

**MARIANA RODRIGUES RIBEIRO**

**METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE COMBINATÓRIA DE  
LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES DE MILHO**

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

Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias

Coorientadores: Roberto dos Santos Trindade  
Lauro José Moreira Guimarães

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R484m  
2021  
Ribeiro, Mariana Rodrigues, 1990-  
Metodologias de identificação e capacidade combinatória  
de linhagens duplo-haploides de milho / Mariana Rodrigues  
Ribeiro. – Viçosa, MG, 2021.  
1 tese eletrônica (115 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.073>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Zea mays*. 2. Milho - Melhoramento Genético. 3. Folhas  
- Anatomia. 4. Espectroscopia de infravermelho próximo.  
5. Milho - Rendimento. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.152

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

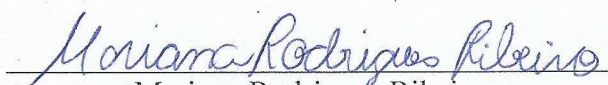
MARIANA RODRIGUES RIBEIRO


**METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO E CAPACIDADE COMBINATÓRIA DE  
LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES DE MILHO**

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

APROVADA: 06 de agosto de 2021.

Assentimento:

  
Mariana Rodrigues Ribeiro  
Autora

  
Luiz Antônio dos Santos Dias  
Orientador

*Aos meus pais e irmãos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo amor incondicional, pela sabedoria e saúde.

Agradeço aos meus pais Maurício e Rosinei, à minha irmã Marina e aos familiares pelo amor, otimismo e união, e pela paciência e experiência.

Agradeço à Andréia de Fátima, Barbara Duarte, Marina Cunha, Maiara Leite, Mariana Lima, Letícia Abreu, Luciana Witt, Rafaela Costa, Priscila Palla, pelo amor e entusiasmo, pelos conselhos, pela amizade, e alegria.

Agradeço ao orientador professor Luiz Antônio dos Santos Dias e aos co-orientadores pesquisadores Roberto dos Santos Trindade e Lauro José Moreira Guimarães pela compreensão, paciência, e pelos ensinamentos.

Agradeço aos funcionários do Programa de Melhoramento de Milho do Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo.

Agradeço aos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo, aos professores do Departamento de Agronomia e Biologia Geral, pelos ensinamentos e conselhos.

Agradeço ao CNPq, Capes e Fapemig pela concessão da bolsa de estudos e pelo fomento à pesquisa.

E aos demais colegas, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz.”*  
*(Aristóteles)*

## **BIOGRAFIA**

MARIANA RODRIGUES RIBEIRO, filha de Maurício Afonso Ribeiro Rosinei Rodrigues de Oliveira Ribeiro, nasceu no dia 1 de abril de 1990, na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em março de 2009 iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Viçosa-MG, graduando-se em março de 2014.

Em março de 2014, iniciou o curso de Mestrado no programa da Fitotecnia na UFV, Viçosa-MG, concentrando seus estudos na linha de pesquisa: Melhoramento de Plantas, Recursos Genéticos e Biotecnologia, defendendo sua dissertação em abril de 2016.

Em agosto de 2017, iniciou o curso de Doutorado no programa da Fitotecnia na UFV, Viçosa-MG, continuando seus estudos na linha de pesquisa: Melhoramento de Plantas, Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## RESUMO

RIBEIRO, Mariana Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2021. **Metodologias de identificação e capacidade combinatória de linhagens duplo-haploides de milho.** Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias. Coorientadores: Roberto dos Santos Trindade e Lauro José Moreira Guimarães.

A tecnologia de duplo-haploides é utilizada nos programas de melhoramento genético de milho para obtenção de linhagens, principal insumo para desenvolvimento de novas cultivares. Atualmente, a classificação de sementes haploides é baseada na análise visual, pelo marcador genético *RI-navajo*, o qual condiciona a presença de pigmentação púrpura no endosperma e a ausência de pigmentação púrpura no embrião. Em campo, plantas haploides e duplo-haploides podem ser identificadas por seu desenvolvimento lento e pela sua arquitetura, com porte baixo e folhas eretas e estreitas, em comparação com plantas diploides. No entanto, são importantes métodos alternativos que auxiliem na identificação de haploides e duplo-haploides antes do transplante a campo, economizando tempo e recursos. A análise anatômica dos estômatos e a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) associada a métodos de calibração multivariados são técnicas alternativas para identificação de haploides e duplo-haploides de forma rápida, porém é importante a validação destas metodologias para ajustes de protocolos e uso em larga escala. Outra questão relativa ao uso de linhagens DHs é que devido ao grande número de linhagens e pela variabilidade das progênes que podem ser obtidas pela tecnologia de duplo-haploides em um programa de melhoramento de milho, torna-se essencial a avaliação da capacidade combinatória (CC). A CC estima o potencial de um dado genótipo como genitor em uma série de combinações híbridas, assim como auxilia o melhorista na escolha de genitores com alto potencial genético. A CC é constituída pela capacidade geral de combinação (CGC) e pela capacidade específica de combinação (CEC). A CGC determina o comportamento médio de uma linhagem em combinações híbridas. E a CEC tem por finalidade identificar combinações híbridas superiores ou inferiores ao valor médio determinado pela CGC. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: 1) Identificar pela anatomia foliar plântulas duplo haploides e diploides derivadas de genótipos-fonte de milho, com diferentes gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ); 2) Identificar e classificar, pelo método discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) associado ao infravermelho próximo sementes haploides e diploides derivadas de diferentes genótipos-fonte, e; 3) avaliar linhagens duplo-haploides como genitoras com base na capacidade combinatória e no desempenho agrônômico de seus híbridos. Para o estudo da anatomia foliar, foram avaliadas linhagens DH e falso-positivos (FP) derivadas de nove

genótipos-fonte de milho tropical, com diferentes gerações (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>). Para o estudo da espectroscopia do infravermelho próximo, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foram analisadas sementes de milho haploides e diploides de quatro genótipos-fonte. E no segundo experimento foram avaliadas plantas diploides, haploides e duplo-haploides de 34 genótipos-fonte. Para avaliação da capacidade combinatória geral e específica foi analisado o desempenho agrônômico de híbridos simples obtidos de linhagens duplo-haploides derivados de genótipos-fonte com diferentes gerações (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>) em dois níveis de adubação. A área estomática se mostrou a característica mais eficiente para distinção entre linhagens DH e falso-positivos. O MicroNIR portátil, associado ao método PLS-DA, possibilitou a classificação de sementes e plantas haploides, e, plantas duplo-haploides. A avaliação de linhagens duplo-haploides com base no desempenho de seus híbridos permitiu selecionar genitores DHs com alto potencial como genitoras de cultivares superiores.

Palavras-chave: *Zea mays*. Melhoramento genético. Tecnologia de duplo-haploides. Anatomia foliar. NIR. Produtividade.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Mariana Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2021. **Identification methodologies and combining ability of double-haploid maize lines.** Adviser: Luiz Antônio dos Santos Dias. Co-advisers: Roberto dos Santos Trindade and Lauro José Moreira Guimarães.

The double-haploid technology is used in maize breeding programs to obtain lines, the main input for the development of new cultivars. Currently, the classification of haploid seeds is based on visual analysis, by the genetic marker *R1-navajo*, presence of purple pigmentation in the endosperm and absence of purple pigmentation in the embryo. In the field, haploid and double-haploid plants can be identified by their slow development and by their architecture, with low height and erect and narrow leaves, compared to diploid plants. However, alternative methods that help identify haploids and double-haploids before field transplanted are important, saving time and resources. Anatomical analysis of stomata and near infrared (NIR) spectroscopy associated with multivariate calibration methods are alternative techniques for quickly identifying haploids and double-haploids, but it is important to validate these methodologies for protocol adjustments and widespread use scale. Another issue related to the use of DH lines is that due to the large number of lines and the variability of progenies that can be obtained by the double-haploid technology in a corn breeding program, it is essential to evaluate the combining ability, which estimates the potential of a given genotype as a parent in a series of hybrid combinations, as well as assisting the breeder in choosing parents with high genetic potential. The combinatorial ability is made up of the general combining ability and the specific combining ability. General combining ability determines the average behavior of a strain in hybrid combinations. And, the specific combining ability is intended to identify hybrid combinations greater than or less than the average value determined by the general combining ability. Thus, the objectives of this work were: 1) To identify, by leaf anatomy, double haploid and diploid seedlings derived from maize source genotypes, with different generations (F1, F2 and S1); 2) Identify and classify, by the discriminant method by partial least squares (PLS-DA) associated with the near infrared, haploid and diploid seeds derived from different source genotypes, and; 3) evaluate double-haploid lines as parents based on the combinatorial ability and agronomic performance of their hybrids. For the study of leaf anatomy, DH and false-positive (FP) lines derived from nine tropical corn source genotypes, with different generations (F1, F2 and S1) were evaluated. For the study of near infrared spectroscopy, two experiments

were carried out. In the first experiment, haploid and diploid maize seeds from four source genotypes were analyzed. And in the second experiment, diploid, haploid and double-haploid plants of 34 source genotypes were evaluated. To evaluate the general and specific combining ability, the agronomic performance of simple hybrids obtained from double-haploid lines derived from source genotypes with different generations (F1, F2, S1) at two levels of fertilization was analyzed. The stomatal area proved to be the most efficient feature for distinguishing between DH and false-positive strains. The portable MicroNIR, associated with the PLS-DA method, enabled the classification of seeds and haploid plants, and double-haploid plants. The evaluation of double-haploid lines based on the performance of their hybrids allowed selecting DH parents with high potential as parents of superior cultivars.

Keywords: *Zea mays*. Genetic improvement. Double-haploid technology. Leaf anatomy. NIR. Yield.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REFERÊNCIAS .....	15
3. CAPÍTULO 1.....	16
3.1. Resumo.....	16
3.2. Abstract .....	17
3.3. Introdução.....	18
3.4. Material e Métodos .....	20
3.4.1. Local e data.....	20
3.4.2. Material vegetal em estudo.....	20
3.4.3. Obtenção de haploides.....	21
3.4.4. Duplicação cromossômica.....	22
3.4.5. Identificação de haploides por fenotipagem e anatomia foliar.....	24
3.4.6. Análises estatísticas .....	25
3.5. Resultados e Discussão.....	25
3.6. Conclusões.....	34
3.7. Agradecimentos .....	34
3.8. Referências .....	34
4. CAPÍTULO 2.....	38
4.1. Resumo.. .....	38
4.2. Abstract .....	39
4.3. Introdução.....	40
4.4. Material e Métodos .....	42
4.4.1. Local e data.....	42
4.4.2. Identificação de haploides por análise de sementes de milho com NIR .....	42
4.4.3. Identificação de plantas haploides, duplo-haploides e diploides via avaliação de amostras de folhas com NIR.....	45
4.5. Resultados e Discussão.....	48
4.5.1. Identificação de haploides por Análise de sementes de milho com NIR .....	48
4.5.2. Identificação de plantas haploides, duplo-haploides e diploides via avaliação de amostras de folhas com NIR.....	51
4.6. Conclusões.....	57
4.7. Referências .....	57

5. CAPÍTULO 3.....	61
5.1. Resumo.....	61
5.2. Abstract .....	63
5.3. Introdução .....	64
5.4. Material e Métodos .....	66
5.4.1. Local, data e material vegetal em estudo.....	66
5.4.2. Obtenção de duplo-haploides via duplicação cromossômica.....	67
5.4.3. Cruzamentos dialélicos entre DHs e testadores de diferentes grupos heteróticos....	69
5.4.4. Avaliação do dialelo em diferentes níveis de adubação.....	71
5.4.5. Análises estatísticas.....	72
5.5. Resultados e Discussão.....	74
5.5.1. Desempenho agrônômico de híbridos de milho derivados de linhagens duplo- haploides .....	74
5.5.2. Capacidade combinatória de linhagens dh em cruzamento com testadores de três grupos heteróticos .....	84
5.6. Conclusões.....	90
5.7.Referências.....	90
ANEXOS.....	95

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A tecnologia de duplo-haploides (DHs) é uma ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento de milho para obtenção de linhagens totalmente homozigotas em três gerações, reduzindo o tempo para desenvolvimento de cultivares (Chaikam et al. 2019). Esta técnica é utilizada por empresas de sementes em todo o mundo, e cultivares de milho derivados de linhagens duplo-haploides têm sido obtidos e lançados ao redor do globo (Beyene et al. 2017; Chaikam et al. 2019).

Nos programas de melhoramento genético, linhagens duplo-haploides propiciam maior ganho genético devido a redução do tempo para se atingir a máxima endogamia e o aumento da variância genética entre famílias que a técnica proporciona (Chaikam et al. 2019). Uma maior variância genética é um parâmetro importante para aumentar a magnitude da estimativa de herdabilidade e a resposta à seleção com base em características agronômicas (Gallais e Bordes 2007; Mayor e Bernardo 2009; Chaikam et al. 2019).

O processo de obtenção de linhagens duplo-haploides envolve: i) a indução de haploidia; ii) a identificação de haploides; iii) duplicação cromossômica nos haplóides selecionados; iv) autofecundação das plantas duplo-haploides para estabilização e aumentar o número de sementes (Chaikam et al. 2019).

A taxa de indução de haploides in vivo é de aproximadamente 10% (Chaikam et al. 2019). A seleção de sementes haploides é baseada em análise visual, com base no marcador genético *RI-navajo* (*RI-nj*), que codifica a pigmentação púrpura no endosperma e embrião das sementes (Chase, 1952; Nanda e Chase, 1966). No entanto, a expressão do gene *RI-nj* pode variar entre diferentes genótipos, o que pode reduzir a precisão deste método (Cui et al. 2019). É comum, após o transplante de mudas, a identificação de falsos-positivos com base em características morfológicas, uma vez que plantas DHs possuem crescimento mais lento, porte reduzido e folhas eretas e mais estreitas, em comparação com plantas diploides (Chase, 1952; Prigge e Melchinger, 2012; Wu et al. 2014; Trindade et al. 2018).

Entretanto, esta seleção tardia de plantas haploides e eliminação de falsos-positivos demanda tempo, recursos e espaço, uma vez que genótipos que não seguirão no processo de obtenção de DHs são colocados em campo, o que implica em maiores custos financeiros. Este fato torna necessário estudar alternativas para identificação de haploides em sementes ou no estágio de plântulas, evitando o transplante de falsos positivos, otimizando assim o processo de obtenção de DHs, dentro da hipótese de que é possível a seleção precoce de haploides em milho ainda no estágio de plântula.

Existem metodologias alternativas para identificação de haploides e DHs em estádios iniciais de desenvolvimento. Por exemplo, a análise anatômica foliar é uma metodologia que apresenta resultados rápidos e redução de custos, sendo o tamanho estomático variado entre plântulas haploides e diploides (Choe et al. 2012; Souza et al. 2018). A espectroscopia no infravermelho próximo (Near Infrared, em inglês - NIR) associada a métodos de calibração multivariada, permite o desenvolvimento de metodologias qualitativas e quantitativas de forma rápida, não destrutiva e sem a utilização de reagentes (Jones et al. 2012, Cui et al. 2019), e também pode ser utilizada para auxiliar na identificação de sementes e plântulas haploides e duplo-haploides.

Após a obtenção de linhagens duplo-haploides, da mesma forma que na metodologia tradicional para obtenção de linhagens, é essencial a avaliação das mesmas *per se* e como genitoras de cultivares superiores. Neste contexto, torna-se essencial a avaliação da capacidade combinatória das linhagens no programa de melhoramento de milho (Wang et al. 2020; Riedelsheimer et al. 2012; Guimarães et al. 2018). Ainda existem poucos trabalhos que comparam o desempenho de linhagens duplo-haploides com linhagens obtidas pelo método convencional, principalmente considerando o efeito do genótipo-fonte (Bordes et al., 2006; 2007; Krchov and Bernardo, 2015; Khakwani et al., 2018). Dessa forma, uma hipótese que se desenha é a que existe diferenças entre o desempenho de linhagens duplo-haploides em relação às linhagens convencionais em termos de potencial de uso como parentais de cultivares superiores.

Para a seleção de linhagens superiores, uma das metodologias mais utilizadas tem sido a análise dialélica (Griffing, 1956). O uso do dialelo parcial permite a avaliação de um grande número de linhagens em cruzamentos, estimando a capacidade geral de combinação dos progenitores e a capacidade específica de combinação das combinações híbridas e a estimação de parâmetros genéticos que auxiliam os melhoristas a adotarem estratégias de seleção (Cruz et al. 2005; Maioli et al. 2020).

Os objetivos do presente trabalho foram: i) a avaliação de metodologias alternativas para identificação de haploides derivadas de genótipos-fonte de milho base tropical, com diferentes gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), como a análise da anatomia foliar, e o uso do método discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) em conjunto com a técnica no infravermelho próximo; ii) comparar o desempenho agrônômico de linhagens DHs e linhagens convencionais, e avaliar a capacidade combinatória das linhagens duplo-haploides em dois níveis de fertilidade.

## 2. REFERÊNCIAS

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; LAPIERRE, A.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. (2007). Doubled-haploid versus single-seed descent and S1-family variation for testcross performance in a maize population. **Euphytica** v.154, p.41–51.

BORDES, J.; CHARMET, G.; DUMAS DE VAULX, R.; POLLACSEK, M.; BECKERT, M.; GALLAIS, A. (2006). Doubled-haploid versus S1 family recurrent selection for testcross performance in a maize population. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1063–1072.

GUIMARAES, L. J. M.; TRINDADE, R. dos S.; PARENTONI, S. N.; GUIMARAES, P. E. de O. Desenvolvimento de linhagens. In: DELIMA, R. O.; BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de milho**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2018.

KHAKWANI, K.; AHSAN, M. SADAQAT, H.A.; AHMAD, R. (2018). Development and genetics of maize doubled haploid lines. Development and genetics of maize doubled haploid lines. **Maydica**, [S.l.], v.63, n.3, p.15.

KRCHOV LM, BERNARDO R. (2015) Relative efficiency of genomewide selection for testcross performance of doubled haploid lines in a maize breeding program. **Crop Science**, v.55, p. 2091-2099

MAYOR, P.J.; BERNARDO, R. (2009). Genomewide Selection and Marker-Assisted Recurrent Selection in Doubled Haploid versus F2 Populations. **Crop Science**, v. 49, p.1719-1725.

### 3. CAPÍTULO 1

## ÁREA DE ESTÔMATOS E DENSIDADE ESTOMÁTICA SÃO CARACTERÍSTICAS FIDEDIGNAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE DUPLO-HAPLOIDES EM MILHO?

