, 2011), ou perenes (Resende Jr., 2010; Cavalcanti e Resende, 2011).

A GWS consiste na predição simultânea (sem o uso de testes de significância para marcas individuais) dos efeitos genéticos de grande número de marcadores genéticos de DNA dispersos em todo o genoma de um organismo, de forma a capturar os efeitos de todos os locos, de pequenos e grandes efeitos, e explicar toda a variação genética de um caráter quantitativo.

Após a obtenção destes marcadores, seus efeitos são estimados, baseados em dados fenotípicos de uma população conhecida como população de estimação. Uma vez estimados os efeitos, eles são testados em uma população de validação e, então, selecionados os marcadores que explicam grande parte da variância genética do caráter em estudo para que sua informação seja efetivamente incorporada à etapa de seleção do programa de melhoramento (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de aplicação da seleção genômica ampla em um programa de melhoramento genético (Resende *et al.*, 2010).

Na população de validação, utiliza-se um conjunto de dados menor do que aquele da população de estimação, contemplando os indivíduos genotipados e fenotipados para o caráter de interesse. Esta amostra independente é utilizada para testar e verificar as acurácias das equações de predição de valores genéticos genômicos. Para a obtenção dessa acurácia, os valores genéticos genômicos são preditos (usando os efeitos estimados na população de estimação) e submetidos à análise de correlação com os valores fenotípicos observados (Resende, 2008).

A maior limitação na implementação da seleção genômica é o grande número de marcadores necessários e os altos custos de genotipagem (Goddard e Hayes, 2007). Isto se deve ao fato de os caracteres quantitativos serem controladas por muitos genes, e para que se tenha grande parte da variação genética explicada pelos marcadores moleculares, teoricamente, é preciso obter um marcador em desequilíbrio de ligação com cada loco controlador do caráter quantitativo. Entretanto, uma vez gerado um grande número de marcadores espalhados por todo o genoma de um indivíduo, alguns destes marcadores estarão em desequilíbrio de ligação (LD) com o(s) QTL de interesse (Hastbacka *et al.*, 1994). Assim, alguns alelos destes marcadores estarão correlacionados com efeitos positivos dos QTL em todas as famílias e podem ser utilizados sem que seja necessário o estabelecimento da fase de ligação em cada família (Meuwissen *et al.*, 2001).

As culturas, em quase todas as situações, são cultivadas em ambientes desfavoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento, ou seja, passam por algum tipo de

estresse biótico ou abiótico. Como consequência, são limitadas de expressar seu potencial genético para produtividade (Ramalho *et al.*, 2009).

O fósforo (P) é um nutriente limitante em várias regiões do mundo, principalmente nos solos intemperizados dos trópicos. Quando a disponibilidade deste elemento no solo é limitante, durante o crescimento e desenvolvimento vegetal, ocorre redução no metabolismo, da massa e da superfície de vários órgãos das plantas, afetando assim a produtividade (Sultenfuss e Doyle, 1999). Isto se deve ao P estar envolvido na produção e transporte de energia e nutrientes, fotossíntese, transformação de carboidratos e na composição dos ácidos nucleicos, açúcares fosfatados, fosfolipídios e coenzimas (Taiz e Zeiger, 2006).

Por outro lado, aproximadamente 50% da área mundial cultivada com milho é feita em condições edafoclimáticas tropicais, nas quais, geralmente, o cultivo é conduzido em baixa disponibilidade de nitrogênio (N). Isto se deve à baixa fertilidade natural destes solos, à pouca aplicação de fertilizantes nitrogenados e à ocorrência de seca (Monneveux *et al.*, 2005). O N tem importante ação no metabolismo da planta, principalmente na síntese de proteínas, fundamental na produção e no teor proteico do grão (Taiz e Zeiger, 2006).

Neste sentido, a eficiência no uso de N (EUN) e de P (EUP) pelas plantas é importante, pois permite alcançar produtividades satisfatórias, com menores custos e de modo sustentável (Ahlgren *et al.*, 2008). Existem várias definições e metodologias descritas para calcular a eficiência nutricional de uma cultura. No entanto, Moll *et al.* (1982) definiram a EU como produtividade de grãos ou de parte aérea seca por unidade de nutriente disponível para a planta (nutriente no solo mais o fornecido com a adubação). A EU, por sua vez, é composta pelas eficiências de absorção (EA) e de utilização (EUt). A EA é definida como a habilidade de determinado genótipo absorver o nutriente do solo, enquanto a EUt se refere a capacidade de esse genótipo produzir biomassa ou grãos usando o nutriente que foi absorvido. Dessa forma, maiores EU podem ser alcançadas pelo aumento da EA e EUt (Chen *et al.*, 2009).

Para que este objetivo seja alcançado, o germoplasma a ser melhorado deve ser submetido a condições de estresses abióticos, pois os genes que controlam a produtividade nessas condições são diferentes daqueles para condições ideais de cultivo (Souza *et al.*, 2008; 2009). O uso de métodos de avaliação precoce ou seleção indireta para estas condições são de grande interesse, pois aceleram o processo de seleção,

descartando de imediato os genótipos de maior susceptibilidade, concentrando assim os recursos nos potencialmente superiores (Fritsche-Neto *et al.*, 2010).

A avaliação e a seleção baseadas no fenótipo para eficiência no uso de nitrogênio (EUN) ou de fósforo (EUP) utilizam geralmente métodos destrutivos, o que, dependendo da sua estrutura genética da população de melhoramento, não permite o uso daquelas identificadas como superiores em hibridações. Conseqüentemente, há uma redução no potencial dos ganhos a serem obtidos com a seleção. Além disso, alguns métodos convencionais de melhoramento, como o da seleção recorrente, são muito trabalhosos e apresentam baixos ganhos com a seleção por unidade de tempo, se tornando, muitas vezes, inviáveis economicamente.

Estes fatos podem ser amenizados com a utilização da GWS, que permite identificar precocemente os genótipos superiores, sem utilizar métodos destrutivos, aumentando os ganhos com a seleção e diminuindo o intervalo entre gerações. Por meio deste método, a predição e a seleção podem ser realizadas em fases muito juvenis das plantas, acelerando assim o processo de melhoramento genético. Adicionalmente, a própria predição tende a ser mais acurada por considerar o real parentesco genético dos indivíduos em avaliação, em detrimento do parentesco médio esperado matematicamente (Resende, 2007a). Assim, a GWS propicia uma forma de seleção precoce direta (SPD), pois atua precocemente sobre os genes expressos na idade adulta, ao contrário da seleção precoce tradicional, que é indireta e atua (via avaliação fenotípica), sobre os genes ativados na idade precoce, esperando que eles informem parcialmente sobre sua expressão na idade adulta (Resende *et al.*, 2010). Assim, a SPD propiciada pela GWS é especialmente importante no melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i) verificar a eficácia do método da GWS no melhoramento de milho para condições de estresse nutricional; ii) propor novos métodos de melhoramento do milho baseados em GWS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material genético e condução experimental

Para a condução dos experimentos foram utilizadas duas fontes de germoplasma de milho: a primeira composta de sete linhagens homogêneas para eficiência no uso de fósforo (EUP) e contrastantes para eficiência no uso de nitrogênio (EUN) (Grupo I) e a segunda de sete linhagens homogêneas na EUN e contrastantes para a EUP (Grupo II). Pelo cruzamento entre as linhagens dos dois grupos, foram obtidas 41 combinações híbridas por meio de cruzamentos em esquema fatorial interpopulacional (desbalanceado), no ano agrícola de 2009/2010. Estes cruzamentos foram realizados de forma recíproca, sendo misturadas as sementes da mesma combinação, desconsiderando, portanto, a herança extra cromossômica.

As 41 combinações híbridas obtidas foram avaliadas em dois experimentos. O primeiro considerou baixa e alta disponibilidade de N e o segundo alta e baixa disponibilidade de P. Nestes, foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com duas repetições, em esquema fatorial simples (híbridos x níveis de N ou de P). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, localizada no Campo Experimental Diogo Alves de Mello, pertencente ao Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (20°45'14"S; 42°52'53"W), durante o mês de outubro de 2010.

As sementes foram esterilizadas e posteriormente germinadas em bandejas de isopor. Logo após a emergência, foi transplantada uma plântula de cada híbrido para vasos cilíndricos de PVC com 4 dm<sup>3</sup> (10 cm de diâmetro x 50 cm de altura).

No experimento do N, o substrato foi composto pela mistura de areia lavada com água deionizada e vermiculita, na proporção de 1:1, segundo metodologia descrita por Walk *et al.* (2006). Para o experimento do P, o substrato foi composto pela mistura de 50% de areia lavada com água deionizada, 37,5% de vermiculita e 12,5% de solo (horizonte "B" de Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico). O solo foi usado para adsorver o fósforo e não deixá-lo prontamente disponível para a planta.



O fornecimento da solução nutritiva foi feito a cada dois dias a partir do sétimo dia após a emergência das plântulas. No experimento do N, para os dois níveis, baixo N (BN) e alto N (AN), a solução utilizada foi a descrita por Chun *et al.* (2005), contendo (em mmol L<sup>-1</sup>): 2,0 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,75 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,65 MgSO<sub>4</sub>, 0,1 KCl, 0,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 x 10<sup>-3</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 x 10<sup>-3</sup> MnSO<sub>4</sub>, 1 x 10<sup>-4</sup> CuSO<sub>4</sub>, 1 x 10<sup>-3</sup> ZnSO<sub>4</sub>, 5 x 10<sup>-6</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0,1 Fe-EDTA,. Na solução para BN continha 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ou seja, dez vezes menos do que no AN, sendo o Ca<sup>+2</sup> compensado pelo acréscimo de CaCl<sub>2</sub>.

No segundo experimento, o fósforo foi adicionado na forma de superfosfato triplo, em que, para o nível de baixa disponibilidade de fósforo (BP) misturou-se 34 mg de P por dm<sup>3</sup> de substrato e no nível de alto P (AP) 192 mg dm<sup>-3</sup>. Os demais nutrientes foram fornecidos via solução nutritiva, sem adição de fósforo, contendo: 1,0M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,0M MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,32 mM CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 46,0 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,073 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 9,1 mM MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,76 mM ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 38,0 mM Fe-EDTA.

As plantas foram colhidas no estágio vegetativo de seis folhas completamente expandidas (V6), aproximadamente 25 dias após a semeadura. A parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e seca em estufa de circulação de ar forçado a 60° C por 72 horas.

Para a quantificação do teor de N, retirou-se uma amostra de 0,2 g da massa da parte aérea seca por planta e foram feitas a digestão, a destilação e a titulação pelo método descrito por Bremner e Mulvaney (1982). Para a quantificação do teor de P, retirou-se uma amostra de 0,1 g e foram feitas a digestão nitroperclórica e a leitura do teor de P em espectrofotômetro a 725 nm.

Por meio destes dados foram estimados os dois componentes da EUN e da EAP, de acordo com o proposto por Moll *et al.* (1982):

$$EAN = \frac{N(planta)}{N(aplicado)} (mg.mg^{-1}) \text{ ou } EAP = \frac{P(planta)}{P(aplicado)} (mg.mg^{-1})$$

$$EUtN = \frac{MPS}{N(absorvido)} (g.mg^{-1}) \text{ ou } EUtP = \frac{MPS}{P(absorvido)} (g.mg^{-1})$$

## 2.2 Análise de deviance e componentes de variância

Na análise de modelos mistos, os efeitos do modelo não são testados via testes  $F$ , assim como se faz no método da análise de variância. Nesse caso, para os efeitos aleatórios, o teste recomendado é o teste da razão de verossimilhança (LRT), em que, um quadro similar ao quadro da análise de variância pode ser elaborado. Este quadro pode ser denominado de Análise de Deviance (ANADEV) e é estabelecido segundo os seguintes passos: i) obtenção do ponto de máximo do logaritmo da função de verossimilhança residual (Log L) para modelos com e sem o efeito a ser testado; ii) obtenção da deviance  $D = -2 \text{ Log L}$  para modelos com e sem o efeito a ser testado; iii) fazer a diferença entre as deviances para modelos sem e com o efeito a ser testado, obtendo a razão de verossimilhança (LR); iv) testar, via LRT, a significância dessa diferença usando o teste qui-quadrado com 1 grau de liberdade, pois estas estimativas tendem a ter este tipo de distribuição.

Para a obtenção dos componentes de variância e as estimativas dos parâmetros genéticos para cada nível de disponibilidade de N ou de P, os dados obtidos foram submetidos a análises de deviance, por meio do método da Máxima Verossimilhança Restrita/Melhor Preditor Linear Não Viesado (REML/BLUP), conforme descrito por Resende (2002), considerando o seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xr} + \mathbf{Zm} + \mathbf{Wf} + \mathbf{Tc} + \mathbf{e}$$

em que,  $\mathbf{y}$  é o vetor das médias fenotípicas dos híbridos;  $\mathbf{r}$  é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral;  $\mathbf{m}$  é o vetor dos efeitos de genitores do Grupo II (assumidos como aleatórios), em que,  $m \sim N(0, M)$ , sendo  $M = I\sigma_m^2$ ;  $\mathbf{f}$  é o vetor dos efeitos de genitores do Grupo I (assumidos como aleatórios), em que,  $f \sim N(0, F)$ , sendo  $F = I\sigma_f^2$ ;  $\mathbf{c}$  é o vetor dos efeitos da capacidade específica de combinação dos genitores do Grupo I com os genitores do Grupo II (assumidos como aleatórios), em que,  $c \sim N(0, C)$ , sendo  $C = I\sigma_c^2$ ;  $\mathbf{e}$  é o vetor de erros, sendo que  $e \sim N(0, R)$  e  $R = I\sigma_e^2$ .  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{Z}$ ,  $\mathbf{W}$  e  $\mathbf{T}$  são matrizes de incidência que relacionam, respectivamente, os efeitos de  $\mathbf{r}$ ,  $\mathbf{m}$ ,  $\mathbf{f}$ , e  $\mathbf{c}$  ao vetor  $\mathbf{y}$ .

As equações de modelos mistos para a predição de  $\mathbf{r}$ ,  $\mathbf{m}$ ,  $\mathbf{f}$ , e  $\mathbf{c}$  equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{Z} & \mathbf{X}'\mathbf{W} & \mathbf{X}'\mathbf{T} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{Z} + \lambda_1 & \mathbf{Z}'\mathbf{W} & \mathbf{Z}'\mathbf{T} \\ \mathbf{W}'\mathbf{X} & \mathbf{W}'\mathbf{Z} & \mathbf{W}'\mathbf{W} + \lambda_2 & \mathbf{W}'\mathbf{T} \\ \mathbf{T}'\mathbf{X} & \mathbf{T}'\mathbf{Z} & \mathbf{T}'\mathbf{W} & \mathbf{T}'\mathbf{T} + \lambda_3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{r} \\ \mathbf{m} \\ \mathbf{f} \\ \mathbf{c} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{y} \\ \mathbf{W}'\mathbf{y} \\ \mathbf{T}'\mathbf{y} \end{bmatrix}$$

em que,  $\lambda_1 = \frac{1-h_m^2-h_f^2-h_c^2}{h_m^2}$ ,  $\lambda_2 = \frac{1-h_m^2-h_f^2-h_c^2}{h_f^2}$  e  $\lambda_3 = \frac{1-h_m^2-h_f^2-h_c^2}{h_c^2}$

$h_m^2$  é a herdabilidade no sentido restrito dos genitores do Grupo I;  $h_f^2$  é a herdabilidade no sentido restrito dos genitores do Grupo II e  $h_c^2$  é o coeficiente de determinação dos efeitos da capacidade específica de combinação do Grupo I com o II.

Em seguida, foram realizadas as análises de deviance conjuntas, ou seja, dos dois níveis de N ou de P, considerando o seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{r} + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \mathbf{W}\mathbf{i} + \mathbf{e}$$

em que,  $\mathbf{y}$  é o vetor das médias fenotípicas dos híbridos;  $\mathbf{r}$  é o vetor dos efeitos de repetição dentro dos níveis de N ou de P (assumidos como fixos), somados à média geral;  $\mathbf{g}$  é o vetor dos efeitos genotípicos dos híbridos (assumidos como aleatórios), em que,  $g \sim N(0, G)$ , sendo  $G = I\sigma_g^2$ ;  $\mathbf{i}$  é o vetor da interação híbrido x nível de N ou de P (assumidos como aleatórios), em que,  $i \sim N(0, I_{ga})$ , sendo  $I_{ga} = I\sigma_{ga}^2$ ;  $\mathbf{e}$  é o vetor de erros, sendo que  $e \sim N(0, R)$  e  $R = I\sigma_e^2$ .  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{Z}$  e  $\mathbf{W}$  são matrizes de incidência que relacionam, respectivamente, os efeitos de  $\mathbf{r}$ ,  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{i}$  ao vetor  $\mathbf{y}$ .