### 3.1. Resumo

A despeito de ser o método mais utilizado para seleção de haploides em milho, a análise visual, baseada na expressão do gene *R1-navajo*, é sujeita a imprecisões. O estudo de metodologias alternativas para distinção de duplo-haploides (DH) de falso-positivos (FP) é fundamental. O presente trabalho avaliou a eficiência do uso de características de anatomia foliar na distinção de plantas DH derivadas de genótipos-fonte de origem tropical em diferentes gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ) de genótipos FP. Foram avaliadas linhagens DH e FP derivadas de nove genótipos-fonte de milho tropical, com diferentes gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), obtidas a partir de cruzamentos biparentais entre linhagens-elite. Para a identificação de DH via anatomia foliar, em cada um dos nove grupos, foram selecionados seis genótipos no estágio V6, sendo quatro plantas DH e duas FP em cada grupo. Para análise estatística foram considerados os dados de área e densidade de estômatos, considerando um modelo inteiramente casualizado com nove tratamentos, referentes ao número de grupos de linhagens DHs avaliadas. Em seguida, o efeito de cada grupo foi desdobrado em gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), tipo de genótipo (DH ou FP) e na interação entre estes dois efeitos (gerações x tipo). Não houve efeito de gerações na área de estômatos de DH e FP, mas a densidade de estômatos apresentou variação na geração  $F_1$ . A área estomática se mostrou eficiente para distinção de DH e FP, enquanto a densidade estomática, embora apresente menores médias em diploides que em DH, não apresentou diferenças significativas entre DHs e FPs para uso na seleção de haploides putativos.

Palavras-chave: *Zea mays*, anatomia foliar, tecnologia de duplo haploides.

### 3.2. Abstract

Despite being the most used method for haploid selection in maize, visual analysis, based on the expression of the *R1-navajo* gene, is subject to inaccuracies. The study of alternative methodologies for distinguishing double-haploid (DH) from false-positive (FP) is fundamental. The present work evaluated the efficiency of the use of leaf anatomy traits in distinguishing DH plants derived from tropical source genotypes in different generations (F1, F2 and S1) of FP genotypes. Lines DH and FP derived from nine source genotypes of tropical corn, with different generations (F1, F2 and S1), obtained from biparental crosses between elite lines, were evaluated. For the identification of DH via leaf anatomy, in each of the nine groups, six genotypes were selected at stage V6, four DH plants and two FP plants in each group. For statistical analysis, stomata area and density data were considered, considering a completely randomized model with nine treatments, referring to the number of groups of DH lines evaluated. Then, the effect of each group was broken down into generations (F1, F2 and S1), genotype type (DH or FP) and the interaction between these two effects (generations x type). There was no effect of generations on the area of DH and FP stomata, but the density of stomata varied in the F1 generation. The stomatal area proved to be efficient for distinguishing DH and FP, while the stomatal density, although presenting lower means in diploids than in DH, did not show significant differences between DHs and FPs for use in the selection of putative haploids.

Keywords: *Zea mays*, leaf anatomy, double haploids technology.

### 3.3. Introdução

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil, constituindo, juntamente com a soja os dois principais produtos agrícolas nacionais (CONAB, 2020). Segundo levantamento da CONAB, a produção brasileira do milho em 2019/20 foi de cerca de 100 milhões de toneladas. O país é o terceiro maior produtor mundial e o segundo maior exportador do cereal. A produção mundial atingiu aproximadamente 1 bilhão de toneladas em 2017/2018. A grande produção de milho no Brasil decorre de sua importância na alimentação humana e animal, e como insumo na indústria, o que favorece o aumento da sua produção e área plantada.

Para atender à demanda da cadeia produtiva, os programas de melhoramento genético necessitam reduzir o tempo para a seleção e desenvolvimento de genótipos de milho mais produtivos, resistente a estresses e com manejo facilitado, o que implica na aplicação de novas estratégias, como a engenharia genética, ferramentas de predição genômica e o uso da tecnologia de duplo-haploides (DH) (Xu et al. 2017, Chaikam et al. 2019).

A tecnologia de DH visa à redução de tempo na obtenção de linhagens homozigotas. Esta técnica reduz em um ano e meio (três gerações) a obtenção de linhagens homozigóticas e, adicionalmente, resulta em grande variabilidade entre as progênies obtidas, tornando a seleção entre famílias mais eficaz. As vantagens da tecnologia de linhagens DH têm levado empresas de sementes a empregá-la em larga escala para a redução de tempo e custos no lançamento de cultivares (Liu et al. 2016). Com isso, a tecnologia de DH tem se tornado alvo de pesquisa em empresas e universidades (Couto et al. 2013, Marcondes, 2018).

A análise visual é o primeiro parâmetro utilizado na identificação de embriões haploides. Os embriões haploides possuem metade dos cromossomos ( $n=10$ ) da espécie de milho. As plantas haploides após a duplicação cromossômica geram plantas duplo-haploides. A análise baseia-se no marcador fenotípico expresso pelo gene *R1-navajo* (*R1-nj*), que codifica a pigmentação do endosperma e embrião das sementes de milho com antocianina (Nanda e Chase 1966). Este sistema permite a seleção de sementes que darão origem a possíveis haploides, pela seleção dos embriões que apresentam coloração branca, possuindo genes apenas do genótipo-fonte (Prasanna et al. 2012).

A despeito de sua eficiência para seleção inicial de haploides em milho, a análise visual de sementes também é sujeita a imprecisões no processo de identificação. A imprecisão na identificação de sementes haploides se deve ao marcador *R1-nj* que pode ser completamente inibido ou segregado nos grãos do milho no cruzamento de indução de haploidia, devido à

existência de alelos que interferem na rota de síntese da antocianina em plantas de milho, podendo ocorrer com maior frequência em populações de origem tropical (Chaikam et al. 2015).

Diante do exposto, torna-se necessário a avaliação de características que permitam identificação posterior e descarte de falsos-positivos (FP), ou seja, de plantas cuja semente foi erroneamente identificada como haploide por erros na seleção ou inibição da formação de antocianina no embrião, e haploides putativos, que seriam os verdadeiros indivíduos haploides, corretamente identificados, o que proporciona redução dos gastos com insumo, mão de obra e espaço (Choe et al. 2012, Souza et al. 2018).

Várias características têm sido analisadas para seleção de haploides em milho, como: a coloração de raízes seminais (Prassana et al. 2012, Chaikam et al. 2016), teor de óleo no embrião (Melchinger et al. 2014), peso de sementes (Smelser et al. 2015), o vigor das plântulas (Ribeiro et al. 2018), comprimento de parte aérea e raiz (Chaikam et al. 2017), citometria de fluxo (Couto et al. 2013, Han et al. 2016, Ribeiro et al. 2018), e a análise anatômica dos estômatos (Choe et al. 2012, Souza et al. 2018). Estes métodos possibilitam confirmar a haploidia de plantas nos estágios de sementes ou plântulas e eliminar plantas diploides que não foram excluídas pelos parâmetros anteriores.

A análise anatômica de estômatos para identificar plantas haploides é uma metodologia eficaz, podendo ser realizada nas fases iniciais de desenvolvimento da planta, apresentando resultados rápidos e baixo custo (Souza et al. 2018). A aferição do comprimento das células-guarda dos estômatos é uma metodologia usada para discriminação de ploidia, pois tem sido correlacionada ao conteúdo de DNA em várias espécies, uma vez que a alteração do nível de ploidia em plantas resulta em alterações no tamanho e anatomia de seus órgãos, e em nível de célula, as quais podem ser identificadas via microscopia.

Na espécie *Clematis heracleifolia* (botão de ouro), a duplicação cromossômica com solução de colchicina gerou indivíduos com maior comprimento e largura de estômatos (Wu et al. 2013). Na duplicação cromossômica *in vitro* de óvulos não fertilizados na espécie *Chrysanthemum sp.* (crisântemo), foi observado haploides duplicados maior comprimento de estômatos quando comparados com indivíduos haploides (Wang et al. 2014). E, o cruzamento da linhagem de trigo macho-estéril (*Triticum sp.*) com genótipo de milho indutor de haploidia geraram plantas haploides com folhas de maior comprimento das células guarda em relação às plantas controle diploides (Zhang et al. 2014).

Na cultura do milho foi estudado o potencial de utilizar o comprimento da célula de guarda dos estômatos como medida para a detecção precoce de plantas duplo-haploides e falsos-positivos (Choe et al. 2012; Souza et al. 2018). Choe et al. (2012) relataram que o comprimento

de estômatos de plantas duplo-haploides foi menor do que plantas diploides. Estes resultados corroboram com os estudos de Souza et al. (2018): menor comprimento de estômatos foi encontrado em plantas haploides, seguido por plantas duplo-haploides. E, maior comprimento de estômatos em plantas diploides.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do uso de características relacionadas à anatomia foliar na distinção de plantas DH derivadas de genótipos-fonte de milho em diferentes gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), de falsos-positivos, visando aumentar a eficiência de seleção e obtenção de linhagens duplo-haploides.

### **3.4. Material e Métodos**

#### **3.4.1. Local e data**

O experimento foi executado em áreas experimentais, casa de vegetação, laboratório, e campo experimental localizados na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, entre dezembro de 2017 e julho de 2019. A cidade de Sete Lagoas encontra-se localizada na latitude: 19° 28' 4" Sul, longitude: 44° 14' 52" Oeste e 751 metros de altitude,

#### **3.4.2. Material vegetal em estudo**

No experimento de seleção de haploides de milho com base na anatomia foliar, foram avaliadas linhagens duplo haploides e falso-positivos derivados de nove genótipos-fonte de milho, obtidas a partir de cruzamentos biparentais entre linhagens-elite do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo, sendo cinco (5) genótipos-fonte do grupo heterótico Flint e quatro (4) do grupo Dent. Os cruzamentos  $F_1$  foram realizados apenas entre linhagens do mesmo grupo heterótico. Posteriormente, os genótipos-fonte  $F_1$  foram autofecundados de 3 a 5 plantas resultando na geração  $F_2$ . Em sequência, as plantas da geração  $F_2$  foram autofecundadas para obter a geração  $S_1$ . Por fim, para cada genótipo-fonte ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ) foi realizada a indução de haploidia em lote isolado. Entretanto não foram obtidos haploides de todas as gerações, devido a perdas de campo, resultando em 16 linhagens duplo haploides (Tabela 1).

**Tabela 1.** Linhagens duplo haploides avaliadas no experimento de seleção de haploides de milho com base na anatomia foliar conforme origem, geração (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>) e grupo heterótico do genótipo-fonte

Nº de genótipos-fonte	Linhagens	Gerações	Grupo Heterótico
1	G2	F <sub>1</sub> , S <sub>1</sub>	Flint
2	G3	S <sub>1</sub>	Flint
3	G4	F <sub>2</sub> , S <sub>1</sub>	Flint
4	G5	F <sub>2</sub> , S <sub>1</sub>	Flint
5	G6	F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub>	Flint
6	G7	F <sub>1</sub>	Dent
7	G8	F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> , S <sub>1</sub>	Dent
8	G9	F <sub>1</sub> , S <sub>1</sub>	Dent
9	G12	S <sub>1</sub>	Dent

### 3.4.3. Obtenção de haploides

O campo de indução de haploidia foi implantado em dezembro de 2017 por semeadura das nove genótipos-fonte em fileiras individuais intercaladas pelo híbrido indutor de haploidia gimnogenético (TAIL P<sub>1</sub> x TAIL P<sub>2</sub>), na proporção 1:1. Os indutores TAIL P<sub>1</sub> e TAIL P<sub>2</sub> foram desenvolvidos pelo Centro Internacional de Melhoramento do Milho e Trigo – CIMMYT (Prassana et al. 2012) e são licenciados para uso pela Embrapa Milho e Sorgo por meio de contrato.

As médias climáticas do campo de indução de haploidia neste período foram de 500 mm de pluviosidade, 25,9°C de temperatura, com média de máximas em torno de 33°C e 75% de Umidade relativa do ar. A indução de haploidia foi efetuada em campo, com isolamento de 1000 m de outros plantios de milho em seu entorno. O plantio se deu de forma mecanizada, no espaçamento de 4,20 m x 0,70 m com aplicação de 350 kg/ha da formulação 8-28-16 (N-P-K) no momento do plantio. O campo de indução recebeu irrigação para manutenção das demandas hídricas da cultura e foram efetuados os demais tratamentos culturais recomendados para a cultura do milho (Pereira Filho e Borghi 2016) conforme o desenvolvimento da cultura.

Por ocasião do pendão encartuchado, houve o despendoamento de todas as plantas dos genótipos-fonte de forma a permitir que apenas o pólen derivado dos indutores de haploidia estivesse no campo. A colheita do campo se deu em abril de 2018, de forma manual, em que as espigas de cada genótipo-fonte colhida foram inseridas em sacolas identificadas com etiquetas

relativas à sua origem e grupo heterótico.

Após o cruzamento dos genótipos-fonte de diferentes gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$  com o híbridos indutores de haploidia (TAIL P1 x TAIL P2), efetuou-se a seleção de sementes por meio do marcador *RI-navajo* (*RI-nj*). Neste sistema, as sementes de cada espiga que apresentavam pigmentação púrpura no endosperma e ausência da pigmentação no embrião foram selecionadas como sementes haploides, sendo descartadas as sementes diploides (com pigmentação púrpura no endosperma e embrião) e sementes com ausência de pigmentação. A seleção de haploides, ou seja, de plantas de milho com a metade dos cromossomos conhecidos para a espécie, as quais apresentam sementes com presença de pigmentação púrpura no endosperma e ausência de pigmentação púrpura no embrião, se deu entre abril e agosto de 2018, sendo selecionadas cinco genótipos-fonte Flint e quatro do grupo Dent para duplicação cromossômica.

#### **3.4.4. Duplicação cromossômica**

Após identificação de possíveis haploides, procedeu-se a duplicação cromossômica para obtenção de linhagens duplo haploides. Para tanto, de cada genótipo-fonte e geração ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ) foram contadas 50 sementes para duplicação. Desta forma, os tratamentos para duplicação cromossômica foram constituídos de cinco haploides derivados de genótipos-fonte Flint e quatro haploides derivados de genótipos-fonte Dent. Cada haploide de milho era representado por 50 sementes de cada geração  $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ , resultando em nove grupos em um total de 1350 plantas para tratamento. A duplicação cromossômica se deu em janeiro de 2019, adotando-se o protocolo preconizado por Couto et al. (2013), com modificações. As sementes haploides foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita a 3cm de profundidade. Estas bandejas foram mantidas em casa de vegetação climatizada, com temperatura em torno de 25°C e umidade relativa do ar em torno de 60%. Após transplântio, a irrigação das plântulas foi efetuada em dias alternados, de forma a manter a umidade do substrato na melhor condição possível, até a duplicação cromossômica.

Após 15 dias da semeadura, as plântulas passaram pelo processo de duplicação cromossômica no laboratório de tecnologia de duplo haploides da Embrapa Milho e Sorgo. Inicialmente, as plântulas foram cuidadosamente retiradas das bandejas, passando por lavagem das raízes em água corrente. Em seguida, foram agrupadas em maços de 25 plântulas, identificadas conforme seu genótipo-fonte de origem, cada maço foi inserido em béqueres de 800 ml com água, para evitar o murchamento. Para duplicação cromossômica foram preparados 10 litros de solução composta pelos reagentes: colchicina 1% (m/v), dimetilsulfóxido 1% (v/v)

e Tween20 1% (v/v), na proporção (1:1:1). Após preparo, 185 mL dessa solução foram colocados em béqueres de 600 mL, envolvidos por papel de alumínio, para evitar a fotodegradação da colchicina. Estes béqueres foram transferidos para capela de exaustão, e em cada béquer foi inserido um maço de 25 plântulas devidamente identificado. As plântulas foram mantidas em tratamento por 6 horas, na ausência de luz e em temperatura ambiente, visando-se promover a duplicação cromossômica via absorção radicular.

Após seis horas de tratamento em solução de colchicina, os maços de plântulas foram retirados da solução e alocados em peneiras cúbicas, e transferidas para tanque de lavagem via aspersão por 30 minutos. Posteriormente, as plântulas duplo haploides foram transplantadas para bandejas plásticas contendo substrato comercial, e transportadas para casa de vegetação climatizada, sendo mantidas por 20 dias para recuperação do tratamento com colchicina e aclimação pré-transplântio. Após dois dias do transplântio para o substrato comercial foram realizadas adubação foliar com 3 mL/L de micronutrientes e 3 g/L de 19-19-19 (N-P-K). A aplicação foi a cada sete dias para atender as exigências nutricionais das plântulas, até o transplântio definitivo das plantas.

No transplântio definitivo das plântulas duplo haploides para vasos, as plântulas foram cuidadosamente retiradas das bandejas com substratos e transplantadas manualmente para vasos de 20 L com solo adubado utilizando uma dosagem equivalente a 2000 kg/ha de 4-28-16 (N-P-K) + Zn. Foram transplantadas três plântulas por vaso identificado por tratamento, no dia 05/02/2019, sendo os vasos mantidos em casa de vegetação climatizada. O manejo posterior ao plantio foi efetuado conforme as exigências da cultura (Amaral Filho et al. 2005), sendo duas adubações de cobertura, com 30 g de sulfato de amônia (20% de nitrogênio e 22% de enxofre) no estádio V5 e 16 g de uréia (45% de nitrogênio) em V8. Após o transplântio definitivo, a irrigação nos vasos foi efetuada em dias alternados, de forma a manter a umidade do substrato em condições ótimas para as plantas.

### 3.4.5. Identificação de haploides por fenotipagem e anatomia foliar

Para a identificação de duplo haploides via anatomia foliar foram selecionados seis genótipos no estágio V6 (quatro plantas duplo haploides e dois falso-positivos) em cada um dos nove grupos de genótipos-fonte (Tabela 1). A diferenciação entre duplo haploides e falso-positivos foi realizada com base nas características morfoagronômicas (porte, ângulo foliar, coloração de caule e folhas eretas).

Após autofecundação das plantas por ocasião do florescimento, entre 55 a 70 dias após o plantio, e colheita de haploides putativos, confirmou-se a seleção preliminar dos duplo haploides amostrados por características morfoagronômicas: número de sementes/espiga e coloração das sementes. Desta forma, espigas com uma ou poucas sementes de coloração amarela confirmam tratar-se de uma planta duplo haploide, enquanto espigas com alta granação e presença de sementes com coloração branca e/ou presença de antocianina retratam falso-positivos.

De cada planta coletou-se amostra da quinta folha expandida (contando de baixo para cima), resultando em um total de 162 amostras, considerando os nove grupos de linhagens duplo-haploides.

Para padronização da coleta de amostras nas plantas selecionadas, na quinta folha de cada planta, mediu-se 3 cm no sentido da base à extremidade, retirando-se uma amostra retangular de 1 cm de folha, cortada no sentido transversal da parte mediana do limbo. Estas foram acondicionadas em tubos identificados contendo etanol 70%. Em seguida, os tubos foram transportados até o Laboratório de Biologia Molecular para a remoção total da clorofila da folha e obtenção das estimativas de tamanho e densidade dos estômatos. Essa remoção foi facilitada por quatro trocas de etanol 70%, a intervalos de 24 horas, feitas durante três dias.