As equações de modelo misto para a predição de  $\mathbf{r}$ ,  $\mathbf{g}$  e  $\mathbf{i}$  equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{Z} & \mathbf{X}'\mathbf{W} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{Z} + \lambda_1 & \mathbf{Z}'\mathbf{W} \\ \mathbf{W}'\mathbf{X} & \mathbf{W}'\mathbf{Z} & \mathbf{W}'\mathbf{W} + \lambda_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{r} \\ \mathbf{g} \\ \mathbf{i} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{y} \\ \mathbf{W}'\mathbf{y} \end{bmatrix}$$

em que,  $\lambda_1 = \frac{1-h_g^2-h_i^2}{h_g^2}$  e  $\lambda_2 = \frac{1-h_g^2-h_i^2}{h_i^2}$

$h_g^2$  é a herdabilidade no sentido amplo das combinações híbridas;  $h_i^2$  é o coeficiente de determinação da interação híbrido x nível de N ou de P.

Para a resolução das equações de modelos mistos e a obtenção dos valores genéticos, os componentes de variância genéticos e não genéticos foram assumidos

desconhecidos, sendo estimados pelo método REML, utilizando o pacote estatístico computacional SELEGEN-REML/BLUP (Resende, 2007b).

### **2.3 Genotipagem da população de estimação**

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

As linhagens genitoras foram semeadas em vasos e cultivadas em casa de vegetação para coleta de material vegetal e posterior extração de DNA. As amostras de tecidos foliares jovens (2-3 semanas após a germinação) foram coletadas individualmente de cada linhagem. O DNA genômico foi isolado, utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990).

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como marcadores SSR (Single Sequence Repeats), foram obtidos e escolhidos com base em unidades de repetição e locais no “Bin” para fornecer uma cobertura uniforme de todo o genoma do milho. As seqüências (Forward e Reverse) dos 358 marcadores SSR foram obtidas por meio do Banco de Dados de Genética e Genômica do Milho - MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>). Destes 358 marcadores, 96 foram selecionados com base em seu conteúdo informativo (polimorfismo), amplificação consistente, localização nos cromossomos (pelo menos nove marcadores SSR por cromossomo) e principalmente por apresentarem associação com caracteres de interesse agrônomico. Estes marcadores foram utilizados na genotipagem das 14 linhagens genitoras, e com base na confiabilidade das bandas, um conjunto final de 80 primers SSR polimórficos foi utilizado nas análises deste trabalho.

Para as amplificações em PCR (Polymerase Chain Reaction), foram utilizados microtubos de 1,5 mL para o preparo do “mix” da reação, constituído por 30 ng de DNA genômico, tampão de reação 1x (20 mM de Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl - Invitrogen), 0,1 mM de cada dNTPs (Invitrogen), 0,1 µM de cada primer (Forward e Reverse), 1 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e completado com água Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL.

Os produtos de amplificação de SSR foram separados em gel de poliacrilamida [acrilamida/bis-acrilamida (19:1) 6,0% (Bio-Rad); 7,5M de uréia; TBE 5,0X], utilizando-se o sistema eletroforético “Sequi-Gen GT” (Bio-Rad) em solução tampão TBE 1x (Tris-base 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e 2 mM EDTA, pH 8,0).

Para a coloração do gel, empregou-se o método de coloração com nitrato de prata descrito por Blum *et al.* (1987), modificado por Brito *et al.* (2010). O gel corado foi mantido na posição vertical em local arejado para a secagem e posterior análise dos fragmentos de DNA amplificados. Para a análise dos dados, foi utilizada a seguinte codificação: 1 - presença de uma cópia do alelo, 2 – presença de duas cópias do alelo e 0 - ausência do alelo.

Como foram genotipadas apenas as linhagens genitoras, materiais com elevado grau de endogamia (mais de sete gerações de autofecundação), fez-se a extrapolação dos resultados dos marcadores para as combinações híbridas obtidas. Na computação das análises foram considerados apenas os alelos que apresentaram frequência superior a 5% na população híbrida usada para a seleção genômica ampla.

#### 2.4 Seleção Genômica Ampla (GWS)

Nesta etapa, foram analisados nos híbridos simples apenas os caracteres identificados como significativos dentro de cada nível de N ou de P, por meio da análise de deviance. Para isto, foi empregado o método da regressão aleatória para a realização das análises. Este método utiliza preditores do tipo BLUP, mas os efeitos de marcadores não são ajustados como variáveis classificatórias, mas sim como explicativas ou explanatórias. Assim, estas são variáveis regressoras ajustadas como covariáveis de efeitos aleatórios, ou seja, os fenótipos são regredidos com base nessas covariáveis. O nome mais apropriado é Regressão Aleatória (Random Regression) do tipo BLUP (RR-BLUP) aplicado à seleção genômica ampla (RR-BLUP/GWS), sendo esta um tipo especial da regressão de cumeeira (Ridge Regression) (Resende *et al.*, 2010).

A predição via RR-BLUP/GWS é descrita a seguir com base em Resende (2008). O seguinte modelo linear misto geral é ajustado para estimar os efeitos dos marcadores:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zh} + \mathbf{e}$$

em que,  $\mathbf{y}$  é o vetor de médias fenotípicas de cada híbrido,  $\mathbf{b}$  é o vetor de efeitos fixos,  $\mathbf{h}$  é o vetor dos efeitos aleatórios dos alelos marcadores e  $\mathbf{e}$  refere-se ao vetor de resíduos

aleatórios.  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Z}$  são as matrizes de incidência para  $\mathbf{b}$  e  $\mathbf{h}$ . A matriz de incidência  $\mathbf{Z}$  contém os valores 0, 1 e 2 para o número de alelos. A estrutura de médias e variâncias é definida como:  $h \sim N(0, G)$ ;  $E(y = Xb)$ ;  $e \sim N(0, R = I\sigma_e^2)$ ;  $\text{Var}(y) = \mathbf{V} = \mathbf{ZGZ}' + \mathbf{R}$ ;  $G = I\sigma_A^2 / n$ .

As equações de modelo misto para a predição de  $\mathbf{h}$  por meio do método RR-BLUP/GWS equivalem a:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{Z} + \frac{\sigma_e^2}{\sigma_A^2 / n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{h}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{y} \end{bmatrix}$$

em que,  $\sigma_A^2$  se refere à variância genética aditiva total do caráter,  $\sigma_e^2$  é a variância residual e  $n$  o número total de marcadores ponderados, dado aproximadamente por

$$n = \left[ 2 \sum_i^i p_i(1-p_i) \right], \text{ em que, } p_i \text{ é a frequência do alelo } i; \sigma_e^2 / (\sigma_A^2 / n) = (1-h_{Am}^2) / (h_{Am}^2 / n),$$

em que,  $h_{Am}^2$  é a herdabilidade no sentido restrito ao nível de medias de híbridos em

várias repetições, estimada por  $h_{Am}^2 = \frac{r \cdot h_A^2}{1 + (r-1)h_A^2}$ , sendo  $r$  o número de repetições.

Neste método é considerado que cada loco explica  $\frac{1}{n}\sigma_A^2$ , ou seja, partes iguais da variância genética são atribuídas a todos os locos.

$$\text{O valor genético genômico global do indivíduo } j \text{ é dado por } VGG = \hat{y}_j = \sum_i Z_i \hat{h}_i.$$

O procedimento RR-BLUP/GWS visa a identificar os marcadores com maiores efeitos, objetivando processar análises com subgrupos menores de marcadores e determinar quantos e quais marcadores maximizam a acurácia seletiva. Deste modo, primeiramente foi analisado todo o conjunto de marcadores em todos os indivíduos fenotipados (população de estimação completa). A partir destes resultados, foram gerados nove subgrupos de alelos marcadores, formados por 214 (todos os alelos), 150, 100, 50, 25, 10, 5, 2 e 1. A formação destes subgrupos foi realizada baseada no efeito (em módulo) dos alelos marcadores obtidos na análise inicial, ou seja, considerando todos os 214. A partir destes valores, de modo seqüencial, foram retirados da análise os de menor efeito, até atingir o extremo de apenas um alelo marcador (o de maior efeito) formando o subgrupo.