Para capturar a imagem dos estômatos foi retirada uma sub-amostra retangular da amostra foliar, após remoção da clorofila, utilizando-se bisturi para corte do tecido no sentido da extremidade a nervura central. Em seguida, para evitar o ressecamento da sub-amostra, adicionou-se álcool 70% na lâmina de vidro, cobrindo-se a amostra com lamínula. As análises das lâminas ao microscópio foram efetuadas sem o uso de corantes.

A visualização dos estômatos foi efetuada com o uso de microscópio eletrônico estereoscópico modelo ZEISS Axio Zoom V16 na magnificação máxima (112x), com câmera acoplada, na área padrão 0.459 mm<sup>2</sup>, no modo campo claro, utilizando-se a região próxima à nervura central, na parte abaxial da folha na lente, e transmitindo-se a imagem para computador, para medição.

Para obter o tamanho dos estômatos foi adicionada uma escala de tamanho fixo do equipamento para aferição, sendo mensuradas a distância vertical (altura) e horizontal (largura) das extremidades das células guarda de cada estômato, totalizando, 10 estômatos/imagem, para cada um dos seis genótipos selecionados (quatro plantas duplo haploides e dois falso-positivos). Posteriormente, foi estimada a área de cada estômatos mediante aplicação da fórmula  $A = a \times b \times \pi$ , em que:  $a$  = raio menor;  $b$  = raio maior;  $\pi$  = valor de Pi referente a 3,1416. Na mesma área em que foram medidos os estômatos, efetuou-se a avaliação da densidade de estômatos por meio de contagem manual, em uma área padrão da imagem de  $0.459 \text{ mm}^2$ .

Estas informações foram cruzadas com os dados de densidade e área de estômatos obtidos nas avaliações, conforme protocolo preconizado por Souza et al. (2018), para definir pontos de corte para identificação de duplo haploides putativos e falsos-positivos.

#### **3.4.6. Análises estatísticas**

Para análise estatística foram considerados os dados de área e densidade de estômatos. A análise dos dados de área de estômatos foi processada por análise de variância, considerando um modelo inteiramente casualizado com nove tratamentos, referente ao número de grupos de linhagens duplo-haploides derivadas de diferentes genótipos-fonte. Em seguida, o efeito de grupos de linhagens DHs foi desdobrado em gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), tipo de genótipo (DH ou falso-positivo) e na interação entre estes dois efeitos (gerações x tipo). As médias obtidas foram avaliadas via teste de Scott-Knott a 5%. Por fim, as médias de área e densidade de estômatos foram comparadas entre DHs e FPs por meio do teste T para duas médias a 5%. Todas as análises foram efetuadas com auxílio do *software* SISVAR (Ferreira, 2019).

### **3.5. Resultados e Discussão**

Para área de estômatos houve efeito de grupos (Tabela 2), indicando diferença de comportamento dos genótipos avaliados em relação a esta característica. Efetuou-se também o desdobramento dos graus de liberdade de grupos para gerações, em que os genótipos-fonte foram convertidas em DHs ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), para o tipo de genótipo obtido (DH putativo ou falso-positivos) e para a interação entre estes dois fatores.

Não houve diferença significativa para área de estômatos entre os grupos em função da geração ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ) em que os genótipos DHs foram obtidos, denotando que o avanço de gerações não causa diferença entre os genótipos estudados para esta característica. O teste F evidenciou ainda diferenças significativas para tipo de grupo, indicando diferenças entre duplo

haploides e falso-positivos, corroborando a possibilidade de uso desta característica como diferenciador entre haploides e diploides (Choe et al. 2012, Souza et al. 2018).

**Tabela 2** – Resumo das análises de variância para área e densidade de estômatos, avaliados em plantas duplo haploides de milho oriundas de nove grupos distintos de duplo-haploides e médias de área e densidade de estômatos do desdobramento de interação Geração (F1, F2 e S1) x Tipo de genótipo (Duplo haploide ou falso-positivo)

FV	QM		QM	
	GI	Área	GI	Densidade
Grupos	8	704107,07**	8	621,60**
Geração <sup>1</sup>	2	75405,27	2	745,82*
Tipo <sup>2</sup>	1	4506177,40**	1	690,86*
Geração x Tipo	2	982123,63**	2	1195,60*
Tipo/Geração F <sub>1</sub>	1	5321735,77**	1	3003,97**
Tipo/Geração F <sub>2</sub>	1	713673,56**	1	70,53
Tipo/Geração S <sub>1</sub>	1	435015,32**	1	7,58
Erro	896	73686,27	77	160,41
CV (%)		33,07		26,06
Média (µm)		820,72		48,60
Mínimo (µm)		350,08		22
Máximo (µm)		2160,15		91
Gerações	Área		Densidade	
	Duplo Haploide	Falso-Positivo	Duplo Haploide	Falso-Positivo
F <sub>1</sub>	727,0581b	1057,642a	61a	37b
F <sub>2</sub>	768,0907b	894,7363a	43a	48a
S <sub>1</sub>	813,9886b	895,512a	48a	47a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F.

\*\* nível de significância a 1%; \* nível de significância a 5%.

CV = coeficiente de variação experimental.

<sup>1</sup> Geração: F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>

<sup>2</sup> Tipo: DH (duplo haploide); FP (falso-positivo).

Houve efeitos significativos para a interação entre gerações ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ) e tipos de genótipos, indicando que, independente da geração em que o DH foi obtido, é possível distinguir duplo haploides de milho de falsos positivos de maneira eficiente por meio da medição da área de estômatos (Tabela 2).

Para densidade de estômatos (números de estômatos em uma área de  $0,459\text{m}^2$ ) houve efeito significativo de genótipos, indicando diferenças no número de estômatos entre os tratamentos avaliados. O desdobramento dos graus de liberdade de grupo em gerações indicou diferença entre os duplo-haploides, evidenciando que a geração em que é obtida a linhagem DH pode interferir na expressão desta característica. Houve diferença entre tipos de genótipos, indicando que a densidade de estômatos também pode ser uma característica para a seleção de haploides, o que é corroborado por Choe et al. (2012). Entretanto, o desdobramento da interação gerações por tipos de genótipos demonstra que houve diferença de densidade de estômatos apenas para genótipos derivados da geração  $F_1$ , denotando um efeito de heterose para a expressão desta característica, possivelmente ocasionado pelos híbridos  $F_1$  falso-positivos (Tabela 2).

Os coeficientes de variação experimental foram de 33,07% e 26,06% para área e densidade de estômatos, respectivamente. Esses valores extrapolam a faixa padronizada para experimentos em laboratório, cuja condição ambiental é controlada (Pimentel-Gomes, 2009). Souza et al. (2018) avaliando progênies duplo haploides, haploides e diploides, apontaram coeficientes de variação de 12,33% e 10,41% para as características densidade de estômatos e comprimento da células-guarda, respectivamente, o que demonstra boa precisão experimental para as medições em diferentes tipos de genótipos avaliados. Entretanto, no experimento de Souza et al. (2018) foram avaliadas duas progênies para cada tipo de genótipo, enquanto no presente experimento foram avaliadas 16 progênies oriundas de diferentes genótipos-fonte, o que implica em maior variabilidade nos genótipos em avaliação. Em adição a este fato, foi detectada grande amplitude para área de estômatos ( $350,08$  a  $2160,15 \mu\text{m}$ ) e densidade de estômatos (22 a 91 estômatos/área de  $0,459\mu\text{m}^2$ ) (Tabela 2).

O desdobramento da interação tipo de genótipo em cada geração demonstra que, independente da geração em que foi efetuada a indução de haploidia ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ), a área estomática sempre tem valor menor em linhagens duplo haploides quando comparada com falso-positivos (Tabela 2), confirmando com o observado na Figura 1. No desdobramento da interação geração por tipo de genótipo, foi possível observar diferenças de classes de plantas duplo haploides e falso-positivos somente na geração  $F_1$  para densidade de estômatos (Tabela 2). Este resultado denota que a densidade de estômatos pode não ser uma característica ideal

para distinção entre DHs e FPs, uma vez que pode haver diferenças em progênies F<sub>1</sub>, possivelmente como efeito de heterose, mas que se dissiparia com o avanço de endogamia.. Com relação a área de estômatos, para estas gerações foi possível mensurar pelo teste F diferenças significativas para tipo de genótipos. Na geração F<sub>2</sub> obtiveram-se valores médios de área de estômatos 768,09 e 894,74, para duplo haploides e falso-positivos (Tabela 2). Na geração S<sub>1</sub> os valores médios obtidos para a mesma variável resposta foram 813,99, duplo haploides, e, 895,51, falso-positivos (Tabela 2).

Trindade et al. (2019) estudaram efeitos de avanço de gerações para alguns genótipos na identificação de haploides. Os mesmos autores concluíram que não é possível determinar um padrão de taxas de indução de haploides entre gerações. Com o desdobramento da interação geração por tipo de genótipo é possível validar indução de haploidia entre as gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>, em genótipos-fonte de grupos heteróticos Flint e Dent utilizando a análise anatômica dos estômatos.

Para a densidade de estômatos, a geração F<sub>1</sub> apresentou maior frequência de plantas duplo haploides (Tabela 2). As gerações F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub> não apresentaram diferenças significativas entre plantas duplo haploide e falso-positivos, e, não houve a distinguibilidade dos tipos de genótipos dentro destas gerações. Para a área de estômatos obteve-se diferenciação de tipos de genótipos nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>. Na geração F<sub>1</sub> houve maior valor de área de falso-positivos cuja estimativa foi de 1057,64, e, nas gerações F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub> houve menor valor de área de falso-positivos (Tabela 2). Para esta característica as frequências de plantas duplo haploides foram idênticas nas gerações estudadas.

Em termos de valores médios de área estômatos verificou-se a formação de três grupos, pelo teste de Scott-Knott, em que os genótipos G8S1 e G9F1 apresentaram os valores mais elevados (1084,16 e 965,38  $\mu\text{m}$ , respectivamente – Tabela 3). Com relação ao número de genótipos componentes dos grupos, o primeiro e o segundo grupo foram formados por 5 genótipos, respectivamente, enquanto o terceiro grupo, com menores valores de médias, foi formado por seis genótipos.

Para número de estômatos, foram formados 2 grupos (Tabela 3), em que o grupo de maiores médias foi formado por 11 genótipos, sendo os genótipos G7F1, G8S1 e G9S1, os que expressaram os valores mais elevados de média (59,3, 58,8 e 59,2/  $112 \times 0,459 \text{ mm}^2$ , respectivamente). Os dados de agrupamento pelo teste de Scott-Knott indicaram maior formação de grupos e variabilidade nos valores estimados para a área de estômatos, em comparação com a densidade de estômatos.

Em geral, não se observou relação entre área e número de estômatos ou gerações, mas

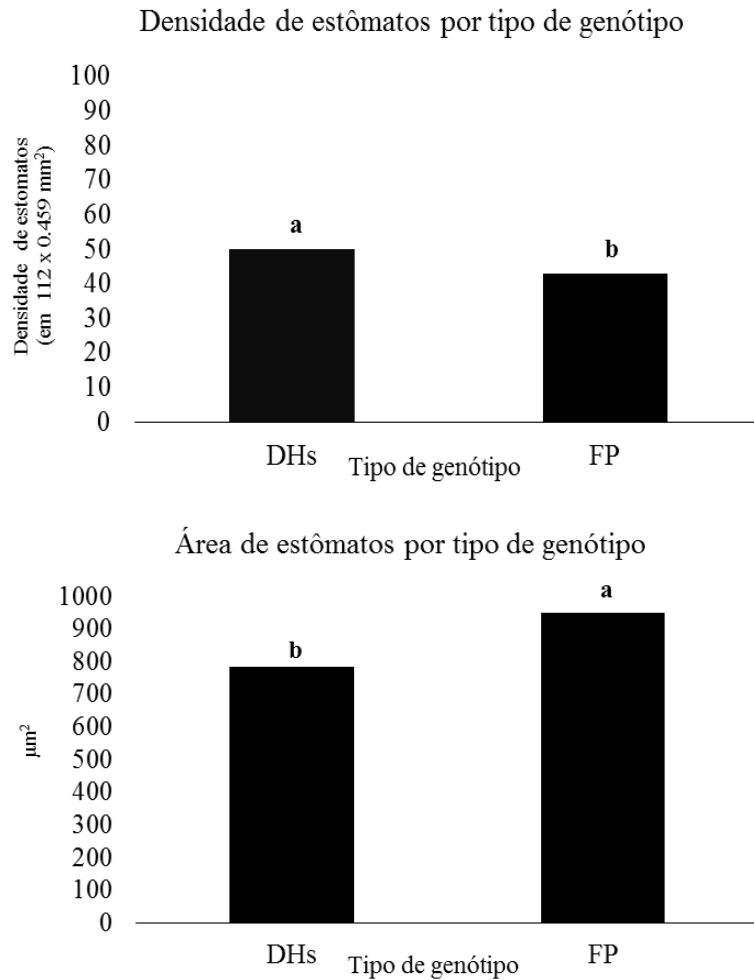
os dados obtidos corroboram que os valores destas características sofrem grande influência do genótipo.

**Tabela 3** – Médias de área e de densidade de estômatos de linhagens duplo-haploides de milho oriundas de nove genótipos-fonte com diferentes gerações

Genótipo	Área de estômatos ( $\mu\text{m}^2$ )		Densidade de estômatos (em 112 x 0.459 mm <sup>2</sup> )	
G2F <sub>1</sub>	655,07	C	53,6	A
G2S <sub>1</sub>	796,24	B	49,7	A
G2S <sub>1</sub>	735,38	C	47,4	A
G4F <sub>2</sub>	710,71	C	33,3	B
G4S <sub>1</sub>	943,32	A	31,5	B
G5F <sub>2</sub>	876,65	A	50,3	A
G5S <sub>1</sub>	610,14	C	53,7	A
G6F <sub>1</sub>	743,67	C	51,7	A
G6F <sub>2</sub>	680,87	C	42,7	B
G7F <sub>1</sub>	828,62	B	59,3	A
G8F <sub>1</sub>	832,85	B	58,8	A
G8F <sub>2</sub>	865,86	B	48,3	A
G8S <sub>1</sub>	1084,16	A	51,2	A
G9F <sub>1</sub>	965,38	A	47,2	A
G9S <sub>1</sub>	798,77	B	59,2	A
G12S <sub>1</sub>	892,07	A	42,0	B

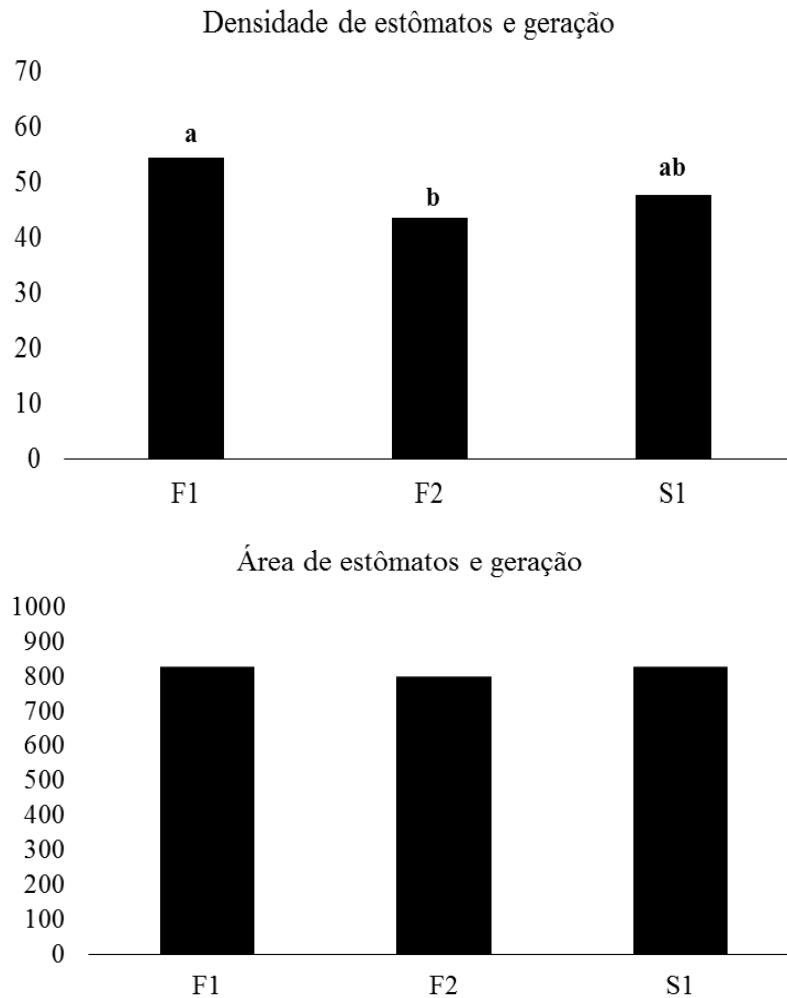
Médias seguidas da mesma letra são pertencentes ao mesmo agrupamento, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Por outro lado, percebe-se que o tipo de genótipo pode ser um fator de diferenciação (Figura 1). Com relação a densidade de estômatos, verifica-se que linhagens duplo haploides apresentaram maiores médias para esta característica, com diferença de até dez estômatos entre uma classe e outra. Por sua vez, a área de estômatos foi mais reduzida em linhagens duplo haploides do que em indivíduos diploides (falsos-positivos), denotando um efeito compensatório em que a menor área de estômatos é balanceada pela maior densidade dos mesmos por folhas.



**Figura 1** – Médias de densidade e área de estômatos por tipo de genótipos (DH = Duplo haploide e FP= Falso-positivo) em linhagens duplo haploides de milho oriundas de nove genótipos-fonte com diferentes gerações. Médias, representadas por barras, seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5%.

Houve efeito de geração para densidade de estômatos (Figura 2). Linhagens duplo haploides na geração F<sub>1</sub> apresentaram valores médios superiores, em comparação as gerações F<sub>2</sub> que apresentaram valores inferiores e S<sub>1</sub>, com valores intermediários. No caso da área de estômatos, não foi observada diferenças em qualquer uma das gerações em que foi induzida a haploidia (Figura 2). Esses resultados confirmam os dados da análise de variância (Tabela 2), indicando que a geração em que é induzida a haploidia não causa efeito de variação na área estomática. Contudo, a variação na densidade de estômatos em função da geração em que é feita a indução necessita de análises adicionais para sua completa compreensão.



**Figura 2** – Médias de densidade e área de estômatos por geração (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>) de linhagens duplo haploides de milho oriundas de nove genótipos-fonte com diferentes gerações

A densidade e área de estômatos são características oriundas da anatomia foliar. Sendo assim, a anatomia foliar é uma ferramenta que auxilia na seleção de tipos de genótipos, plantas duplo haploides e falso-positivos. Souza et al. (2018) concluíram que a aferição das características comprimento de células guardas de estômatos e densidade de estômatos seria uma metodologia eficiente e não destrutiva para selecionar tipos de genótipos. Ainda ressaltaram que a implementação da técnica aumenta a eficiência na produção de duplo haploides permitindo distinguir diploides (falso-positivos) de plantas haploides e duplo haploides em um estágio inicial.