A validação cruzada foi realizada pela reamostragem de um grupo de indivíduos via procedimento Jackknife (Heltsh e Forrester, 1983). A metodologia generalizada do Jackknife baseia-se na divisão do conjunto de  $C$  dados amostrais em  $g$  grupos de tamanho igual a  $k$ , de forma que  $C = gk$ . Em cada um dos  $g$  grupos,  $k$  indivíduos são retirados para a formação da população de validação. No caso, tomou-se  $k=1$  e, portanto, a população de validação usou todos os  $C$  indivíduos, e a população de estimação,  $C-1$  indivíduos e  $C$  repetições. Assim, a população estudada foi dividida em 41 grupos de um indivíduo de modo que a mesma análise fosse realizada 41 vezes. Em cada repetição, um indivíduo foi removido da população e utilizado para a formação da população de validação, e os outros 40 indivíduos foram utilizados na população de estimação dos efeitos dos marcadores. Como na validação dos resultados o valor fenotípico é conhecido, a Seleção Genômica em cada subgrupo analisado foi avaliada ao calcular a correlação do valor genético predito com o fenótipo observado nos indivíduos. Esta correlação é conhecida como capacidade preditiva ( $r_{\hat{y}y}$ ) da seleção genômica em estimar os fenótipos, sendo dada teoricamente pela acurácia de seleção ( $r_{\hat{g}g}$ ) multiplicada pela raiz quadrada da herdabilidade individual ( $h$ ) ou, em outras palavras,  $r_{\hat{y}y} = r_{\hat{g}g}h$  (Resende, 2008). Assim, foi isolado dessa equação o valor da acurácia ( $r_{\hat{g}g}$ ) ao dividir a correlação pela raiz quadrada da herdabilidade.

Para os caracteres que apresentaram altos valores de  $r_{\hat{g}g}$  e de  $r_{\hat{y}y}$ , a seleção genômica foi comparada com a fenotípica quanto ao ganho de seleção por unidade de tempo. Como padrão da seleção fenotípica foram considerados os métodos da Seleção Recorrente Intrapopulacional (SRI) e Recíproca (SRR), conforme descrito por Souza Jr. (2001). Para isto, no caso da SRI, foi simulada a formação de uma população base, originada do livre cruzamento entre diversas linhagens. Desta população, foram obtidas 200 progênies de meio-irmãos maternos para avaliação e 200 progênies endogâmicas  $S_I$  para recombinação. Estas progênies foram avaliadas em um experimento com duas repetições, sendo a parcela constituída de 25 plantas, totalizando 10.000 plantas avaliadas. Além disso, foi considerada a seleção de 10% das progênies superiores. Para a SRR, foi simulada a formação de duas populações base, originadas do livre cruzamento entre diversas linhagens dentro de cada grupo heterótico. Entre as populações, foram obtidas 200 progênies de meio-irmãos maternos interpopulacionais para avaliação e dentro de cada população 200 progênies endogâmicas  $S_I$  para recombinação. De modo semelhante a SRI, estas progênies foram avaliadas em um

experimento com duas repetições, sendo a parcela constituída de 25 plantas, totalizando 10.000 plantas avaliadas. Além disso, foi considerada a seleção de 10% dos híbridos interpopulacionais superiores.

No caso da GWS intrapopulacional, foi simulado, na mesma população de 10.000 plantas, a seleção dos 200 melhores indivíduos antes do florescimento e a sua recombinação, ou seja, uma seleção a 2% de intensidade, em nível de indivíduo, com coincidência entre as unidades e gerações de avaliação e recombinação. No caso da GWS recíproca a seleção foi considerada na mesma intensidade e tamanho efetivo, entretanto, divididas dentro de cada grupo heterótico. Assim, considerando variâncias genéticas e fenotípicas também igualmente divididas nas duas populações, os ganhos com a seleção obtidos por meio das SRI e SRR seriam teoricamente iguais.

Os ganhos com a seleção em desvios padrão genéticos aditivos foram estimados por  $GS = k \cdot r_{g\hat{g}}$ , em que,  $k=1,76$  para os métodos da SRI e SRR e de  $2,42$  para o da GWS;  $r_{g\hat{g}}$  é a acurácia seletiva (descrita anteriormente para o método GWS), obtida por

$\sqrt{1/4h_{Am}^{2*}}$  para os métodos da SRI e SRR, em que,  $h_{Am}^{2*} = \frac{r \cdot (1/2)h_A^2}{1 + (r-1)(1/4)h_A^2}$ . Este valor

de  $1/2$  ponderando a herdabilidade, se refere aos tipos de progênie considerados para a avaliação e recombinação. A partir destas estimativas foi obtida, para cada caráter, a eficiência relativa dos métodos baseados na GWS em relação à SRI e SRR:

$$EF_{GWS(\%)} = \frac{GS_{GWS} \cdot t_{SRI;SRR}}{GS_{SRI;SRR} \cdot t_{GWS}} \cdot 100$$

em que,  $GS$  é o ganho de seleção estimado em desvios padrão genético aditivos para cada um dos métodos (GWS, SRI e SRR); e  $t$  é o tempo médio (em anos) do ciclo de cada um dos métodos, sendo  $1,5$  para o da SRI e da SRR e de  $1,0$  ou  $0,5$  para o da GWS, considerando a possibilidade de um ou dois ciclos por ano, respectivamente.

As análises foram realizadas empregando o software SELEGEN Genômica RR-BLUP/GWS (Resende, 2007c).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises de deviance e estimativas dos parâmetros genéticos

Nas análises de deviance individuais para cada de nível de N ou de P, pelo menos uma das fontes de variação genética foi significativa em quase todos os caracteres avaliados, sendo em sua maioria para os genitores do Grupo I no experimento do N e do Grupo II no experimento do P (Tabelas 1 e 2). As exceções foram EAP e EUtP em AP e EUTN em BN. As diferenças genéticas significativas observadas indicam existência de variabilidade genética, o que possibilita a seleção e ganhos genéticos dentro de cada nível de N ou de P.

**Tabela 1.** Valores da estatística do teste da razão de verossimilhança (LRT) das análises de deviance individuais, estimativas da herdabilidade no sentido restrito individual ( $h_A^2$ ) e ao nível de médias ( $h_{A_m}^2$ ), coeficiente de variação experimental (CV%) e média geral das massas da parte aérea seca (MPS), eficiências de absorção (EAN) e de utilização (EUtN) em baixo (BN) e alto nitrogênio (AN), em milho, Viçosa-MG, Brasil

Efeitos <sup>1</sup>	MPS		EAN		EUtN	
	BN	AN	BN	AN	BN	AN
Genitores Grupo I	25,46 ***	43,69 ***	26,86 ***	37,95 ***	0,00 <sup>NS</sup>	6,62 **
Genitores Grupo II	0,56 <sup>NS</sup>	5,02 **	0,14 <sup>NS</sup>	5,71 **	0,06 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
CEC <sup>2</sup> I x II	2,15 <sup>NS</sup>	0,71 <sup>NS</sup>	0,43 <sup>NS</sup>	0,96 <sup>NS</sup>	0,18 <sup>NS</sup>	2,45 <sup>NS</sup>
$h_A^2$	0,66	0,75	0,62	0,72	0,01	0,13
$h_{A_m}^2$	0,80	0,86	0,77	0,84	0,02	0,22
CV%	30,74	36,13	29,82	37,71	17,11	7,95
Média	0,29	0,52	0,23	0,06	34,15	24,39

<sup>1</sup> Valores de LRT; Significativo a \*\*\*P = 0,01, \*\*P = 0,05 e <sup>NS</sup> não-significativo pelo teste  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade;

<sup>2</sup> Capacidade específica de combinação entre os genitores do Grupo I e II.

Nos caracteres que foram significativos, tanto no BN como no AN, as herdabilidades no sentido restrito individuais e ao nível de médias foram de magnitude

média a alta para MPS e EAN e muito baixa para EUtN (Tabela 1). Já no experimento do P, tanto no BP como no AP, estas herdabilidades foram de magnitude média a baixa (Tabela 2). Isto indica que nas características relacionadas à EUP, há maior importância dos efeitos não aditivos do que para EUN, considerando que os efeitos ambientais (CV%) foram semelhantes entre os dois experimentos. Resultados semelhantes foram observados por Fritsche-Neto *et al.* (2010) e Souza *et al.* (2008).

**Tabela 2** – Valores da estatística do teste da razão de verossimilhança (LRT) das análises de deviance individuais, estimativas da herdabilidade no sentido restrito individual ( $h_A^2$ ) e ao nível de médias ( $h_{A_m}^2$ ), coeficiente de variação experimental (CV%) e média geral das massas da parte aérea seca (MPS), eficiências de absorção (EAP) e de utilização (EUtP) em baixo (BP) e alto fósforo (AP), em milho, Viçosa-MG, Brasil

Efeitos <sup>1</sup>	MPS		EAP		EUtP	
	BP	AP	BP	AP	BP	AP
Genitores Grupo I	1,53 <sup>NS</sup>	8,48 <sup>***</sup>	0,13 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>	2,94 <sup>*</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
Genitores Grupo II	4,57 <sup>**</sup>	5,33 <sup>**</sup>	4,55 <sup>**</sup>	0,00 <sup>NS</sup>	1,28 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
CEC <sup>2</sup> I x II	8,83 <sup>***</sup>	21,72 <sup>***</sup>	1,09 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>	0,45 <sup>NS</sup>	0,00 <sup>NS</sup>
$h_A^2$	0,11	0,06	0,11	0,06	0,17	0,02
$h_{A_m}^2$	0,19	0,12	0,20	0,11	0,29	0,04
CV%	31,17	23,79	47,37	33,30	16,20	25,76
Média	0,93	2,06	0,01	0,02	506,14	180,16

<sup>1</sup> Valores de LRT; Significativo a \*\*\*P = 0,01, \*\*P = 0,05, \*P = 0,10 e <sup>NS</sup> não-significativo pelo teste  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade;

<sup>2</sup> Capacidade específica de combinação entre os genitores do Grupo I e II.

Os coeficientes de variação apresentaram valores dentro do aceitável para este tipo de estudo como observado por Lima (2010), Fritsche-Neto *et al.* (2010), Souza *et al.* (2009), Souza *et al.* (2008) e Machado *et al.* (2004), o que indica boa precisão experimental e confiabilidade nas estimativas.

Considerando os resultados das análises de deviance conjuntas, observou-se que os efeitos de híbridos e da sua interação com os níveis de N ou de P foram significativos

na maioria dos caracteres avaliados, sendo as exceções EUtN e EUtP (Tabelas 3 e 4). Estes resultados indicam que a seleção deve ser realizada para ambientes específicos e não em função do comportamento médio, pois os genes são expressos diferentemente em função do estresse nutricional (Souza *et al.*, 2008). A identificação destes genótipos possibilitaria suas recomendações ao agricultor ou poderiam ser utilizados como genitores em programas de melhoramento. Isto se deve ao fato de os alelos que controlam o rendimento de grãos em condições de BN ou BP serem pelo menos parcialmente diferentes dos alelos que controlam essa característica em condições de AN e AP.

**Tabela 3** – Valores da estatística do teste razão de verossimilhança (LRT) das análises de deviance conjuntas, estimativas da média geral e do coeficiente de variação experimental (CV%) para massa da parte aérea seca (MPS), eficiência de absorção de nitrogênio (EAN) e eficiência de utilização de nitrogênio (EUtN) em milho, Viçosa-MG, Brasil

Efeitos <sup>1</sup>	MPS	EAN	EUtN
Híbridos	12,97***	0,07 <sup>NS</sup>	3,58*
Híbridos x Níveis de N	66,10***	31,97***	0,05 <sup>NS</sup>
CV%	26,23	38,76	19,49
Média geral	1,53	0,02	344,59

<sup>1</sup> Valores de LRT; Significativo a \*\*\*P = 0,01, \*\*P = 0,05, \*P = 0,10 e <sup>NS</sup> não-significativo pelo teste  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade.

**Tabela 4** – Valores da estatística do teste razão de verossimilhança (LRT) das análises de deviance conjuntas, estimativas da média geral e coeficiente de variação experimental (CV%) para massa da parte aérea seca (MPS), eficiência de absorção de fósforo (EAP) e eficiência de utilização do fósforo (EUtP) em milho, Viçosa-MG, Brasil

Efeitos <sup>1</sup>	MPS	EAP	EUtP
Híbridos	7,95***	4,81**	0,37 <sup>NS</sup>
Híbridos x Níveis de P	76,85***	47,37***	0,72 <sup>NS</sup>
CV%	24,36	26,70	14,86
Média geral	0,60	0,19	29,31

<sup>1</sup> Valores de LRT; Significativo a \*\*\*P = 0,01, \*\*P = 0,05 e <sup>NS</sup> não-significativo pelo teste  $\chi^2$  com 1 grau de liberdade.

Os coeficientes de variação, de modo semelhante ao observado nas análises individuais, apresentaram valores dentro do aceitável para este tipo de estudo, reiterando a boa precisão experimental e confiabilidade nas estimativas (Tabela 3 e 4).

### 3.2 Acurácia seletiva da GWS

Na população híbrida foram identificados 214 alelos com frequência superior a 5% e a média de 2,68 alelos marcadores por locos. O número de alelos por loco SSR variou de dois a cinco.

Houve grande variação entre os caracteres no número de alelos marcadores que maximizaram a capacidade preditiva e a acurácia da GWS, sendo este de cinco para MPS em AN e BN e EAN em AN a 25 alelos (em 20 locos marcadores) para EUtN em AN (Tabela 5). No caso do P esta foi de um para MPS em AP a 50 alelos (40 locos marcadores) para EUtP em BP (Tabela 6). Segundo Resende (2008), a acurácia da GWS depende de cinco fatores: i) da herdabilidade do caráter; ii) do número de locos que controlam o caráter e da distribuição de seus efeitos; iii) do número de indivíduos na população de estimação; iv) do tamanho efetivo populacional; e v) do espaçamento entre marcadores, o qual depende do seu número e do tamanho do genoma. Os dois primeiros fatores não estão sob controle do melhorista, mas os três últimos podem ser modificados pelo melhorista.

Na maioria dos casos, as capacidades preditivas diminuem com o aumento do número de marcadores além de um número ótimo (Cavalcanti e Resende, 2011). Neste trabalho, pode-se observar que, quando foram considerados os 214 alelos, as capacidades preditivas foram muito baixas, ou seja, o aumento do número de marcadores não aumenta linearmente a acurácia da GWS pelo método RR-BLUP, concordando com os resultados de Fernando *et al.* (2007) (Tabelas 5 e 6). Assim, é fundamental, para cada caráter a ser selecionado, estabelecer o número ótimo de marcadores que maximizem a acurácia na população de validação.

**Tabela 5.** Estimativas da capacidade preditiva ( $r_{y\hat{y}}$ ) e da acurácia ( $r_{g\hat{g}}$ ) da seleção genômica, a proporção da variância genética (%Vg) explicada pelos alelos marcadores considerando diferentes quantidades destes (subgrupos) nas análises de validação da Seleção Genômica Ampla e a acurácia fenotípica ( $r_{fen}$ ), para as eficiências de absorção (EAN), eficiências de utilização (EUtN) e das massas de parte aérea seca (MPS) em alto (AN) e baixo (BN) nitrogênio em milho, Viçosa-MG, Brasil

Caráter	Estimativa	Número de alelos marcadores considerados								
		214	150	100	50	25	10	5	2	1
EAN (AN)	$r_{y\hat{y}}$	0,61	0,62	0,62	0,63	0,63	0,66	0,68	0,33	0,22
	$r_{g\hat{g}}$	0,67	0,68	0,68	0,69	0,69	0,72	0,74	0,36	0,24
	$r_{fen}$	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
	%Vg	0,45	0,46	0,46	0,47	0,47	0,52	0,55	0,13	0,06
EAN (BN)	$r_{y\hat{y}}$	0,43	0,44	0,46	0,47	0,47	0,48	0,34	0,25	0,16
	$r_{g\hat{g}}$	0,50	0,51	0,52	0,54	0,54	0,55	0,39	0,28	0,18
	$r_{fen}$	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
	%Vg	0,25	0,26	0,27	0,29	0,29	0,30	0,15	0,08	0,03
EUtN (AN)	$r_{y\hat{y}}$	0,19	0,26	0,30	0,33	0,33	0,32	0,30	0,24	0,25
	$r_{g\hat{g}}$	0,40	0,55	0,63	0,70	0,70	0,69	0,64	0,51	0,53
	$r_{fen}$	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
	%Vg	0,16	0,30	0,40	0,49	0,49	0,48	0,41	0,26	0,28
MPS (AN)	$r_{y\hat{y}}$	0,59	0,59	0,60	0,60	0,61	0,65	0,65	0,28	0,21
	$r_{g\hat{g}}$	0,63	0,64	0,64	0,65	0,65	0,70	0,70	0,30	0,22
	$r_{fen}$	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
	%Vg	0,40	0,41	0,41	0,42	0,43	0,49	0,49	0,09	0,05
MPS (BN)	$r_{y\hat{y}}$	0,20	0,22	0,23	0,25	0,27	0,34	0,35	0,16	-0,07
	$r_{g\hat{g}}$	0,23	0,24	0,25	0,28	0,30	0,38	0,39	0,18	-0,08
	$r_{fen}$	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
	%Vg	0,05	0,06	0,06	0,08	0,09	0,14	0,15	0,03	0,01