A indução de haploidia pode ser realizada em qualquer tipo de população e geração. Na cultura do milho, a tecnologia de linhagens duplo haploides tem sido empregada na obtenção de linhagens a partir de híbridos F<sub>1</sub> (Trindade et al. 2019), selecionados conforme os objetivos do programa. Assim, os resultados obtidos para densidade e área estomática na geração F<sub>1</sub> para

tipo de genótipos, duplo haploides e falso-positivos, validam a obtenção de linhagens haploides nesta geração.

Na Tabela 4, são apresentados os valores médios de área e densidade de estômatos para cada uma das 16 linhagens dos grupos Flint e Dent avaliados, comparando-se para cada genótipo os indivíduos duplo haploides e falso-positivos. Para área de estômatos, com exceção dos duplo-haploides derivados dos genótipos-fonte G2S<sub>1</sub>, G3S<sub>1</sub>, G4F<sub>2</sub>, G8F<sub>2</sub> e G9F<sub>1</sub>, houve diferenças significativas entre linhagens duplo haploides e falso-positivos, sendo que, com exceção das linhagens DHs derivadas do genótipo-fonte G6F<sub>1</sub>, observou-se menor área estomática em falso-positivos (diploides) que em DHs (Tabela 4). Por outro lado, com relação a densidade de estômatos, houve diferenças significativas apenas para os genótipos G3S<sub>1</sub>, G6F<sub>2</sub>, G8F<sub>1</sub> e G9S<sub>1</sub>, não houve diferenças significativas entre DHs e falso-positivos. Percebe-se ainda que para a maior parte dos genótipos-fonte avaliadas, há uma tendência de maior densidade estomática (Tabela 5).

Os resultados obtidos indicam que a área estomática é uma característica de maior estabilidade para a distinção entre duplo haploides e falso-positivos, enquanto a densidade estomática, embora apresente tendência de ser maior em DHs que em falso-positivos, pode não distinguir significativamente DHs de falso-positivos. Importa ainda destacar a tendência de maior número de estômatos com menor área nos DHs de milho avaliados no experimento, indicando um efeito de plantas, estando associados diretamente a processos fotossintéticos (Melkonian et al. 2004), indicando que a menor área estomática, que prejudicaria as trocas gasosas, é compensada pela maior densidade estomática. Souza et al. (2018) avaliando os tipos de genótipos (haploides, duplo haploides e diploides) verificaram que os diploides, falso-positivos, formaram um grupo distinto dos haploides e duplo haploides. Os mesmos pesquisadores ressaltaram que os diploides apresentaram valores intermediários para a densidade de estômatos.

**Tabela 4** – Comparação entre médias de área e densidade de estômatos de linhagens duplo haploides e falso-positivos derivados de genótipos-fonte em diferentes gerações

Linhagens	Área de estômatos				Densidade de estômatos			
	DH	FP	Teste t	Significância	DH	FP	Teste t	Significância
G2F <sub>1</sub>	642,7	704,4	0,0232	*	55,3	47,0	0,1459	ns
G2S <sub>1</sub>	829,4	729,9	0,0675	ns	47,6	60,0	0,7625	ns
G3S <sub>1</sub>	734,9	737,3	0,9662	ns	49,3	40,0	0,0473	*
G4F <sub>2</sub>	704,0	744,0	0,1685	ns	31,4	43,0	0,9250	ns
G4S <sub>1</sub>	896,9	1036,2	0,0478	*	33,0	24,0	0,0793	ns
G5F <sub>2</sub>	778,9	1072,2	0,0038	**	51,6	44,0	0,1499	ns
G5S <sub>1</sub>	589,8	650,8	0,0120	**	49,3	58,0	0,1165	ns
G6F <sub>1</sub>	748,8	545,0	0,0003	**	54,0	47,0	0,1000	ns
G6F <sub>2</sub>	606,5	1018,0	0,0000	**	43,6	38,0	0,0309	*
G7F <sub>1</sub>	734,4	1017,0	0,0000	**	69,3	39,5	0,1001	ns
G8F <sub>1</sub>	587,3	1323,9	0,0000	**	74,0	28,5	0,0130	*
G8F <sub>2</sub>	866,4	864,8	0,9702	ns	46,5	52,0	0,7457	ns
G8S <sub>1</sub>	884,4	1483,6	0,0000	**	59,5	34,5	0,1415	ns
G9F <sub>1</sub>	943,7	1008,7	0,4933	ns	49,6	35,0	0,1172	ns
G9S <sub>1</sub>	596,1	1204,2	0,0000	**	63,6	37,0	0,0296	*
G12S <sub>1</sub>	736,7	1202,9	0,0000	**	44,0	32,0	0,0896	ns

\*,\*\* significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

A anatomia foliar tem sido alvo de estudos para diferentes espécies, pois por meio desta metodologia é possível associar tamanho de células-guarda de estômatos e níveis de ploidia. Estudos recentes em pimenta doce comprovaram que o comprimento médio do estômato foi maior em diploide  $35,2 \pm 2,5 \mu\text{m}$ , e, menor em haploide  $26,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$  (Shrestina e Kang 2016). Przywara et al. (1988), estudando a espécie *Actinidia deliciosa*, quiuí, concluíram correlação entre comprimento das células guarda dos estômatos e a distinção de plantas haploides e diploides ( $24 \pm 1,7 \mu\text{m}$  e  $33 \pm 2,4 \mu\text{m}$ , respectivamente).

Em milho subtropical, Choe et al. (2012) verificaram que o comprimento médio das células-guarda dos estômatos é uma característica eficiente para diferenciação de plantas haploides e diploides. Por sua vez, Sekiya et al. (2020), avaliando amostras de folhas de milho coletadas nos estádios V2/V3, verificaram que a morfometria dos estômatos é uma metodologia eficiente para distinção entre haploides e falso-positivos em milho doce. O presente trabalho

confirma a eficiência da avaliação da área estomática para seleção de haploides. Porém, embora haja um efeito compensatório entre área e densidade estomática, esta última característica não apresentou eficiência suficiente, quando se avaliou cada genótipo visando a diferenciação de haploides putativos.

### 3.6. Conclusões

A área estomática é uma característica eficiente para distinção de duplo haploides e falso-positivos em estádios precoces de desenvolvimento. A densidade estomática, com exceção da geração F<sub>1</sub>, não apresentou diferenças significativas entre DHs e falso-positivos para uso na seleção de haploides putativos, embora se verifique menores médias de densidade estomática em diploides que em duplo-haploides, em termos de valores absolutos.

A geração em que é feita a indução de haploidia não interfere na anatomia foliar de duplo haploides de falso-positivos, permitindo o uso da área e da densidade estomática para distinção de haploides, independente da geração do genótipo-fonte.

### 3.7. Agradecimentos

A Prof<sup>a</sup> Denise Dias, ao Prof. Maicon Nardino, ao Dr. Paulo Evaristo, e a Meire Alves pelo apoio na análise e discussão dos dados, a Embrapa Milho e Sorgo, ao CNPq, a Capes e a Fapemig pelo apoio financeiro para a realização do presente trabalho.

### 3.8. Referências

- AMARAL FILHO, J. P.R.D.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J.C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.3, p.467-473, 2005.
- CHAIKAM, V., MOLENAAR, W., MELCHINGER, A. E., BODDUPALLI, P. M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics**, v.132, p.3227–3243, 2019
- CHAIKAM, V.; LOPEZ, L.A.; MARTINEZ, L.; BURGUENO, J.; BODDUPALLI, P.M. Identification of in vivo induced maternal haploids in maize using seedling traits. **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 177, 2017.

CHAIKAM, V.; MARTINEZ, L.; MELCHINGER, A.E.; SCHPPRACK, W.; BODDUPALLI, P.M. Development and validation of red root marker-based haploid inducers in maize. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p. 1678-1688, 2016.

CHAIKAM, V.; NAIR, S. K.; MARTINEZ, R. B. L.; TEJOMURTULA, J.; BODDUPALLI, P. M. Analysis of effectiveness of *R1-nj* anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of *R1-nj* expression. **Theoretical Applied Genetics**, v. 128, n. 1, p. 159-171, 2015.

CHASE, S. S. Production of homozygous diploids of maize from monoploids. **Agronomy Journal**, v. 44, n. 5, p. 263-267, 1952

CHOE, E.; CARBONERO, C. H.; MULVANEY, K.; RAYBURN, A. L.; MUMM, R. H. Improving in vivo maize doubled haploid production efficiency through early detection of false positives. **Plant Breeding**, v. 131, n. 3, p. 399-401, 2012.

COUTO, E.G.D.O.; DAVIDE, L.M.C.; BUSTAMANTE, F.D.O.; PINHO, R.G.V.; SILVA, T.N. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 25-31, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

HAN, Y.; GU, Y.; ZHANG, A. C.; LO, Y. H. Imaging technologies for flow cytometry. **Lab on a Chip**, The royal society of chemistry, v. 16, n. 24, p. 4639-4647, 2016.

LIU, Z.; WANG, Y.; REN, J.; MEI, M.; FREI, U. K.; TRAMPE, B.; LÜBBERSTEDT, T.; ORTIZ, R. Maize doubled haploids. **Plant Breed Rev**, v. 40, p. 123-166, 2016

MARCONDES, M. M. Indução de haploidia e estratégias para a identificação de haploides em milho subtropical. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava – PR, 122f. 2018.

MELCHINGER, A.E.; SCHPPRACK, W.; FRIEDRICH UTZ, H.; MIRDITA, V. In vivo haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. **Crop Science**, v. 54, n. 4, p. 1497-1504, 2014.

MELCHINGER, A.E.; TECHNOW, F.; DHILLON, B.S. Gene stacking strategies with doubled haploids derived from biparental crosses: theory and simulations assuming a finite number of loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, n. 8, p. 1269-1279, 2011.

MELKONIAN, J.; YU, L.; SETTER, T. L. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1751-1760, 2004

NANDA, D.K. E CHASE, S.S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v.6, n.2, p.213–215, 1966.

PEREIRA FILHO, I.A. E BORGHI, E. Mercado de sementes de milho no Brasil: safra 2016/2017. **Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2016.

PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. M. C.; COUTO, E. G. O.; SILVA, T. N.; RAMANHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. Duplo haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** v.10, n.1, p.1-16, 2011.

PIMENTEL-GOMES, F. (2009). **Curso de Estatística Experimental**. 15 ed. Piracicaba: ESALQ, 451p.

PRASANNA, B.M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. (eds). (2012). **Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice**. Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p.

PRZYWARA, L; PANDEY, K. K.; SANDERS, P. M. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. **Newland Journal of Botany**, v. 26, n. 2, p. 179-182, 1988.

RIBEIRO, C.B.; PEREIRA, F.C.; NOBREGA FILHO, L.; REZENDE, B.A.; DIAS, K.O.G.; BRAZ, G.T.; RUY, M.C.; SILVA, M.B.; CENZI, G.; TECHIO, V.H.; SOUZA, J.C. Haploid identification using tropicalized haploid inducer progênies in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 16-23, 2018.

SEKIYA, A., PESTANA, J. K., SILVA, M. G. B. D., KRAUSE, M. D., SILVA, C. R. M. D., & FERREIRA, J. M. Haploid induction in tropical supersweet corn and ploidy determination at the seedling stage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, 2020.

SHRESTINA, S. L.; KANG, W. H. Stomato length and density as an indicator of ploidy level in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Research Journal of Recent Sciences**, v.5, p. 4-10, 2016.

SMELSER, A.; BLANCO, M.; LUBBERSTEDT, T.; SCHECHERT, A.; VANOUS, A.; GARDNER, C. Weighing in on a method to discriminate maize haploid from hybrid seed. **Plant Breeding**, v. 134, n. 3, p. 283-285, 2015.

de SOUZA, I. R. P., TRINDADE, R. D. S., de VASCONCELOS, M. J. V., de PAULA, A. L. S. P., GUIMARAES, P. D. O., GUIMARAES, L., & ALVES, M. D. C. Estratégias para identificação de falso-positivos no processo de obtenção de duplo-haploides em milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2018.

TRINDADE, R. D. S., GUIMARAES, L., de SOUZA, I. R. P., GUIMARAES, P. D. O., da SILVA, A. C. A., MARIZ, B., & RIBEIRO, M. Efeito do avanço de gerações na indução de haploidia em populações-fonte de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2019.

WANG, H.; DONG, B.; JIANG, J.; FANG, W.; GUAN, Z.; LIAO, Y.; CHEN, S.; CHEN, F. Characterization of *in vitro* haploid and doubled haploid *Chrysanthemum morifolium* plants via unfertilized ovule culture for phenotypical traits and DNA methylation pattern. **Frontiers in Plant Science: Crop Science and Horticulture**, v.5, p.738, 2014.

WU, P.; REN, J.; LI, L.; CHEN, S. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by *in vivo* haploid induction. **Euphytica**, v.200, n.1, p.127- 138, 2014.

XU, Y.; LI, P.; ZOU, C.; LU, Y.; XIE, C.; ZHANG, X.; PRASANNA, M. B.; OLSEN, M. S. Enhancing genetic gain in the era of molecular breeding. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 11, p. 2641-2666, 2017.

ZHANG, W.; WANG, K.; LIN, Z.S.; DU, L.P.; MA, H.L.; XIAO, L.L.; YE, X.G. Production and identification of haploid dwarf male sterile wheat plants induced by corn inducer. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 26, 2014.

## 4. CAPÍTULO 2

### USO DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E MÉTODOS DE CLASSIFICAÇÃO SUPERVISIONADA NA IDENTIFICAÇÃO DE HAPLOIDES EM SEMENTES E PLANTAS DE MILHO

#### 4.1. Resumo

A identificação eficiente de sementes haploides e plantas haploides de milho auxilia na obtenção de linhagens para o desenvolvimento de cultivares. Atualmente, a classificação de sementes haploides é pela análise visual baseada no marcador genético *R1-navajo*. Em campo, plantas haploides e duplo-haploides podem ser identificadas por seu desenvolvimento lento e pela sua arquitetura foliar, com folhas eretas e mais estreitas, em comparação com plantas diploides. No entanto, estes métodos de classificação demandam espaço, recursos e tempo. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) associada a métodos de calibração multivariados é uma alternativa para identificação de sementes e plantas de forma rápida e precisa. O presente trabalho teve como objetivo classificar por NIR, sementes haploides e diploides e diferenciar plantas haploides, duplo-haploides e diploides em diferentes genótipos-fonte. Para isto, em um primeiro experimento foram analisadas sementes de milho haploides e diploides de quatro genótipos-fonte. Em outro experimento, foram avaliadas e diferenciadas plantas diploides, haploides e duplo-haploides de 34 genótipos-fonte. Em ambos os experimentos, a avaliação visual foi utilizada para a classificação de sementes haploides e diploides, e plantas haploides, duplo-haploides e diploides. Foram coletados dados espectrais de todas as amostras de sementes e todas as amostras foliares utilizando o aparelho MicroNIR portátil. Em seguida, os dados foram pré-processados por análise de componentes principais (PCA), seguindo-se de análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A utilização do MicroNIR portátil, associado ao método PLS-DA, possibilitou a classificação de sementes haploides e diploides, plantas haploides, duplo-haploides e diploides. O método é rápido, simples, não destrutivo e confiável para seleção de haploides em milho, em comparação ao método visual.

Palavras-chaves: *Zea mays*, análises multivariadas, tecnologia de duplo-haploides.

## 4.2. Abstract

The efficient identification of haploid seeds and haploid corn plants helps to obtain lines for the development of cultivars. Currently, the classification of haploid seeds is by visual analysis based on the *R1-navajo* genetic marker. In the field, haploid and double-haploid plants can be identified by their slow development and by their leaf architecture, with erect and narrower leaves, compared to diploid plants. However, these classification methods demand space, resources and time. Near infrared spectroscopy (NIR) associated with multivariate calibration methods is an alternative for quickly and accurately identifying seeds and plants. The present work aimed to classify haploid and diploid seeds by NIR and differentiate haploid, double-haploid and diploid plants in different source genotypes. For this, in a first experiment, haploid and diploid maize seeds of four source genotypes were analyzed. In another experiment, diploid, haploid and double-haploid plants from 34 source genotypes were evaluated and differentiated. In both experiments, visual evaluation was used to classify haploid and diploid seeds, and haploid, double-haploid and diploid plants. Spectral data were collected from all seed samples and all leaf samples using the portable MicroNIR device. Then, the data were pre-processed by principal component analysis (PCA), followed by discriminant analysis by partial least squares (PLS-DA). The use of portable MicroNIR, associated with the PLS-DA method, enabled the classification of haploid and diploid seeds, haploid, double-haploid and diploid plants. The method is fast, simple, non-destructive and reliable for haploid selection in corn, compared to the visual method.

Key words: *Zea mays*, multivariate analysis, doubled-haploid technology.

### 4.3. Introdução

A tecnologia de duplo-haploides (DHs), utilizada para reduzir o tempo para obtenção de linhagens homozigotas para até três gerações (Prasanna et al. 2012), tem sido uma ferramenta importante em programas de melhoramento de milho (Yu et al. 2018), reduzindo o tempo de desenvolvimento de cultivares.

O método mais comum para obtenção de haploides é a indução *in vivo* (Qu et al. 2021) e a taxa de indução é de aproximadamente 10%. Assim, sementes diploides, e com inibição da expressão do marcador *RI-navajo* (*RI-nj*), também estão contidas na espiga. É necessário a classificação de sementes para selecionar as que têm potencial para derivar linhagens duplo-haploides (Yu et al. 2018, Cui et al. 2019). Desta forma, a eficiência da tecnologia de linhagens duplo-haploides depende de uma classificação precisa e rápida.

Usualmente a seleção de sementes haploides é baseada em análise visual por meio do marcador genético *RI-nj*, que codifica a pigmentação púrpura no endosperma e embrião das sementes (Chase, 1952, Nanda e Chase, 1966). No entanto, a expressão do gene *RI-nj* pode variar entre diferentes genótipos, o que reduz a precisão deste método (Cui et al. 2019).

Após transplântio no campo, a identificação de plantas haploides e duplo-haploides (DHs) é baseada em características morfológicas, como o ciclo e arquitetura foliar. Plantas DHs possuem crescimento mais lento e folhas eretas e mais estreitas, em comparação com as diploides, além da diferença de altura de planta e inserção de espiga (Chase, 1952; Prigge e Melchinger, 2012; Wu et al. 2014).

Entretanto, a seleção de sementes e plantas haploides e DHs demanda tempo, recursos e espaço físico, o que implica em maiores custos financeiros e de tempo para sua execução. Dessa forma, são necessárias alternativas para identificação de haploides em sementes e plantas que proporcionem precisão, e economia de tempo e recursos financeiros.