**Tabela 6.** Estimativas da capacidade preditiva ( $r_{y\hat{y}}$ ) e da acurácia ( $r_{g\hat{g}}$ ) da seleção genômica, a proporção da variância genética (%Vg) explicada pelos alelos marcadores considerando diferentes quantidades destes (subgrupos) nas análises de validação da Seleção Genômica Ampla e a acurácia fenotípica ( $r_{fen}$ ), para as eficiências de absorção (EAP) e de utilização (EUtP) e massas de parte aérea seca (MPS) em alto (AP) e baixo (BP) fósforo, em milho, Viçosa-MG, Brasil

Caráter	Estimativa	Número de alelos marcadores considerados								
		214	150	100	50	25	10	5	2	1
EAP (BP)	$r_{y\hat{y}}$	-0,04	0,05	0,14	0,21	0,22	0,31	0,34	0,36	0,21
	$r_{g\hat{g}}$	-0,08	0,12	0,32	0,46	0,50	0,70	0,75	0,82	0,48
	$r_{fen}$	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
	%Vg	0,01	0,01	0,10	0,21	0,25	0,49	0,57	0,66	0,23
EUtP (BP)	$r_{y\hat{y}}$	0,43	0,47	0,47	0,50	0,42	0,44	0,09	0,20	-0,08
	$r_{g\hat{g}}$	0,79	0,87	0,88	0,93	0,78	0,82	0,16	0,38	-0,15
	$r_{fen}$	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
	%Vg	0,63	0,75	0,77	0,87	0,60	0,67	0,03	0,14	0,02
MPS (AP)	$r_{y\hat{y}}$	-0,08	0,03	0,14	0,22	0,26	0,26	0,26	0,30	0,32
	$r_{g\hat{g}}$	-0,24	0,07	0,41	0,63	0,75	0,75	0,76	0,88	0,94
	$r_{fen}$	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
	%Vg	0,06	0,01	0,17	0,40	0,56	0,57	0,58	0,77	0,88
MPS (BP)	$r_{y\hat{y}}$	-0,23	-0,15	-0,06	0,05	0,11	0,13	0,07	0,06	0,04
	$r_{g\hat{g}}$	-0,54	-0,33	-0,13	0,11	0,26	0,29	0,16	0,14	0,09
	$r_{fen}$	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
	%Vg	0,29	0,11	0,02	0,01	0,07	0,09	0,03	0,02	0,01

Para os caracteres EAN, EUtN e MPS em AN e para EAN em BN, nos pontos máximos de acurácia para cada caráter, os marcadores explicaram 55%, 49%, 49% e 30% da variação genética total, respectivamente e propiciaram uma alta acurácia

seletiva (74%, 70%, 70% e 55%, respectivamente) (Tabela 5). No experimento do P, para os caracteres MPS em AP, EAP e EUtP em BP nos pontos máximos de acurácia para cada caráter, os marcadores explicaram 88%, 66% e 87% da variação genética total, respectivamente e propiciaram uma alta acurácia seletiva (94%, 82% e 93%, respectivamente) (Tabela 6).

Não foram obtidos resultados consistentes para o caráter MPS em BN e em BP, considerando este conjunto de alelos marcadores. Isto pode ser devido principalmente ao número reduzido de marcadores utilizados, quando consideramos o tamanho do genoma do milho, de modo que não foram detectados alelos em desequilíbrio de ligação com os supostos QTL que controlam estes caracteres. Segundo Cavalcanti e Resende (2011), o aumento ou diminuição da acurácia da GWS via RR-BLUP é um compromisso ou balanço entre acréscimo da quantidade de informação útil (N) via uso de maior número n de locos marcadores e diminuição do tamanho efetivo da amostra para estimar o efeito de cada loco, ou seja, menor número de indivíduos por loco a ser estimado (menor N/n).

A diminuição no número de alelos marcadores usados na GWS a partir do ponto de máxima acurácia faz com que ocorra uma redução na capacidade preditiva, acurácia e proporção da variância genética explicada (Cavalcanti e Resende, 2011). Exemplo disto é que quando foi considerado apenas o alelo de maior efeito, foi explicado apenas 3%, 6%, 28% e 5% da variação genética para EAN em BN, EAN, EUtN e MPS em AN, respectivamente (Tabela 5). Já no P apenas 23% e 2% da variação genética para EA e EUt em BP, respectivamente (Tabela 6). Assim, é possível observar que a Seleção Assistida por Marcadores (SAM) baseada em um ou poucos marcadores de efeitos significativos propicia eficiência inferior à GWS. A exceção foi para o caráter MPS em AP, em que, considerando apenas o alelo marcador de maior efeito, foi possível explicar 88% da variação genética. Neste sentido, a GWS apresenta outra grande vantagem em relação aos métodos SAM. Isto se deve a GWS estimar o efeito de todos os marcadores de modo simultâneo, e não individualmente ou aos pares, o que reduz significativamente os problemas com o viés nas estimativas dos seus efeitos. Com isto, como neste caso, é possível encontrar alelos que estão em forte desequilíbrio de ligação com o caráter de interesse e não eram considerados ou identificados por meio das técnicas tradicionais de mapeamento de QTL.

O número reduzido de marcadores explicando grande parte da variação genética ou maximizando a acurácia é muito interessante do ponto de vista prático. Nesses casos, um pequeno grupo de marcadores, previamente selecionados, poderia ser usado nas populações de seleção. Deste modo, seria possível reduzir o intervalo entre ciclos de seleção, ou ainda, usar métodos não destrutivos de avaliação, possibilitando aumentar os ganhos genéticos (Resende *et al.*, 2008).

Teoricamente com populações maiores e com um número maior de marcadores, aumenta a probabilidade de se encontrar alelos marcadores em forte desequilíbrio de ligação com características de interesse agrônômico (Flint-Garcia *et al.*, 2003). Entretanto, neste trabalho, mesmo com tamanho efetivo e número de marcadores relativamente pequeno, foi possível obter bons resultados. Isto ficou evidenciado pelo fato de que, em todas as características avaliadas, nos pontos de máxima acurácia da GWS esta foi superior a acurácia fenotípica (Tabelas 5 e 6). Este acréscimo na acurácia é devido ao uso da matriz de parentesco real, ou seja, baseada nos alelos marcadores que os indivíduos apresentam e não como a tradicional, baseada em esperança matemática (Resende, 2007a).

### **3.3 Ganhos com a seleção**

Considerando os resultados dos ganhos preditos obtidos com um ciclo de GWS por ano, é possível obter aumento na eficiência de seleção em relação aos métodos de seleção recorrente, para os caracteres EA e EUt em baixo P (BP) e para MPS em alto P (AP) de 1028,01%, 960,21% e 1240,86%, respectivamente (Tabela 7). Quando foi considerada a possibilidade de dois ciclos de GWS por ano, estes valores passaram para 3317,05%, 3098,27% e 4003,85%, respectivamente. No experimento do N, com um ciclo de GWS por ano, para os caracteres EA em baixo N (BN), EA, EUt e a massa de parte aérea seca (MPS) em alto N (AN), o aumento na eficiência foi de 306,98%, 393,84%, 816,99% e 363,82%, respectivamente (Tabela 8). Na possibilidade de dois ciclos de GWS por ano, estes valores passaram para 990,53%, 1270,80%, 2636,15% e 1173,92%, respectivamente.

Para alcançar aumentos na EUN e EUP, é necessário o aumento de seus componentes (Parentoni e Souza Jr, 2009; Hirel *et al.*, 2007). Segundo Corrales *et al.* (2007), quando a disponibilidade de um determinado nutriente é limitante, a EA é mais



importante que a EUt. Assim, a EA tanto em alta disponibilidade de nutrientes como em baixa disponibilidade, são de grande interesse no ponto de vista de melhoramento para condições de estresses abióticos, pois possibilita a seleção indireta de plantas mais EUN e EUP, além de apresentar excelentes ganhos com a seleção por meio da GWS.