Técnicas espectroscópicas, como a ressonância magnética nuclear (Nuclear Magnetic Resonance, em inglês - NMR) (Wang et al. 2016) e o infravermelho próximo (Near Infrared, em inglês - NIR) (Jones et al. 2012) são alternativas que podem ser utilizadas para auxiliar na identificação de sementes haploides. Entre essas duas técnicas, a NMR possui algumas limitações, como dificuldade de transporte, peso das amostras, e custo elevado.

O NIR é uma alternativa mais adequada uma vez que há disponibilidade de equipamentos portáteis que podem ser precisos para análise de sementes e plantas (Wang et al. 2016, Ikeogu et al. 2017, Pereira et al. 2018, Wiedemair et al. 2018, Cui et al. 2019).

A técnica de infravermelho próximo utiliza a radiação eletromagnética com frequência de

comprimento de onda 750-2500 nm. Quando associada a métodos de calibração multivariada permite avaliação qualitativa e quantitativa de forma rápida, não-destrutiva e sem a utilização de reagentes (Cui et al. 2019). As bandas de absorção de luz no NIR são referentes às vibrações das ligações dos grupos funcionais C-H, N-H, S-H e O-H (Ghosh et al. 2016, Pan et al. 2013). Assim, as informações dos dados espectrais das amostras correspondem a compostos orgânicos como, por exemplo, água, proteínas, carboidratos e lipídeos. Estes são utilizados para identificar as diferentes propriedades dos materiais analisados, ou quantificar os constituintes de uma matriz de interesse agrícola (Genisheva et al. 2018, Peng e Zhang, 2010; Tsenkova et al. 1999, Wimonsiri et al. 2017, Wu et al. 2008, Liu et al. 2018, Yang et al. 2018). O uso do NIR tem se expandido para vários temas e culturas, com muitas aplicações na cultura do milho (Berardo et al. 2009, Simeone et al. 2018, Wakholi et al. 2018).

A diferença de composição orgânica da matéria influencia na quantidade de luz absorvida e resulta em diferentes bandas de absorção (Cui et al. 2019), que permitem a identificação de um genótipo. Nas sementes haploides, as bandas de absorção podem ser influenciadas pela luz, umidade, temperatura, instrumento de coleta e pela própria semente (Zhou et al. 2007). Dessa forma, para a identificação do material é necessário realizar a construção de modelos matemáticos que extraiam o máximo de informações dos dados espectrais e eliminem os ruídos. Na literatura estão descritos alguns trabalhos utilizando a espectroscopia NIR e métodos de calibração multivariada não lineares para identificação de haploides em milho (Hong et al. 2016, Li et al. 2018, Yu et al. 2018).

Contudo, ainda não foi utilizada a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) como método alternativo para a seleção de sementes haploides de milho, e para distinção entre plantas haploides, duplo-haploides e diploides de milho. O método qualitativo SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy* - modelagem independente por analogia de classe) (Jones et al. 2012) pode ser utilizado para identificar os genótipos e as classes haploides e diploides de acordo com seus espectros. A análise SIMCA é o método mais representativo de modelagem de classe. Este método consiste em modelar cada classe individualmente, não extraindo informações das demais classes (Sena e Almeida et al. 2018). No entanto, na literatura quimiométrica o método discriminante PLS-DA tem sido mais comum. Pelo método discriminante PLS-DA é possível definir um ou mais delimitadores entre duas ou mais classes (Sena e Almeida et al. 2018).

O objetivo do presente estudo foi classificar, com o uso do NIR e aplicação do método discriminante PLS-DA sobre os dados espectrais, sementes haploides e diploides derivadas de

diferentes genótipos-fonte, com base em amostras de sementes, e; distinguir plantas haploides, duplo-haploides e diploides, obtidas também de diferentes genótipos-fonte, com base em amostras foliares.

#### **4.4. Material e Métodos**

##### **4.4.1. Local e data**

Os experimentos foram conduzidos em áreas experimentais, casa de vegetação e laboratório, na Embrapa Milho e Sorgo (lat. 19° 28' 4" Sul, long. 44° 14' 52" Oeste, e alt. 751 m), em Sete Lagoas, Minas Gerais, entre novembro de 2019 e março de 2020. As análises das amostras de sementes foram realizadas em novembro de 2019 e amostras foliares em março de 2020 nos laboratórios da Embrapa Milho e Sorgo.

Todos os materiais vegetais avaliados nos experimentos (sementes haploides e diploides, e plantas haploides, diploides e duplo-haploides) foram obtidas de campos de indução de haploidia, contendo genótipos-fonte dos grupos heteróticos Flint e Dent cruzados com o híbrido indutor de haploidia (TAIL1 x TAIL2), em fileiras intercaladas na proporção 1:1. No momento da colheita houve a identificação de cada genótipo-fonte, com posterior classificação de sementes e obtenção de DHs via duplicação cromossômica.

Neste trabalho foram realizadas duas avaliações para identificação de haploides via infravermelho próximo (NIR): Identificação de haploides por análise de sementes de milho; e, Identificação de plantas haploides, duplo-haploides e diploides via avaliação de amostras de folhas.

##### **4.4.2. Identificação de haploides por análise de sementes de milho via NIR**

Neste experimento, realizado em novembro de 2019, foram avaliadas sementes de milho haploides e diploides de quatro genótipos-fonte G2F<sub>1</sub>, G3F<sub>1</sub>, G4F<sub>1</sub> e G7F<sub>1</sub>. Os genótipos G2F<sub>1</sub>, G3F<sub>1</sub>, G4F<sub>1</sub> pertencem ao grupo heterótico Flint e G7F<sub>1</sub> é do grupo Dent. Foram selecionadas 139 sementes de milho de cada genótipo-fonte, sendo 69 sementes haploides e 70 sementes diploides. As sementes foram classificadas visualmente como haploides ou diploides em virtude da pigmentação púrpura condicionada pela presença do marcador genético, no caso, o gene *R1-navajo*. As sementes que apresentavam pigmentação púrpura no endosperma e ausência da pigmentação no embrião foram selecionadas como sementes haploides, e, as sementes diploides, com pigmentação púrpura no endosperma e embrião.

Os espectros de absorvância foram obtidos a partir de cada semente, com o embrião voltado para a lente do aparelho, na região do infravermelho próximo (750 nm a 2500 nm), utilizando um equipamento MicroNIR, modelo 1700 (JDSU, Flawil, Switzerland), equipado com detector de InGaAs (Arseneto de índio e gálio). A face da semente em que o embrião fica mais evidente foi escolhida, uma vez que, a pigmentação púrpura que diferencia semente haploide de diploide está contida no embrião e endosperma.

O equipamento foi calibrado utilizando padrão de Spectralon®. Os espectros das sementes foram obtidos em triplicata, na região de 900 a 1700 nm com resolução 12,5 nm, tempo de medida 0,25 segundos. Eles foram coletados em ambiente climatizado, à temperatura de  $23 \pm 2$  °C e os espectros dos dois tipos de sementes: haploides e diploides, obtidos de forma aleatória.

Os dados espectrais foram analisados utilizando o software The Unscrambler versão 10.4 (CAMO Software Inc., Norway). Diferentes pré-processamentos foram aplicados às variáveis, comparativamente. No caso, para corrigir os efeitos de espalhamento da luz e deslocamentos de linha de base, os espectros foram pré-processados utilizando a variação normal padrão - SNV (*Standard Normal Variate*) e primeira derivada Savitzky-Golay. Os dados também foram centrados na média. Para a construção dos modelos foi realizado inicialmente uma análise de PCA (*Principal Component Analysis*) para a verificação da variância amostral.

Em seguida, utilizou-se o algoritmo Kennard-Stone (Kennard e Stone, 1969) para a seleção do conjunto de amostras de treinamento e teste. Dessa forma, foram adotados dois conjuntos, um de treinamento com 2/3 das amostras e outro de teste contendo 1/3 das amostras. Os dados espectrais das amostras foram processados utilizando o algoritmo Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), que é um método de classificação supervisionado que maximiza a relação entre as variáveis dependente e os escores, além de reduzir a dimensionalidade das variáveis originais, corrigindo o problema encontrado em matrizes singulares com posto incompleto. A análise PLS-DA é uma variação do algoritmo de regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS), método de calibração inversa que busca correlacionar à resposta instrumental (matriz **X**) com um vetor **y** de concentrações. No caso do PLS-DA a diferença está no fato de que o vetor **y** conterà valores da classe à qual a amostra pertence (Barker e Rayens, 2003). Nos modelos PLS-DA, o valor de classe -1 foi atribuído às amostras de treinamento pertencentes às sementes e plantas que estavam sendo discriminadas (haploide). As sementes haploides possuíam pigmentação púrpura no endosperma e ausência de pigmentação no embrião. E, as plantas haploides, apresentavam porte reduzido e folhas estreitas.

O valor de classe 1 foi atribuído às amostras de treinamento das demais sementes e plantas (diploides). As sementes diploides possuíam pigmentação púrpura do endosperma e embrião. Já as plantas diploides apresentavam maior vigor no porte e folhas largas. O número de variáveis latentes (VL) foi escolhido baseado no menor erro de classificação na validação cruzada. A validação cruzada foi realizada utilizando o método randômico com subconjuntos de cinco amostras. Outro critério importante na construção do modelo PLS-DA é a detecção de amostras anômalas (*outliers*). Essa detecção foi baseada na análise dos gráficos de resíduos espectrais Q e de T<sup>2</sup> Hotelling's, ao nível de confiança 95%. Para avaliar a qualidade e eficiência do modelo de classificação desenvolvido foram analisados os seguintes parâmetros de mérito (conforme descrito por Botelho et al., 2015): taxas de falso positivo (TFP), de falso negativo (TFN), de sensibilidade (SEN), de especificidade (ESPEC), e de eficiência (TEF) em %, raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSEC) (*Root Mean Squared Error of Calibration*), RMSECV (*Root Mean Squared Error of Cross Validation*), raiz quadrada do erro médio de predição (RMSEP) (*Root Mean Squared Error of Prediction*) e coeficiente de determinação para o conjunto de treinamento e teste (R<sup>2</sup>).

A taxa de falsos positivos (TFP) representa o percentual de amostras que apresentaram erros falsos positivos. É calculada como a relação entre o número absoluto de falsos positivos (FP) e a soma do número absoluto de erros falsos positivos (FP) e verdadeiros negativos (VN), multiplicada por 100, representada pela equação:

$$TFP = FP / (FP + VN) * 100 \quad (1)$$

A taxa de falsos negativos (TFN) representa o percentual de amostras que apresentou erros falso negativos, sendo calculada como a relação entre o número absoluto de falsos negativos (FN) e a soma do número absoluto de erros falsos negativos (FN) e verdadeiros positivos (VP) multiplicada por 100, representada pela equação:

$$TFN = FN / (FN + VP) * 100 \quad (2)$$

A especificidade (ESPEC) representa o percentual de amostras pertencentes às outras classes (y=-1) que foram identificadas como pertencentes a essas classes. Essa figura de mérito é calculada pela razão entre o número absoluto de verdadeiros negativos (VN) e a soma do número absoluto de verdadeiros negativos (VN) e dos erros falso positivos (FP) multiplicado por 100, representada pela equação:

$$ESPEC = VN / (VN + FP) * 100 \quad (3)$$

A sensibilidade (SEN) representa o percentual de amostras pertencentes à classe discriminada que foram identificados como sendo dessa classe. Portanto, sendo calculada como a razão entre o número absoluto de verdadeiros positivos (VP) e a soma do número absoluto de

verdadeiros positivos (VP) e dos erros falsos negativos (FN) multiplicada por 100, representada pela equação:

$$\text{SEN} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FN}) * 100 \quad (4)$$

Por fim, a taxa de eficiência (TEF) dos modelos de discriminação pode ser obtida pela diferença entre o valor de 100% e a soma das taxas de erros falsos negativos (TFN) e falsos positivos (TFP), representada pela equação:

$$\text{TEF} = 100 - (\text{TFN} + \text{TFP}) \quad (5)$$

#### **4.4.3. Identificação de plantas haploides, duplo-haploides e diploides via avaliação de amostras de folhas via NIR**

Em março de 2020 foram avaliados três tipos de genótipos de milho: diploides, haploides e duplo-haploides obtidos por duplicação cromossômica de plântulas haploides. Estes três tipos foram obtidos a partir de um mesmo grupo de genótipos, sendo utilizadas fontes dos grupos heteróticos Flint (G1 a G6) e Dent (G7 a G12), totalizando 34 genótipos-fonte induzidos a haploidia (Tabela 1). Para duplicação cromossômica e obtenção de duplo-haploides, adotou-se o protocolo preconizado por Couto et al. (2013), com modificações. No processo de obtenção de DHs, tanto na identificação quanto na duplicação cromossômica e no transplântio, ocorreram perdas inerentes à inexistência de haploides na espiga, morte de plantas, ineficiência do processo de duplicação e número pequeno de sementes, tornando necessária a duplicação de todas as sementes haploides, resultando na relação de genótipos da Tabela 1.

**Tabela 1** - Tipos de genótipos e do processo de obtenção de haploides.

Genótipos-fonte induzidos a haploidia	Haploides obtidos após indução de cada genótipo-fonte	DHs obtidos após duplicação cromossômica de cada haploide	Diploides identificados (falso-positivos) após indução
G1F <sub>1</sub>	H - G1F <sub>1</sub>	DH - G1F <sub>1</sub>	DP - G1F <sub>1</sub>
G1F <sub>2</sub>	H - G1F <sub>2</sub>	DH - G1F <sub>2</sub>	
G1S <sub>1</sub>	H - G1S <sub>1</sub>	DH - G1S <sub>1</sub>	
G2F <sub>1</sub>		DH - G2F <sub>1</sub>	
G2F <sub>2</sub>	H - G2F <sub>2</sub>	DH - G2F <sub>2</sub>	DP -G2F <sub>2</sub>
G2S <sub>1</sub>			DP -G2S <sub>1</sub>
G3F <sub>1</sub>		DH - G3F <sub>1</sub>	DP -G3F <sub>1</sub>
G3F <sub>2</sub>	H - G3F <sub>2</sub>	DH - G3F <sub>2</sub>	DP -G3F <sub>2</sub>
G3S <sub>1</sub>	H - G3S <sub>1</sub>	DH - G3S <sub>1</sub>	DP -G3S <sub>1</sub>
G4F <sub>1</sub>	H - G4F <sub>1</sub>	DH - G4F <sub>1</sub>	
G4F <sub>2</sub>	H - G4F <sub>2</sub>	DH - G4F <sub>2</sub>	DP -G4F <sub>2</sub>
G4S <sub>1</sub>		DH - G4S <sub>1</sub>	
G5F <sub>1</sub>	H - G5F <sub>1</sub>	DH - G5F <sub>1</sub>	
G5F <sub>2</sub>	H - G5F <sub>2</sub>	DH - G5F <sub>2</sub>	
G5S <sub>1</sub>		DH - G5S <sub>1</sub>	
G6F <sub>1</sub>	H - G6F <sub>1</sub>	DH - G6F <sub>1</sub>	DP -G6F <sub>1</sub>
G6F <sub>2</sub>	H - G6F <sub>2</sub>	DH - G6F <sub>2</sub>	
G6S <sub>1</sub>		DH - G6S <sub>1</sub>	DP -G6S <sub>1</sub>
G7F <sub>1</sub>	H - G7F <sub>1</sub>	DH - G7F <sub>1</sub>	DP -G7F <sub>1</sub>
G7F <sub>2</sub>	H - G7F <sub>2</sub>	DH - G7F <sub>2</sub>	
G7S <sub>1</sub>	H - G7S <sub>1</sub>		DP -G7S <sub>1</sub>
G8F <sub>1</sub>			DP -G8F <sub>1</sub>
G8F <sub>2</sub>	H - G8F <sub>2</sub>		DP -G8F <sub>2</sub>
G8S <sub>1</sub>	H - G8S <sub>1</sub>		DP -G8S <sub>1</sub>
G9F <sub>1</sub>	H - G9F <sub>1</sub>		DP -G9F <sub>1</sub>
G9F <sub>2</sub>			DP -G9F <sub>2</sub>
G9S <sub>1</sub>			DP -G9S <sub>1</sub>
G10F <sub>2</sub>	H - G10F <sub>2</sub>		
G10S <sub>1</sub>	H - G10S <sub>1</sub>		
G11F <sub>1</sub>	H - G11F <sub>1</sub>		DP -G11F <sub>2</sub>
G11S <sub>1</sub>	H - G11S <sub>1</sub>		DP -G11S <sub>1</sub>
G12F <sub>1</sub>	H - G12F <sub>1</sub>		
G12F <sub>2</sub>	H - G12F <sub>2</sub>		DP -G12F <sub>2</sub>
G12S <sub>1</sub>	H - G12S <sub>1</sub>		

Os genótipos de cada classe obtida foram semeados em casa de vegetação, em janeiro de 2020. A coleta de dados ocorreu em março de 2020. O transplante de cada genótipo se deu de forma manual para vasos de 20 L contendo solo adubado (dosagem equivalente a 2000 kg/ha de 4-28-16 (N-P-K) + Zn. Tais vasos foram mantidos em casa de vegetação climatizada, com temperatura em torno de 25 °C e umidade relativa do ar em torno de 60%. Foram realizadas duas adubações de cobertura, com 30 g de sulfato de amônia no estágio V5 e 16 g de uréia em V8 (Amaral Filho et al. 2005), e o manejo de irrigação se deu conforme as exigências da cultura.

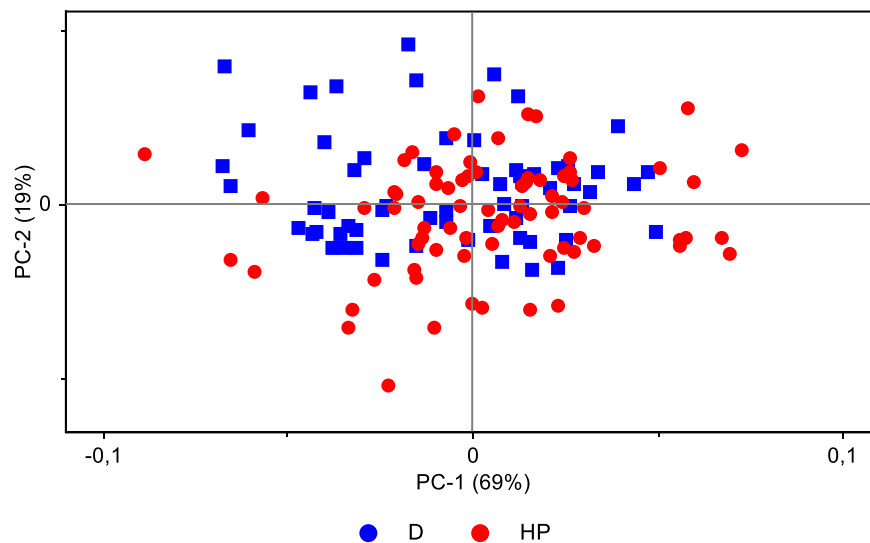
No estágio de pré-florescimento coletou-se a terceira folha expandida de cada um dos genótipos previamente identificados como haploides, diploides e duplo-haploides. As folhas foram armazenadas em sacos de papel e secas a 65 °C em estufa de ventilação forçada. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas na granulometria de 1 mm e prensadas manualmente para a obtenção de uma pastilha. Avaliaram-se as plantas haploides, DH e diploides derivadas de 25, 19 e 20 genótipos-fontes, respectivamente (Tabela 1). Para amostragem de cada genótipo-fonte (haploide, DH e diploide) foram selecionadas quatro plantas haploides, quatro DHs e uma diploide.

Para a construção do modelo de classificação foliar de plantas diploides, haploides e DH, utilizando dados de espectroscopia no infravermelho próximo e métodos de calibração multivariada foi obtido o espectro NIR das pastilhas de amostras de folhas de milho. Os espectros de absorvância foram obtidos a partir de cada pastilha de folha utilizando um equipamento MicroNIR, modelo 1700 (JDSU, Flawil, Switzerland) equipado com detector de InGaAs (Arseneto de índio e gálio). O equipamento foi calibrado utilizando um padrão de Spectralon®. Os espectros das pastilhas de folha foram obtidos em triplicata, na região de 900 a 1.700 nm com resolução 12,5 nm, tempo de medida 0,25 segundos. Essa coleta ocorreu em ambiente climatizado a temperatura de  $25 \pm 2$  °C e os espectros dos três tipos de folhas foram obtidos de forma aleatória. O processamento e análise dos dados espectroscópicos foram realizados conforme os mesmos procedimentos descritos no item 1 (Identificação de haploides por análise de sementes de milho com NIR).

## 4.5. Resultados e Discussão

### 4.5.1. Identificação de haploides por Análise de sementes de milho com NIR

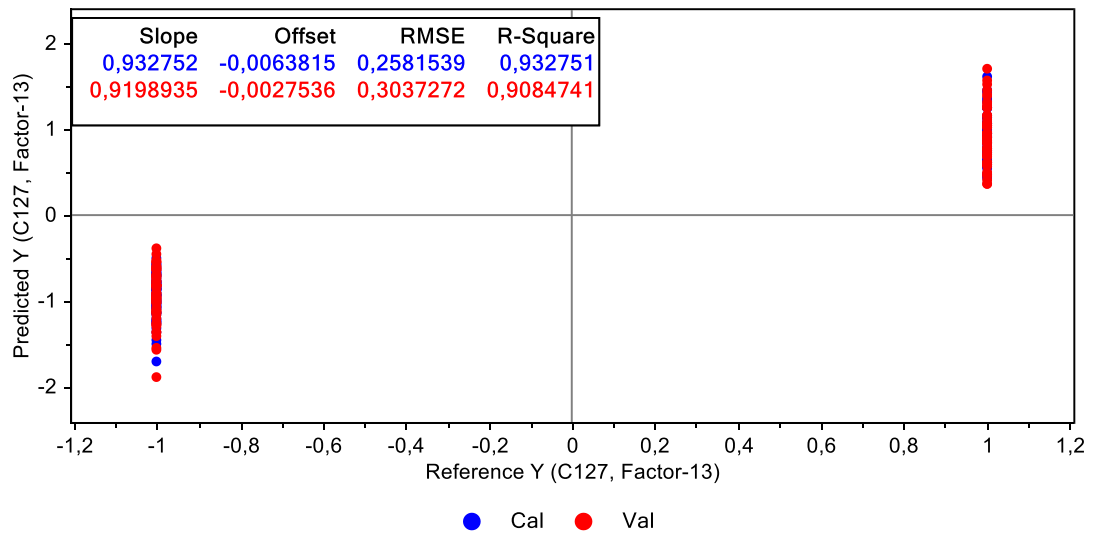
Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados com PCA. O gráfico de *scores* PC1 x PC2 (*scores plot*) para sementes de milho explicou 88% da variância amostral, sendo PC1 x PC2 o contraste entre sementes de duas origens distintas: haploides e diploides (Figura 1).



**Figura 1** - Gráfico de *scores* com 2 componentes principais para o conjunto de amostras de sementes de milho diploides (D) e haploides (HP).

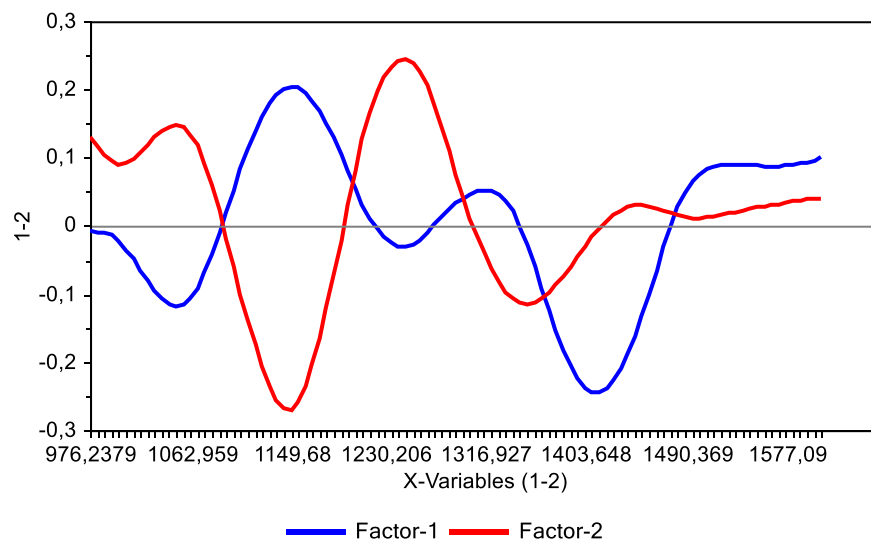
A análise de componentes principais (PCA) reduziu a dimensionalidade do conjunto de dados condensando as variáveis em poucas componentes principais (PC) com a máxima variância amostral (Sena e Almeida, 2018), mas não apresentou uma separação clara entre as duas classes (Figura 1).

No presente trabalho foi adotado, o método qualitativo, de classificação supervisionada, análise discriminante PLS-DA. Para a construção do modelo PLS-DA foram utilizadas 13 variáveis latentes (VL), uma vez que, 13 VL permitiu obter o menor valor de RMSECV 0,30 (Figura 2). Para otimizar o modelo tentou-se ainda a seleção de variáveis latentes pela inspeção dos coeficientes de regressão (teste de incerteza), contudo, não resultou em melhora nos resultados. O valor de calibração do modelo para 92 amostras de sementes RMSEC 0,26 foi próximo ao RMSECV 0,30, indicando que a separação de classes haploides e diploides é explicada por 13 variáveis latentes.



**Figura 2** - Modelo PLS-DA para a classificação de sementes de milho haploides de sementes diploides. Em azul estão apresentados os resultados para o conjunto de calibração (Cal); em vermelho, os resultados para a validação cruzada (Val).

Pela análise dos *loadings* (Figura 3) é possível observar que as regiões que tiveram maior influência para a discriminação das sementes foram às bandas mais intensas em PC1: 1050, 1150 e 1420 nm, e em PC2: 1150, 1250 e 1348 nm.

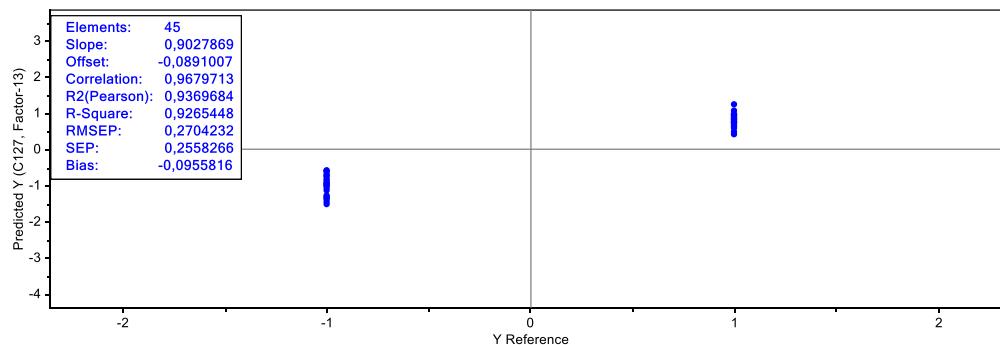


**Figura 3** - Gráfico de *loadings* com 2 componentes principais para o conjunto de amostras de sementes de milho diploides (D) e haploides (HP).

Nessa região espectral podemos observar os primeiros e segundos sobretons de

estiramento de C-H, O-H e N-H. As bandas de absorção centradas em 1150 e 1250 nm estão associadas aos sobretons de estiramento O-H de açúcares e ácidos graxos das sementes e apresentam coeficientes de regressão mais positivos, diretamente relacionados com as amostras de sementes diploides. Os *loadings* mais negativos (1150 e 1430nm) estão associados, respectivamente, aos sobretons de O-H de açúcares e ácidos graxos, e, N-H de proteínas das amostras de sementes haploides. Em sementes haploides, Gustin et al. (2020) apontaram aumento do teor de proteínas e as sementes foram classificadas pelo teor de óleo via skNIR (*single-kernel near-infrared reflectance spectroscopy*) - espectroscopia na reflectância do infravermelho próximo.

O modelo PLS-DA construído a partir de 13 VL foi capaz de classificar corretamente as 45 sementes de milho (Figura 4). As amostras foram separadas de acordo com a estimativa de classificação em: classe 1, sementes diploides; e classe -1, sementes haploides. O valor de RMSEP 0,27, referente à aplicação do modelo construído a amostra do conjunto teste, foi próximo ao valor de RMSEC 0,26, indicando eficiência da aplicação do modelo a outras amostras de sementes haploides e diploides não pertencentes ao conjunto de treinamento.



**Figura 4** - Estimativa do modelo PLS-DA para a classificação de sementes de milho diploides (1) de haploides (-1).

Os principais parâmetros de avaliação do modelo e discriminação de semente para a fase de treinamento e teste estão apresentados na Tabela 2. O modelo PLS-DA com 13 variáveis latentes possui eficiência máxima na classificação de sementes haploides e diploides, não havendo falso positivo e falso negativo. Os parâmetros sensibilidade, especificidade e eficiência do modelo foram de 100%, para o conjunto de treinamento e teste (Tabela 1).

**Tabela 2** - Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA para classificação das

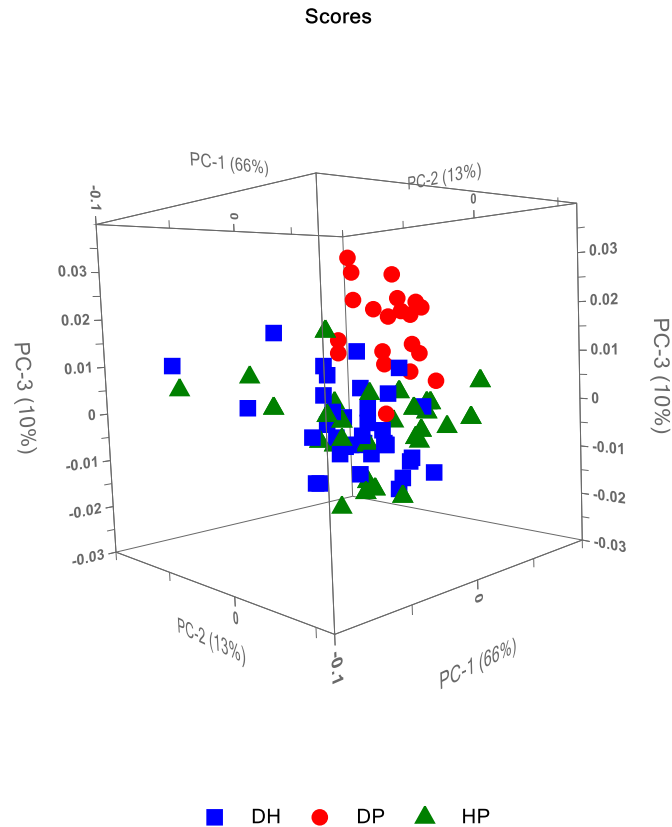
sementes de milho haploides e diploides.

<b>Parâmetros</b>	<b>Conjunto de treinamento</b>	<b>Conjunto de teste</b>
Variáveis latentes	13	13
Amostras anômalas	2	0
Limite de discriminação	0,25	0,27
Taxa de Falso Positivo e Negativo	0	0
Taxa de Verdadeiro Positivo e Negativo	100	100
Sensibilidade	100	100
Especificidade	100	100
Eficiência	100	100
Número de amostras de treinamento: 92		
Número de amostras de teste: 45		

#### **4.5.2. Identificação de plantas haploides, duplo-haploides e diploides via avaliação de amostras de folhas via NIR**

Na Figura 5 podemos observar que o gráfico de *scores* PC1 x PC2 x PC3 (*scores plot*), obtido da PCA, explicou 89% da variância amostral. Entretanto, a PCA não apresentou uma separação distinta entre as três classes de genótipos nas duas primeiras componentes principais (PCs), sendo necessário adicionar mais uma PC para verificar a separação de classes.

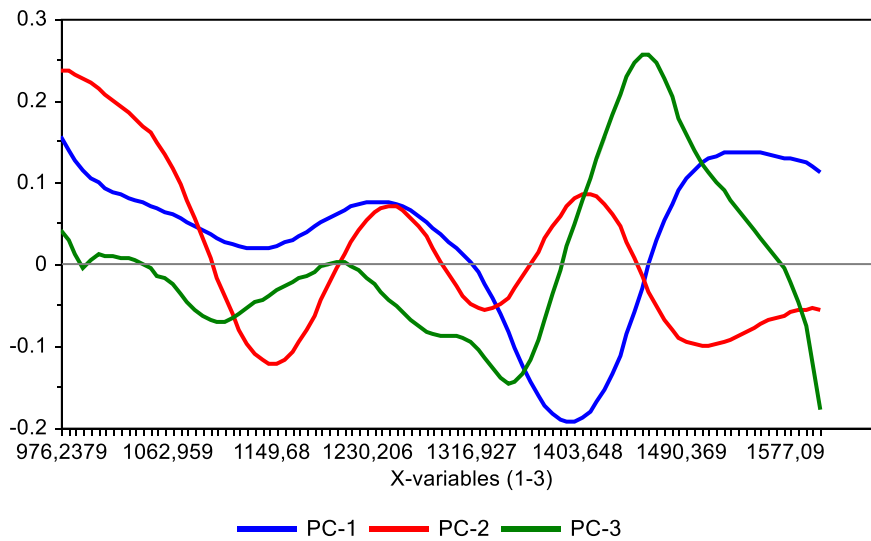
Nas três PCs os valores de escores para a maioria das amostras foram maiores que zero, indicando a sua importância na interpretação de cada componente (Figura 5). Na observação conjunta do gráfico de *scores* PC1 x PC2, PC1 é um contraste de folhas de duas origens semelhantes, duplo-haploides e haploides. No gráfico de *scores* PC1 x PC3, PC1 é um contraste de folhas de três origens, duas origens semelhantes, duplo-haploides e haploides, e, uma origem diferente diploide.



**Figura 5** - Gráfico de *scores* com 3 componentes principais para o conjunto de amostras de folhas de milho duplo-haploides (DH), diploides (D) e haploides (HP).

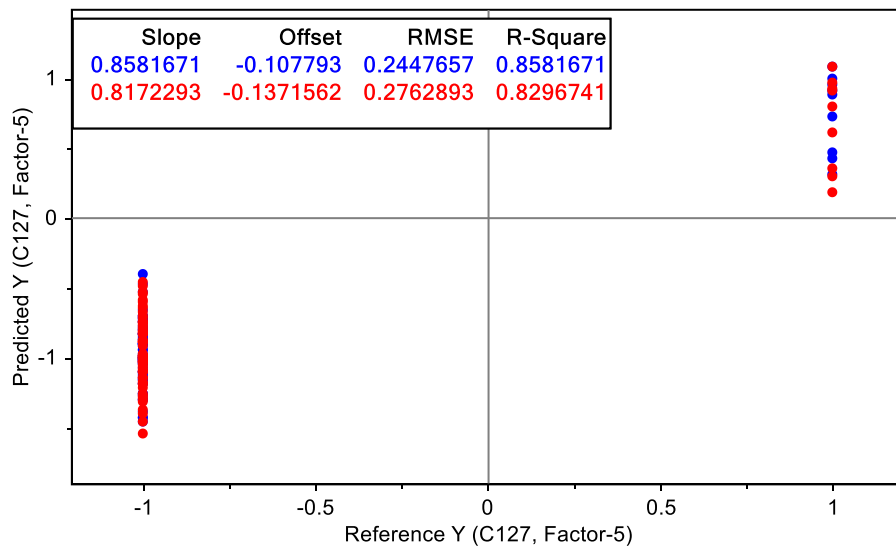
O gráfico de *loadings* das três PCs encontra-se na Figura 6. As três componentes principais correspondem às fontes de variação presentes nos dados: folhas haploides, duplo-haploides e diploides. Às regiões que tiveram influência para distinção das folhas foram as bandas de maior intensidade em PC1: 1403; PC2: 1155, 1250, 1410 e PC3: 1354 e 1465. Nessa região do comprimento de onda das bandas de absorção da radiação NIR encontram-se os primeiros e segundos sobretons referentes a grupos funcionais C-H, O-H e N-H. Estes grupos funcionais são açúcares, ácidos graxos e proteínas presentes nas folhas.

As bandas centradas em 1250 e 1465 nm estão associadas aos sobretons de estiramento C-H e N-H de proteínas, presentes nas sementes que apresentam scores mais positivos, diretamente relacionados com as amostras de folhas diploides. Os *loadings* relacionados aos scores mais negativos (1155 e 1410 nm) associados, respectivamente, aos sobretons de C=O e O-H presentes em açúcares e ácidos graxos estão relacionados às folhas haploides e DHs. Pelas diferenças de concentrações dos compostos orgânicos como amido, lipídeos e proteínas é possível discriminar folhas diploides de folhas haploides e DHs.