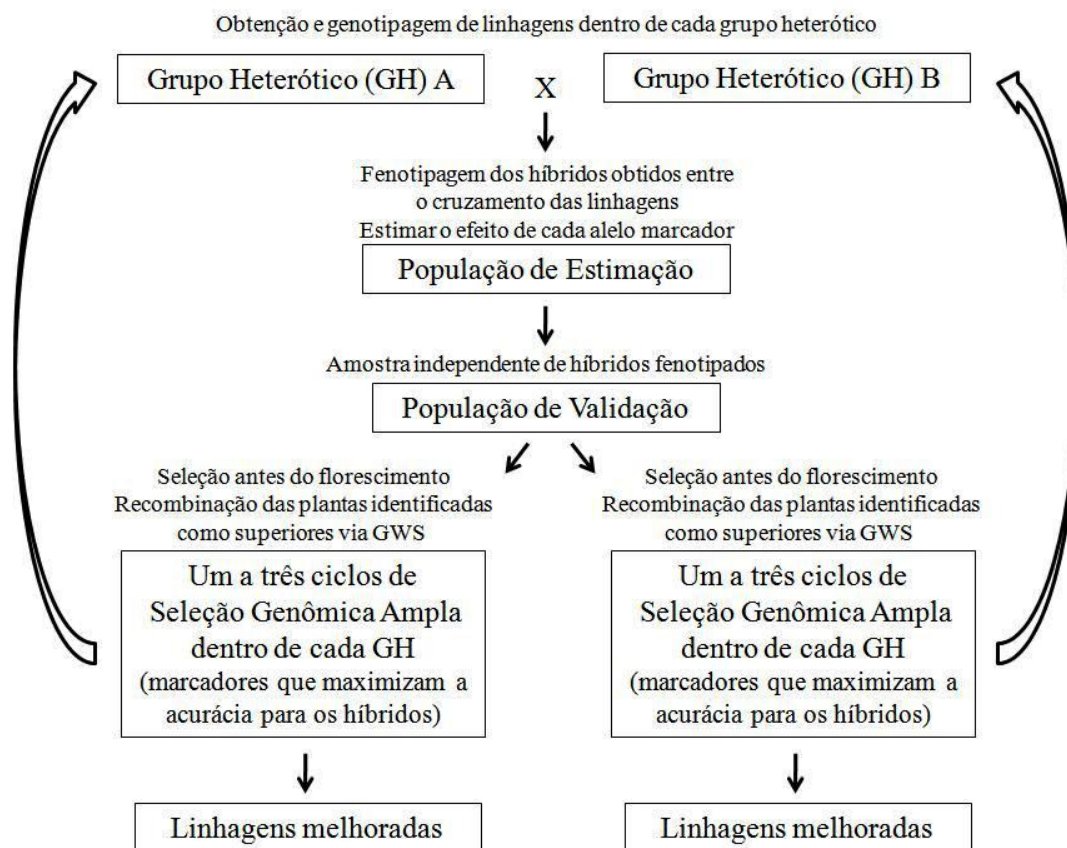
**Tabela 7.** Ganhos com a seleção (GS) em desvios padrão genético aditivos em cada método considerado e a eficiência relativa (ER) da Seleção Genômica Ampla (GWS), com um (GWS 1) ou dois (GWS 2) ciclos por ano, em relação ao métodos de Seleção Recorrente (SR), para as eficiências de absorção (EAN), eficiência de utilização (EUtN) e massa de parte aérea seca (MPS) em baixo (BN) e alto nitrogênio (AN) em milho, Viçosa-MG, Brasil

Estimativa	Método	Caráter			
		EAN (AN)	EAN (BN)	EUtN (AN)	MPS (AN)
GS	SR	0,69	0,65	0,31	0,70
	GWS	1,80	1,32	1,67	1,70
ER (%)	GWS 1	393,84	306,98	816,99	363,82
	GWS 2	1270,80	990,53	2636,15	1173,92

**Tabela 8.** Ganhos com a seleção (GS) em desvios padrão genético aditivos em cada método considerado e a eficiência relativa (ER) da Seleção Genômica Ampla (GWS), com um (GWS 1) ou dois (GWS 2) ciclos por ano, em relação ao métodos de Seleção Recorrente (SR), para as eficiências de absorção (EAP) e de utilização (EUtP) e a massa de parte aérea seca (MPS) em baixo (BP) e alto fósforo (AP), em milho, Viçosa-MG, Brasil

Estimativa	Método	Caráter		
		EAP (BP)	EUtP (BP)	MPS (AP)
GS	SR	0,29	0,35	0,22
	GWS	1,97	2,25	1,83
ER (%)	GWS 1	1028,01	960,21	1240,86
	GWS 2	3317,05	3098,27	4003,85

Existem poucos métodos propostos para a implementação da seleção genômica ampla no melhoramento do milho (Bernardo e Yu, 2007; Mayor e Bernardo, 2009; Albrecht *et al.*, 2011). Neste trabalho, propomos primeiramente um esquema de Seleção Recorrente Genômica Reciproca - SRGR (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema proposto de Seleção Recorrente Genômica Reciproca.

Em todo método baseado no princípio GWS é necessário primeiramente gerar a população de estimação, na qual serão realizadas a genotipagem e a fenotipagem dos genótipos avaliados (Meuwissen *et al.*, 2001). No caso da SRGR a seleção deve ser realizada dentro de cada grupo heterótico, mas baseada no desempenho dos híbridos interpopulacionais. Nesta fase, pode ser utilizado um esquema semelhante ao realizado neste trabalho, em que, foram genotipadas as linhagens genitoras e fenotipados os híbridos obtidos do cruzamento entre elas. A partir destes dados, são estimados os valores genéticos dos marcadores e o número destes que maximizam a acurácia seletiva para cada caráter de interesse. A validação é realizada com um grupo menor e independente de híbridos, ou ainda, nos mesmos híbridos de forma independente, por meio do procedimento Jackknife (Heltshe e Forrester, 1983). Finalmente, faz-se a seleção

genômica dentro de cada grupo heterótico, a partir dos resultados obtidos na população de descoberta e de validação.

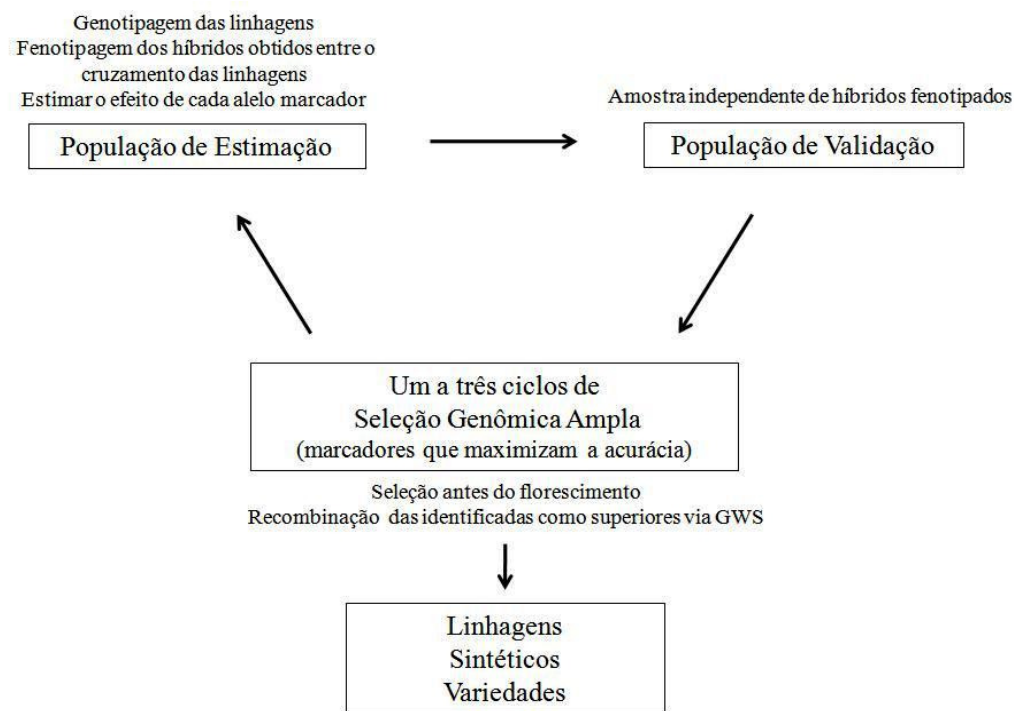
As populações de melhoramento seriam geradas pela livre recombinação das melhores linhagens genitoras dentro de cada grupo heterótico. Após a sua obtenção, elas são semeadas à campo, retirando-se no estado juvenil uma amostra foliar para extração de DNA e a genotipagem com os marcadores identificados no processo de estimação e validação. As plantas são então classificadas em função dos seus valores genéticos genômicos dados pelos marcadores que cada uma apresenta em seu genótipo. As consideradas como superiores para a composição de híbridos interpopulacionais, são identificadas antes do florescimento e as demais eliminadas da população. Deste modo, há a coincidência entre as unidades de seleção e de recombinação, sendo estas em apenas uma geração a campo. Além disso, a seleção é realizada no indivíduo e em ambos os sexos, de modo semelhante ao realizado em espécies perenes (Resende, 2002). Com isto, há aumento significativo na acurácia seletiva, nos ganhos por unidade de tempo e, conseqüentemente, na eficiência do processo de melhoramento. Além disso, a seleção não precisa ser realizada no ambiente ideal de avaliação ou cultivo.