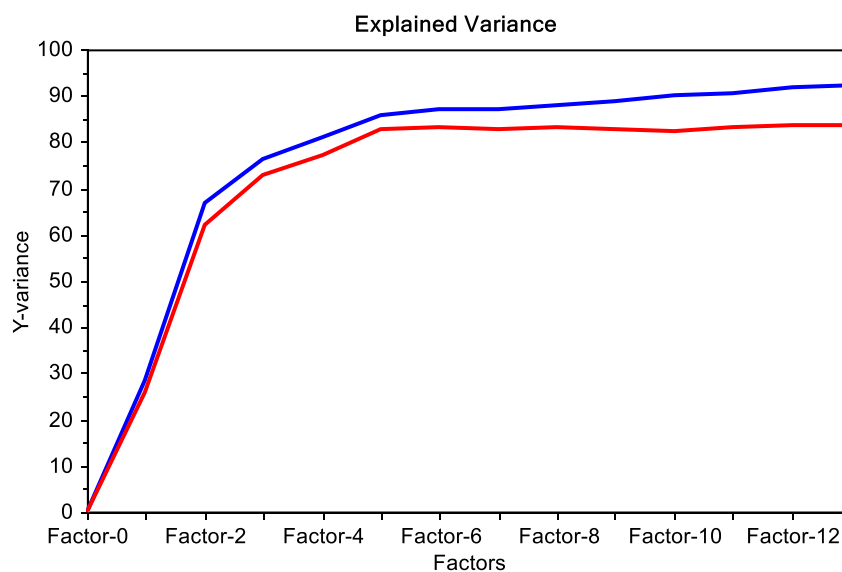


**Figura 6** - Gráfico de *loadings* com três componentes principais para o conjunto de amostras de folhas de milho duplo-haploides (DH), diploides (D) e haploides (HP).

Na construção do modelo PLS-DA, inicialmente para a classificação das plantas diploides, foram utilizadas sete variáveis latentes (VL), uma vez que as sete VL permitiram obter o menor valor de RMSECV (0,27) e a maior variância acumulada (88%). Na otimização do modelo utilizou-se a seleção de variáveis pela inspeção dos coeficientes de regressão (teste de incerteza), o que resultou em uma melhora nos resultados pela diminuição do número de VL. Com a seleção de variáveis obteve-se um modelo com cinco VL e 85% de variância explicada, RMSEC de 0,24 e RMSECV de 0,27 ( Figuras 7 e 8). Pelo valor do parâmetro RMSEC a aplicação do modelo às amostras de treinamento foi próxima ao menor valor RMSECV, ou seja, houve eficiência na calibração do modelo usando 75 amostras de folhas. A redução das variáveis latentes não gerou um modelo sobreajustado, pois o valor de RMSEP 0.33 foi próximo ao RMSEC 0,24. As cinco variáveis latentes explicaram a separação de classes diploides das classes haploides e duplo-haploides.



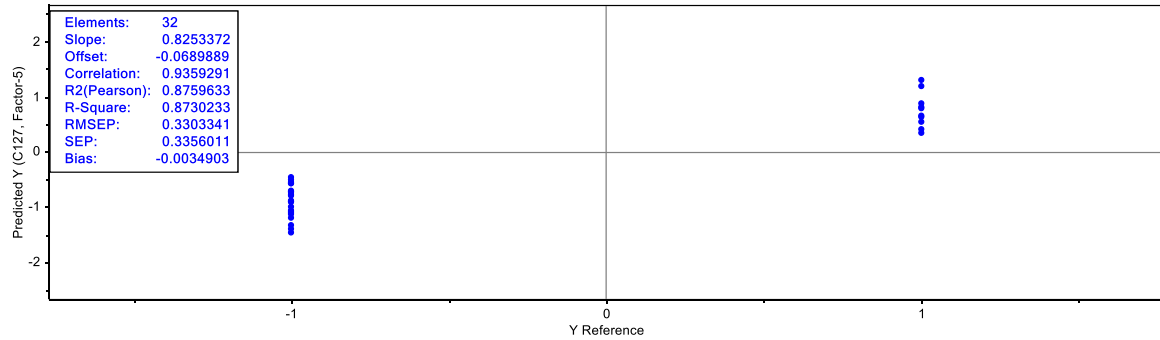
**Figura 7** - Modelo PLS-DA para a classificação de folhas de milho diploides, haploides e duplo-haploides. Em azul estão apresentados os resultados para o conjunto de calibração; em vermelho, os resultados para a validação cruzada.



**Figura 8** - Variância explicada para o modelo PLS-DA de classificação de folhas de milho diploides, haploides e duplo-haploides. Em azul estão apresentados os resultados para o conjunto de calibração; em vermelho, os resultados para a validação cruzada.

O modelo PLS-DA construído a partir de cinco VL foi capaz de classificar corretamente as 32 amostras de folhas de milho do conjunto de teste (Figura 9). As amostras foram separadas de acordo com a estimativa de classificação: classe 1, folhas diploides; e classe -1, folhas

haploides e duplo-haploides. As folhas largas foram atribuídas a folhas diploides e, as folhas estreitas representavam folhas haploides e duplo-haploides. O modelo PLS-DA obtido foi validado com um conjunto de amostras teste, as quais não foram utilizadas na construção do modelo.



**Figura 9** - Estimativa do modelo PLS-DA para a classificação das folhas de milho diploides (1) de haploides e duplo haploide (-1).

O modelo foi otimizado também para a discriminação das folhas haploides, duplo-haploides e diploides. Na classificação de folhas foram encontradas cinco, seis e sete variáveis latentes, respectivamente, para diploides, haploides e duplo-haploides. Os principais parâmetros de avaliação do modelo para a discriminação de cada folha na fase de treinamento e teste estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA para folhas de milho diploides, haploides e duplo-haploides

Parâmetros	Diplóides	Haploides	Duplo-haploides
Variáveis latentes	5	6	7
Amostras anômalas	1	0	0
Limite de discriminação	0,24	0,27	0,27
Taxa de Falso Positivo e Negativo	0	0	0
Taxa de Verdadeiro Positivo e Negativo	100	100	100
Sensibilidade	100	100	100
Especificidade	100	100	100
Eficiência	100	100	100

Número de amostras de treinamento: 75

Número de amostras de teste: 32

O modelo PLS-DA apresentou um desempenho adequado para a separação de classes de folhas diploides, das folhas duplo-haploides e haploides, não havendo falso positivo e falso negativo. A sensibilidade, especificidade e a eficiência do modelo foram de 100%, tanto para o

conjunto de treinamento, quanto para o conjunto de teste (Tabela 2).

O método qualitativo PLS-DA para análise de sementes haploides e diploides, e também para análise de folhas haploides, duplo-haploides e diploides possui simples operacionalidade. Ele possibilitou eficiência de 100% na classificação de ambos: sementes haploides e folhas haploides e duplo-haploides. As sementes haploides possuindo pigmentação púrpura no endosperma e ausência de pigmentação no embrião. As folhas haploides e duplo-haploides possuindo folhas estreitas.

Jones et al. (2012), utilizando o método SIMCA de modelagem de classe para seleção de haploides em milho, identificou sementes haploides com 84,6% e diploides com 100% de precisão, respectivamente em três genótipos distintos. Para aplicação do método foi necessário separar os genótipos antes da classificação haploides e diploides. O número de variáveis foi distinto para cada genótipo. E, em cada genótipo, o número de variáveis para separação de classes haploides e diploides foi diferente: 13 e 16 variáveis para as classes haploide e diploides; 10 e 15 variáveis para as classes haploides e diploides, 10 e 12 variáveis para as classes haploide e diploides. No método PLS-DA foram utilizadas 13 variáveis para a separação de classes haploides e diploides em quatro genótipos, simultaneamente. A PLS-OLDA (*Orthogonal Linear Discriminant Analysis*) - análise discriminante linear ortogonal também foi empregada na identificação de sementes haploides de milho usando a espectroscopia NIR e apresentou acurácia de 93,2% (Hong et al. 2016)

Os métodos não-lineares multivariados também foram utilizados para identificação de sementes haploides. O método SVSKLPP (*Supervised Virtual Sample Kernel Locality Preserving Projection*) - projeção de preservação de localidade de amostra virtual supervisionada teve uma taxa de reconhecimento de sementes haploides de 97,1%. Esse modelo apresentou sensibilidade de 98,8% e especificidade de 95,4%, porém apresenta grande complexidade computacional (Yu et al. 2018). Em outro trabalho, o método BPNN (*Back Propagation Neural Network*)- classificador de rede neural de retropropagação utilizado na identificação de sementes haploides teve um acurácia de 96,16% (Lin et al. 2018). Estes diferentes tipos de métodos e resultados demonstram possibilidades de uso do infravermelho próximo, e o potencial da técnica na classificação de sementes e plantas DHs de milho.

#### 4.6. Conclusões

O equipamento NIR portátil foi eficiente na obtenção de dados espectroscópicos para construção de modelos multivariados de classificação, possibilitando a discriminação entre as sementes de milho haploides e diploides e entre plantas de milho haploides, duplo-haploides e diploides

Os modelos de classificação PLS-DA obtidos permitiram a classificação correta das sementes e das plantas de milho com 100% de eficiência.

O uso da espectroscopia no infravermelho próximo associada à Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) apresentou-se como um método rápido, simples, não-destrutivo e confiável para a classificação entre as sementes de milho haploides e diploides e plantas de milho haploides, diploides e duplo-haploides, em comparação ao método visual.

#### 4.7. Referências

AMARAL FILHO, J. P.R.D.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J.C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3, p.467-473, 2005.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003.

BERARDO, N., MAZZINELLI, G., VALOTI, P., LAGANA, P., REDAELLI, R. Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2378-2384, 2009.

CHASE, S. S. Selection for parthenogenesis and monoploid fertility in maize. In: **Genetics**, v. 37, n. 5, p. 573-574, 1952.

COUTO, E.G.D.O.; DAVIDE, L.M.C.; BUSTAMANTE, F.D.O.; PINHO, R.G.V.; SILVA, T.N. Identification of haploid maize by flow cytometry, morphological and molecular markers. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 25-31, 2013.

CUI, Y., GE, W., LI, J., ZHANG, J., AN, D., WEI, Y. Screening of maize haploid kernels based on near infrared spectroscopy quantitative analysis. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 158, p. 358-368, 2019.

GENISHEVA, Z., QUINTELAS, C., MESQUITA, D. P., FERREIRA, E. C., OLIVEIRA, J. M., AMARAL, A. L. New PLS analysis approach to wine volatile compounds characterization by near infrared spectroscopy (NIR). **Food chemistry**, v. 246, p. 172-178, 2018.

GHOSH, S., MISHRA, P., MOHAMAD, S. N. H., DE SANTOS, R. M., IGLESIAS, B. D., ELORZA, P. B. Discrimination of peanuts from bulk cereals and nuts by near infrared reflectance spectroscopy. **Biosystems Engineering**, v. 151, p. 178-186, 2016.

GUSTIN, J. L., FREI, U. K., BAIER, J., ARMSTRONG, P., LÜBBERSTEDT, T., & SETTLES, A. M. Classification approaches for sorting maize (*Zea mays* subsp. *mays*) haploids using single-kernel near-infrared spectroscopy. **Plant Breeding**, v. 139, n. 6, p. 1103-1112, 2020.

HONG, Q.; JING-YI, M. A.; SHAO-JIANG, C.; YAN-LU, Y.; WEI-JUN, L.; PING, W.; JIN, L. Identification of haploid maize kernel using NIR spectroscopy in reflectance and transmittance modes: A comparative study. **Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu**, v. 36, n. 1, 292-297, 2016.

IKEOGU, U. N., DAVRIEUX, F., DUFOUR, D., CEBALLOS, H., EGESI, C. N., JANNINK, J. L. Rapid analyses of dry matter content and carotenoids in fresh cassava roots using a portable visible and near infrared spectrometer (Vis/NIRS). **PLoS one**, v. 12, n. 12, p. e0188918, 2017.

JONES, R. W., REINOT, T., FREI, U. K., TSENG, Y., LÜBBERSTEDT, T., MCCLELLAND, J. F. Selection of haploid maize kernels from hybrid kernels for plant breeding using near-infrared spectroscopy and SIMCA analysis. **Applied spectroscopy**, v. 66, n. 4, p. 447-450, 2012.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

LI, J.; YU, X.; GE, W.; AN, D. Qualitative analysis of maize haploid kernels based on calibration transfer by near-infrared spectroscopy. **Analytical Letters**, v. 52, n. 2, p. 249-267, 2019.

LIN, J., YU, L., LI, W., QIN, H. Method for identifying maize haploid seeds by applying diffuse transmission near-infrared spectroscopy. **Applied spectroscopy**, v. 72, n. 4, p. 611-617, 2018.

LIU, R., SUN, Q., HU, T., LI, L., NIE, L., WANG, J., ZHOU, W., ZANG, H. Multi-parameters monitoring during traditional Chinese medicine concentration process with near infrared spectroscopy and chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 75-81, 2018.

NANDA, D. K; CHASE, S. S. An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea Mays* L.). **Crop Science**, v. 6, n. 2, p. 213-215, 1966.

PAN, T., LIU, J., CHEN, J., ZHANG, G., ZHAO, Y. Rapid determination of preliminary thalassaemia screening indicators based on near-infrared spectroscopy with wavelength selection stability. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4355-4362, 2013.

PENG, JIAN & ZHANG, ZHENG-MAO. Rapid Determination of Starch and Amylose Content in Whole Wheat Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)[J]. **Journal of Triticeae Crops**, v. 2, 2010.

PEREIRA, J. M. G., SANCHEZ, J. L., DE LIMA, P. C., POSSEBON, G., TANAMATI, A., TANAMATI, A. A. C., BONA, E. Industrial hydrogenation process monitoring using ultra-compact near-infrared spectrometer and chemometrics. **Food analytical methods**, v. 11, n. 1, p. 188-200, 2018.

PRASANNA, B. M., CHAIKAM, V., MAHUKU, G. **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. CIMMYT, 2012.

PRIGGE, V., & MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. In: **Plant cell culture protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 161-172.

QU, Y., LIU, Z., ZHANG, Y., YANG, J., LI, H. Improving the sorting efficiency of maize haploid kernels using an NMR-based method with oil content double thresholds. **Plant Methods**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2021.

SENA, M.M. DE & ALMEIDA, M. R. de Quimiometria Aplicada aos Dados Espectrais no Infravermelho Próximo. In: TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P. de; SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. de (Ed.). **Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 31-50.

SIMEONE, M. L. F.; PIMENTEL, M. A. G.; GONTIJO NETO, M. M.; PAES, M. C. D.; SILVA, D. D. da. Uso da espectroscopia no infravermelho próximo e calibração multivariada para avaliar a composição química do milho. In: TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P. de;

SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. de (Ed.). **Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 51-62.

TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., TOYODA, K., OZAKI, Y., ITOH, K., & FEARN, T. Near-infrared spectroscopy for dairy management: measurement of unhomogenized milk composition. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 11, p. 2344-2351, 1999.

WAKHOLI, C.; KANDPAL, L. M.; LEE, H.; BAE, H.; PARK, E.; KIM, M.; MO, C.; LEE, W.; CHO, B. Rapid assessment of corn seed viability using short wave infrared line-scan hyperspectral imaging and chemometrics. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 498-507, 2018.

WANG, H., LIU, J., XU, X., HUANG, Q., CHEN, S., YANG, P., CHEN, S., SONG, Y. Fully-automated high-throughput NMR system for screening of haploid kernels of maize (Corn) by measurement of oil content. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159444, 2016.

WEI, L., JIN-LONG, L., WEI-JUN, L., LI-WEI, L., HAO-GUANG, L., CHEN, C., SHAO-JIANG, C. Near infrared spectroscopy analysis based machine learning to identify haploids in maize. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 38, n. 9, p. 2763-2769, 2018.

WIEDEMAIR, V., DE BIASIO, M., LEITNER, R., BALTHASAR, D., HUCK, C. W. Application of design of experiment for detection of meat fraud with a portable near-infrared spectrometer. **Current Analytical Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 58-67, 2018.

WIMONSIRI, L., RITTHIRUANGDEJ, P., KASEMSUMRAN, S., THERDTHAI, N., CHANPUT, W., OZAKI, Y. Rapid analysis of chemical composition in intact and milled rice cookies using near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 25, n. 5, p. 330-337, 2017.

WU, D., HE, Y., FENG, S., SUN, D. W. Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 124-131, 2008.

WU, P., REN, J., LI, L., CHEN, S. Early spontaneous diploidization of maternal maize haploids generated by in vivo haploid induction. **Euphytica**, v. 200, n. 1, p. 127-138, 2014.

YANG, Y., WU, Y., LI, W., LIU, X., ZHENG, J., ZHANG, W., CHEN, Y. Determination of geographical origin and icariin content of Herba Epimedii using near infrared spectroscopy and chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191, p. 233-240, 2018.

YU, L., LIU, W., LI, W., QIN, H., XU, J., ZUO, M. Non-destructive identification of maize haploid seeds using nonlinear analysis method based on their near-infrared spectra. **Biosystems engineering**, v. 172, p. 144-153, 2018.

ZHOU, Y., FU, X. P., & YING, Y. B. Effect of humidity on detection of near-infrared spectra. **Guang pu xue yu Guang pu fen xi= Guang pu**, v. 27, n. 11, p. 2197-2199, 2007.

## 5. CAPÍTULO 3

### DESEMPENHO AGRONÔMICO E CAPACIDADE COMBINATÓRIA DE LINHAGENS DUPLO-HAPLOIDES DE MILHO EM DOIS NÍVEIS DE ADUBAÇÃO

#### 5.1. Resumo

Linhagens duplo-haploides (DH) possuem 100% de homozigose, alta variância genética entre famílias, e reduzido tempo de obtenção. Em programas de melhoramento, estas vantagens proporcionam maiores ganhos genéticos. Porém, é necessário a avaliação das linhagens quanto a capacidade combinatória para características agronômicas de interesse, visando à formação de população-base para desenvolvimento de cultivares. Em campo, as linhagens podem apresentar diferentes valores de capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, sendo essencial estimar estes parâmetros em condições distintas. Os objetivos do presente trabalho foram: i) estimar a capacidade combinatória de linhagens DH de milho em cruzamento com testadores de grupos heteróticos distintos, com e sem adubação, e ii) avaliar o desempenho agronômico de híbridos de milho derivados de linhagens DH, em comparação com híbridos obtidos por métodos convencionais. Para isto, foi avaliado o desempenho agronômico de híbridos simples derivados de linhagens DH obtidas de genótipos-fonte com diferentes gerações ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $S_1$ ), em comparação com híbridos simples experimentais e comerciais em dois ambientes distintos: com adubação (500 kg/ha de 8-28-16 como adubação de plantio) e sem adubação. O delineamento experimental foi látice simples 13x13, com duas repetições, sendo avaliados 146 híbridos derivados de linhagens DH (76 Flint e 70 Dent), e 23 testemunhas, totalizando 169 genótipos. Foram coletados dados de umidade de grãos, estande final, tombamento (acamamento e quebramento de plantas), altura de planta, altura de espiga e produtividade de grãos. Os dados foram submetidos a análises individuais e conjunta de variâncias, com desdobramento de graus de liberdade para avaliação de contrastes ortogonais, componentes de variância, teste de médias de Scott-Knott, e a análise do dialelo parcial pelo método de Griffing. As linhagens DH  $G1F_2$ ,  $G4F_1$ ,  $G4F_2$  e  $G5S_1$  expressaram alta capacidade geral de combinação para produtividade e estande e baixa capacidade geral de combinação para tombamento, nos dois níveis de adubação. O desempenho agronômico dos 15 melhores híbridos derivados de linhagens DH em comparação com testemunhas, indicou superioridade de linhagens duplo-haploides em comparação com os híbridos obtidos de linhagens convencionais para as cinco características avaliadas, nos dois níveis de adubação.