Outro ponto positivo deste método é a possibilidade de monitorar a freqüência dos alelos marcadores nos dois grupos heteróticos. Assim, podem ser selecionados os que mais contribuem para os desvios de dominância e maximizar a divergência genética entre as populações, ou seja, trabalhar nos dois principais componentes da heterose.

A seleção genômica pode ser usada várias vezes sem a avaliação fenotípica. Entretanto, é recomendável reestimar os efeitos e o número dos marcadores que maximizam a capacidade preditiva para cada caráter a cada duas ou três gerações de GWS. Isto se deve ao fato de que com a seleção pode haver mudanças significativas no desequilíbrio de ligação da população, principalmente, pelo aumento na freqüência ou na fixação de alguns alelos (Flint-Garcia *et al.*, 2003).

Nas fases de reestimação dos efeitos dos alelos marcadores, poderiam ser utilizadas ferramentas como a de duplo-haplóides, buscando acelerar o processo de obtenção das linhagens genitoras. Neste mesmo sentido, também poderiam ser utilizados cruzamentos com testadores para a obtenção dos híbridos interpopulacionais, o que diminuiria significativamente os custos.

O método SRGR pode ser facilmente adaptado para o método da Seleção Recorrente Genômica Intrapopulacional - SRGI, conforme o proposto abaixo (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema proposto de Seleção Recorrente Genômica Intrapopulacional.

Por fim, é possível concluir que os métodos propostos de seleção recorrente genômica neste trabalho podem modificar significativamente a forma como é feita a seleção nos programas de melhoramento de milho tanto para condições de estresses abióticos como para outros caracteres de interesse agronômico.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht T, Wimmer V, Auinger H, Erbe M, Knaak C, Ouzunova M, Simianer H, Schön C. 2011. Genome-based prediction of testcross values in maize. *Theoretical Applied Genetics*: (first on line).
- Ahlgren S, Baky A, Bernesson S, Nordberg A, Norén O, Hansson P. 2008. Ammonium nitrate fertiliser production based on biomass – environmental effects from a life cycle perspective. *Bioresource Technology* 99: 8034-8041.
- Bernardo R, YU J. 2007. Prospects for genome wide selection for quantitative traits in maize. *Crop Science* 47: 1082-1090.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bremner JM, Mulvaney CS. 1983. Nitrogen total. In: Page AL. *Methods of soil analysis*. Madison: Soil Science Society of America Press, p.595-624.
- Brito GG, Caixeta ET, Gallina AP, Maciel-Zambolim E, Zambolim L, Diola V, Loureiro M E. 2010. Inheritance of coffee leaf rust resistancion and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173: 255-264.
- Cavalcanti JJV, Resende MDV. 2011. Predição Simultânea de Efeitos de Marcadores e Seleção Genômica Ampla em Cajueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*: (prelo).
- Chen JY, Xu L, Cai YL, Xu J. 2009. Identification of QTLs for phosphorus utilization efficiency in maize (*Zea mays* L.) across P levels. *Euphytica* 167: 245-252.
- Chun L, Mi G, Li J, Chen F, Zhang F. 2005. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. *Plant and Soil*: 276: 369–382.
- Corrales I, Amenós M, Poschenrieder C, Barceló J. 2007. Phosphorus efficiency and root exudates in two contrasting tropical maize varieties. *Journal of Plant Nutrition* 30: 887–900.
- Doyle JJT, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fernando RL, Habier D, Stricker C, Dekkers JCM, Tottir LR. 2007. Genomic selection. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science* 57: 192-195.
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54:357–374.
- Fritsche-Neto R, Miranda GV, DeLima RO, Souza LV, Silva J. 2010. Herança de caracteres associados à eficiência de utilização do fósforo em milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45: 465-471.
- Goddard ME, Hayes BJ. 2007. Genomic Selection. *Journal Animal of Breeding and Genetics* 124: 323–330.
- Hastbacka J, Chapelle A, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M, Hamilton BA, Kusumi K, Trivedi B, Weaver A. 1994. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 78: 1073–87.

- Heffner EL, Sorrells ME, Jannink JL. 2009. Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Science* 49:1-12.
- Heltshe JF, Forrester NE. 1983. Estimating species richness using the jackknife procedure. *Biometrics* 39: 1-11.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 2369–2387.
- Lande R, Thompson R. 1990. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124: 743-756.
- Lima RO. 2010. Herança e relação entre caracteres associados à morfologia de raiz e eficiência de uso de nitrogênio em milho. 2010. 35p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Machado CTT, Machado AT, Furlani AMC. 2004. Variação intrapopulacional em milho para características relacionadas com a eficiência de absorção e utilização de fósforo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 3: 77-91.
- Mayor PJ, Bernardo R. 2009. Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F<sub>2</sub> populations. *Crop Science* 49: 1719–1725.
- Meuwissen T, Hayes B, Goddard M. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819-1829.
- Moll RH, Kamprath EJ, Jackson WA. 1982. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal* 74: 562-564.
- Monneveux P, Zaidi PH, Sanches C. 2005. Population density and low nitrogen affects yield – associated traits in tropical maize. *Crop Science* 45: 535-545.
- Parentoni SN, Souza Jr. CL. 2008. Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 893-901.
- Ramalho MAP, Silva GS, Dias LAS. 2009. Genetic plant improvement and climate changes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 9: 189-195.
- Resende Jr. MFR. 2010. Seleção genômica ampla no melhoramento vegetal. 2010. 67p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Resende MDV, Resende Jr. MFRR, Aguiar AM, Abad JIM, Missiaggia AA, Sansaloni C, Petroli C, Grattapaglia D. 2010. Computação da seleção genômica ampla (GWS). Colombo: EMBRAPA Florestas. 79p.
- Resende MDV. 2008. Genômica Quantitativa e Seleção no Melhoramento de Plantas Perenes e Animais. Colombo: EMBRAPA Florestas. 330p.
- Resende MDV, Lopes PS, Silva RL, Pires IE. 2008. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. *Pesquisa Florestal Brasileira* 56: 63-77.
- Resende MDV. 2002. Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 975p.

- Resende MDV. 2007a. Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético. Colombo: EMBRAPA Florestas. 561p.
- Resende MDV. 2007b. Selegen–Reml/Blup: Sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: EMBRAPA Florestas. 361p.
- Resende MDV. 2007c. Selegen Genômica RR-BLUP. Sistema de Seleção Genômica Ampla (GWS) computadorizada via modelos lineares mistos. (CD-ROM).
- Souza Junior CL. 2001. Melhoramento de espécies alógamas. In: Nass LL *et al.* Recursos genéticos e melhoramento - plantas. Rondonópolis: Fundação MT, p. 159-200.
- Souza LV, Miranda GV, Galvão JCC, Eckert FR, Mantovani EE, Lima RO, Guimarães LJM. 2008. Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 1517-1523.
- Souza LV, Miranda GV, Galvão JCC, Guimarães LJM, Santos IC. 2009. Combining ability of maize grain yield under different levels of environmental stress. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 1297-1303.
- Sultenfuss JH and Doyle WJ. 1999. Phosphorus for agriculture. *Better Crops with Plant Food* 83: 1-40.
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. (4. Ed.) Sunderland: Sinauer Associates. 764p.
- Walk TC, Jaramillo R, Lynch JP. 2006. Architectural tradeoffs between adventitious and basal roots for phosphorus acquisition. *Plant Soil* 279: 347-366.
- Wong CK, Bernardo R. 2008. Genomewide selection in oil palm: increasing selection gain per unit time and cost with small populations. *Theoretical Applied Genetics* 116: 815–824.