Palavras-chave: *Zea mays* L., dialelo parcial, estimativas de parâmetros genéticos, tecnologia de duplo-haploides, produtividade.

## 5.2. Abstract

Double-haploid (DH) strains are 100% homozygous, have high genetic variation between families, and short time to obtain. In breeding programs, these advantages provide greater genetic gains. However, it is necessary to evaluate the lines regarding the combining ability for agronomic traits of interest, composition and the formation of a base population for cultivar development. In the field, the lines can present different values of general (CGC) and specific (CEC) combination capacity, being essential to estimate these parameters under different conditions. The objectives of the present work were: i) to estimate the combining ability of DH corn lines in crossing with testers from different heterotic groups, with and without fertilization, and ii) to evaluate the agronomic performance of corn hybrids derived from DH lines, in comparison with hybrids collected by conventional methods. For this, the agronomic performance of simple hybrids derived from previous DH lines of source genotypes with different generations (F1, F2, S1) was evaluated, in comparison with experimental and commercial simple hybrids in two distinct environments: with fertilization (500 kg / ha of 8-28-16 as fertilizer for planting) and without fertilizer. The experimental design was a simple 13x13 lattice, with two replications, with 146 hybrids derived from DH lines (76 Flint and 70 Dent), and 23 controls, totaling 169 genotypes. Data on grain moisture, final stand, tipping (plant lodging and breakage), plant height, ear height and grain yield were collected. Data were analyzed in individual and joint analysis of variances, with degrees of freedom unfolding for the evaluation of orthogonal contrasts, variance components, Scott-Knott's test of means, and a partial diallel analysis using the Griffing method. The DH lines G1F2, G4F1, G4F2 and G5S1 expressed high general combining capacity for productivity and stand and low general combining capacity for tipping, in the two fertilization levels. indicated superiority of double-haploid lines compared to hybrids obtained from conventional lines for the five characteristics evaluated, at the two levels of fertilization.

Keywords: *Zea mays* L., partial diallel, genetic parameter estimates, doubled-haploid technology, productivity.

### 5.3. Introdução

A tecnologia de duplo-haploides (DH) em milho é empregada em programas de melhoramento das empresas produtoras de sementes para obtenção de ganhos em tempo e redução de custos na obtenção de novas cultivares (Chaikam et al. 2019; Mayor e Bernardo 2009; Mowers et al. 2018; Beyene et al. 2017).

As vantagens das linhagens DH em comparação com as obtidas por métodos tradicionais são a completa homozigose, a máxima variância genética entre famílias e a redução do tempo de obtenção de novas linhagens (Geiger e Gordillo, 2009). A maior variância genética implica em elevação dos valores de herdabilidade, que é o percentual da variância fenotípica que é devido a efeitos gênicos, e é importante para avaliação do potencial de genótipos como genitores de novas cultivares (Gallais e Bordes 2007). Mowers e Foster (2020) compararam linhagens DH com linhagens oriundas de 6 a 8 ciclos de autofecundação e verificaram maior variância genética associada à DH, e maior produtividade de híbridos derivados de linhagens DH.

A tecnologia de DH possibilita a obtenção de grande número de linhagens, tornando essencial a avaliação da capacidade combinatória (Wang et al. 2020; Riedelsheimer et al. 2012). Linhagens com altos valores de capacidade combinatória contribuem para a produção de híbridos-elite, uma vez que os efeitos aditivos podem ser transmitidos das linhagens genitoras para os híbridos (Huang et al. 2013; Wang et al. 2020)

Existem metodologias já consagradas para a avaliação de diferentes grupos de linhagens em cruzamentos, como o dialelo parcial, que permite, estimar a capacidade geral de combinação (CGC) dos genitores e a capacidade específica de combinação (CEC) das combinações híbridas entre grupos distintos (Maioli et al. 2020). O procedimento proposto por Griffing (1956) é um dos métodos mais utilizados para obter informações genéticas via dialelo, selecionando populações com maior concentração de alelos favoráveis para as características de interesse, permitindo a seleção de linhagens superiores (Hallauer et al. 2010; Paterniani e Campos, 1999). Este método baseia-se na estimação dos efeitos de capacidade geral de combinação (CGC) de um grupo de parentais e da capacidade específica de combinação (CEC) de suas respectivas combinações híbridas. A CGC é o resultado do comportamento médio de linhagens, quando em uma série de cruzamentos, e a CEC representa o desvio de um determinado cruzamento para melhor ou pior, tomando por base a média da (CGC) dos pais, resultante dos efeitos de dominância, epistasia e vários tipos de interações gênicas. (Sprague e Tatum, 1942).

O dialelo consiste em um esquema de acasalamento de um grupo de genitores resultando em  $p(p-1)/2$  híbridos. As metodologias de análise dialélica objetivam: estimar parâmetros úteis para a seleção de genitores; entender e estimar os efeitos genéticos envolvidos na determinação dos caracteres de interesse para a seleção dos genitores para hibridação; avaliar o comportamento de híbridos possíveis em um conjunto de genótipos parentais; entender a natureza e magnitude dos efeitos genéticos envolvidos na determinação dos caracteres; e fornecer subsídios para decidir a melhor estratégia para o melhoramento de uma população (Vencovsky e Barriga, 1992; Vieira et al. 1999; Viana e Matta, 2003).

Para avaliação da capacidade combinatória de linhagens é importante empregar diferentes ambientes ou níveis de tecnologia. De acordo com as condições ambientais, os genótipos podem apresentar diferentes valores de CGC e CEC. A análise conjunta em dialelos parciais estima os valores médios de CGC e CEC, permitindo ao melhorista recomendar cruzamentos mais adequados a cada situação (Maioli et al. 2020).

A análise dialélica é empregada para quantificar a capacidade combinatória em cruzamentos e facilitar a identificação de genótipos superiores. Estimativas de capacidade combinatória obtidas na análise dialélica foram comparadas com as divergências genéticas dos pais estimadas por marcadores microssatélites (Maioli et al. 2020). Verificou-se que a maior divergência genética não correspondeu a híbridos que possuem estimativas favoráveis de CEC, mas 85% dos híbridos estudados tiveram pais de grupos distintos, no qual todos os híbridos tiveram valores favoráveis de  $\hat{s}_{ij}$  para produtividade de grãos.

Nardino et al. (2016) avaliaram a capacidade de combinação entre linhagens de milho de dois grupos heteróticos para predizer as melhores combinações em características relacionadas ao pendão e rendimento de grãos, em cinco ambientes da região Sul do Brasil. Os autores concluíram que os efeitos aditivos foram relevantes para o grupo II, em contrapartida para o grupo I os efeitos não aditivos foram mais importantes, para as características relacionadas ao pendão e rendimento de grãos.

Os objetivos do presente trabalho foram: i) estimar a capacidade combinatória de linhagens DH de milho em cruzamento com testadores de grupos heteróticos distintos, sob presença e ausência de adubação de base, e ii) avaliar o desempenho agrônomico dos híbridos de linhagens DH, em comparação com híbridos obtidos por métodos convencionais.

## 5.4. Material e Métodos

### 5.4.1. Local, data e material vegetal em estudo

Dois experimentos foram implantados nas áreas experimentais do Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo (latitude 19° 28' 4" Sul, longitude: 44° 14' 52" Oeste e 751 metros de altitude), em Sete Lagoas, Minas Gerais, entre dezembro de 2020 e maio de 2021.

Os genótipos duplo-haploides (DH) avaliados neste trabalho são oriundos de 12 genótipos-fonte, obtidas por cruzamentos bi-parentais (F<sub>1</sub>) entre linhagens do mesmo grupo heterótico, sendo seis representantes do grupo heterótico Flint e seis do grupo Dent (Tabela 1). Estas populações foram avançadas por mais duas gerações (F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>), totalizando 36 genótipos-fonte (18 para cada grupo heterótico). Após obtidos as gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>, todos estes genótipos foram levados para campo de indução de haploidia para cruzamento com o híbrido indutor TAILP1 x TAILP2. Posteriormente, foram colhidas as espigas de cada genótipo-fonte induzido a haploidia e feita a seleção de sementes haploides, se procedendo à duplicação cromossômica para obtenção de duplo-haploides pelo protocolo *root deeping* (Deimiling et al. 1997; Couto et al. 2015). As descrições detalhadas dos procedimentos adotados para obtenção de haploides serão feitas nos tópicos a seguir.

Houve perda de plantas dos 36 genótipos-fonte originais devido a ineficiência nos processos de indução e/ou duplicação, morte de plantas ou quantidade insuficiente de sementes, resultando em 23 linhagens DH para teste (Tabela 1). Assim, a seleção das linhagens foi baseada na quantidade de sementes disponíveis (mínimo de 150 sementes) para cruzamento em dialelo parcial.

**Tabela 1** - Tipos de populações-fonte, processo de obtenção de haploides e duplo-haploides, e, linhagens duplo-haploides selecionadas para o dialelo parcial

Genótipos-fonte induzidas a haploidia	Haploides obtidos após indução de cada genótipo-fonte	DHs obtidos após duplicação cromossômica de cada haploide	Linhagens DHs selecionadas para o dialelo parcial
Grupo heterótico Flint			
G1F <sub>1</sub>	G1F <sub>1</sub>	G1F <sub>1</sub>	G1F <sub>1</sub>
G1F <sub>2</sub>	G1F <sub>2</sub>	G1F <sub>2</sub>	G1F <sub>2</sub>
G1S <sub>1</sub>	G1S <sub>1</sub>	G1S <sub>1</sub>	G1S <sub>1</sub>
G2F <sub>1</sub>	G2F <sub>1</sub>	G2F <sub>1</sub>	G2F <sub>1</sub>
G2F <sub>2</sub>	G2F <sub>2</sub>		
G2S <sub>1</sub>	G2S <sub>1</sub>	G2S <sub>1</sub>	G2S <sub>1</sub>
G3F <sub>1</sub>	G3F <sub>1</sub>		

**Tabela 1** - Tipos de populações-fonte, processo de obtenção de haploides e duplo-haploides, e, linhagens duplo-haploides selecionadas para o dialelo parcial

Genótipos-fonte induzidas a haploidia	Haploides obtidos após indução de cada genótipo-fonte	DHs obtidos após duplicação cromossômica de cada haploide	Linhagens DHs selecionadas para o dialelo parcial
G3F <sub>2</sub>	G3F <sub>2</sub>		
G3S <sub>1</sub>	G3S <sub>1</sub>		
G4F <sub>1</sub>	G4F <sub>1</sub>	G4F <sub>1</sub>	G4F <sub>1</sub>
G4F <sub>2</sub>	G4F <sub>2</sub>	G4F <sub>2</sub>	G4F <sub>2</sub>
G4S <sub>1</sub>	G4S <sub>1</sub>	G4S <sub>1</sub>	G4S <sub>1</sub>
G5F <sub>1</sub>	G5F <sub>1</sub>	G5F <sub>1</sub>	G5F <sub>1</sub>
G5F <sub>2</sub>	G5F <sub>2</sub>	G5F <sub>2</sub>	
G5S <sub>1</sub>	G5S <sub>1</sub>	G5S <sub>1</sub>	G5S <sub>1</sub>
G6F <sub>1</sub>	G6F <sub>1</sub>	G6F <sub>1</sub>	G6F <sub>1</sub>
G6F <sub>2</sub>	G6F <sub>2</sub>	G6F <sub>2</sub>	G6F <sub>2</sub>
G6S <sub>1</sub>	G6S <sub>1</sub>	G6S <sub>1</sub>	
Grupo heterótico Dent			
G7F <sub>1</sub>	G7F <sub>1</sub>		
G7F <sub>2</sub>	G7F <sub>2</sub>		
G7S <sub>1</sub>	G7S <sub>1</sub>		
G8F <sub>1</sub>	G8F <sub>1</sub>	G8F <sub>1</sub>	G8F <sub>1</sub>
G8F <sub>2</sub>	G8F <sub>2</sub>	G8F <sub>2</sub>	G8F <sub>2</sub>
G8S <sub>1</sub>	G8S <sub>1</sub>	G8S <sub>1</sub>	G8S <sub>1</sub>
G9F <sub>1</sub>	G9F <sub>1</sub>	G9F <sub>1</sub>	G9F <sub>1</sub>
G9F <sub>2</sub>	G9F <sub>2</sub>	G9F <sub>2</sub>	G9F <sub>2</sub>
G9S <sub>1</sub>	G9S <sub>1</sub>	G9S <sub>1</sub>	G9S <sub>1</sub>
G10F <sub>1</sub>	G10F <sub>1</sub>	G10F <sub>1</sub>	G10F <sub>1</sub>
G10F <sub>2</sub>	G10F <sub>2</sub>	G10F <sub>2</sub>	G10F <sub>2</sub>
G10S <sub>1</sub>	G10S <sub>1</sub>	G10S <sub>1</sub>	
G11F <sub>1</sub>	G11F <sub>1</sub>		
G11F <sub>2</sub>	G11F <sub>2</sub>	G11F <sub>2</sub>	G11F <sub>2</sub>
G11S <sub>1</sub>	G11S <sub>1</sub>		
G12F <sub>1</sub>	G12F <sub>1</sub>	G12F <sub>1</sub>	G12F <sub>1</sub>
G12F <sub>2</sub>	G12F <sub>2</sub>		
G12S <sub>1</sub>	G12S <sub>1</sub>	G12S <sub>1</sub>	G12S <sub>1</sub>

#### 5.4.2. Obtenção de duplo-haploides via duplicação cromossômica

O campo de indução de haploidia foi implantado em dezembro de 2017, com fileiras individuais dos genótipos-fonte intercaladas pelo híbrido indutor de haploidia gimnogenético TAIL P1 x TAIL P2, na proporção 1:1. O plantio do campo se deu de forma mecanizada, sendo efetuado despendoamento dos genótipos-fonte a fim de se ter apenas o pólen do híbrido indutor de haploidia. Na colheita, em abril de 2018, as espigas dos genótipos-fonte foram identificadas quanto à origem e grupo heterótico (Tabela 1). Durante o período de indução de haploidia, as

condições climáticas do campo de indução foram de 500 mm de pluviosidade, 25,9 °C de temperatura média, com temperatura máxima de 33 °C e média de 75% de umidade relativa do ar. O plantio foi feito sob irrigação de aspersão, e os demais tratos culturais foram efetuados conforme as exigências da cultura do milho (Pereira Filho e Borghi, 2016).

Entre abril e agosto de 2018, as sementes haploides foram selecionadas visualmente com auxílio de lupa de aumento, com base no marcador *RI-navajo* (*RI-nj*) que codifica pigmentação púrpura no endosperma e embrião das sementes, sendo os haploides separados pela ausência de pigmentação púrpura no embrião. Para cada genótipo-fonte foram separadas 50 sementes haploides de cada geração (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e S<sub>1</sub> - Tabela 1) totalizando em média 150 sementes.

Em janeiro de 2019, as sementes haploides selecionadas foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita. Adotou-se o intervalo de três dias entre plantios de dois genótipos-fonte de cada grupo heterótico (Flint e Dent), visando reduzir o número de indivíduos para duplicação cromossômica, totalizando cinco épocas de semeadura. Estas bandejas ficaram acondicionadas em casa de vegetação climatizada, com temperatura em torno de 25 °C e umidade relativa do ar em torno de 60%. Após 15 dias de emergência das sementes haploides foi efetuada a duplicação cromossômica para a obtenção de linhagens DH.

A duplicação cromossômica foi realizada no laboratório de DH da Embrapa Milho e Sorgo, entre janeiro e fevereiro de 2019, em cinco épocas, no intervalo de oito dias entre cada época. Para o procedimento, foi adotado o protocolo *root deeping* (Deimiling et al. 1997; Couto et al. 2015), no qual às plântulas foram retiradas das bandejas plásticas, sendo o sistema radicular lavado em água corrente. Em seguida, foram constituídos grupos de 25 plântulas/geração de cada genótipo-fonte, que foram transferidas para béqueres de 600 mL. Para duplicação cromossômica, foram preparados 10 L de solução composta pelos reagentes: colchicina (1% m/v), dimetilsulfóxido (1% v/v) e Tween20 (1% v/v). Esta solução foi distribuída em todos os béqueres com plântulas, no volume de 200 mL. As plântulas haploides foram mantidas por seis horas em solução contendo colchicina, seguindo-se a lavagem das mesmas por aspersão por 30 minutos, para remoção de resíduos de solução. Em sequência, as plântulas DH foram transplantadas para bandejas plásticas contendo substrato comercial, sendo mantidas em casa de vegetação por 20 dias, antes do transplante definitivo. Em fevereiro de 2019, as plântulas DH foram transplantadas em casa de vegetação para vasos de 20 L com solo adubado com dosagem equivalente a 2000 kg/ha de 4-28-16 (N-P-K) + Zn, sendo três plântulas por vaso, identificadas de acordo com o genótipo-fonte e geração. O manejo posterior ao transplante definitivo foi efetuado conforme as exigências da cultura (Amaral Filho et al.

2005), sendo realizadas duas adubações de cobertura, com 30 g de sulfato de amônia no estágio V5 e 16 g de uréia em V8.

Na antese das linhagens DHs foram realizadas autofecundações para multiplicação de sementes de cada linhagem. A colheita foi feita em julho de 2019, de forma manual, identificando-se cada DH conforme o genótipo-fonte e origem. Para alguns genótipos-fonte, a duplicação cromossômica não foi efetiva, não havendo produção de pólen para autofecundação.

Após a colheita da geração D<sub>0</sub> (primeira geração de DHs após duplicação cromossômica), realizou-se novo plantio das sementes DH, para obtenção da geração D<sub>1</sub> dos genótipos-fonte F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, e S<sub>1</sub> em vasos de 20 L. As plântulas receberam tratamentos culturais conforme as exigências da cultura e foram autofecundadas por ocasião da antese. Em fevereiro de 2020, houve a colheita das espigas D<sub>1</sub>, para as próximas etapas do trabalho.

#### 5.4.3. Cruzamentos dialélicos entre DHs e testadores de diferentes grupos heteróticos

Dos genótipos obtidos na etapa anterior, foram selecionadas 23 linhagens DHs, sendo 12 do grupo Flint e 11 do grupo Dent. Esses genótipos foram cruzados com 12 testadores, a saber: 4 testadores Flint (531542, 51000290-11, 9160006-3 e 521274), 4 testadores Dent (521236, 5702955, 9150130-4 e 541007) e 4 testadores de grupo heterótico intermediário (L20, L843, L724 e L1017), que podem resultar em combinações superiores tanto com genótipos do grupo Flint, quanto do grupo Dent (Silva et al., 2019). Os cruzamentos foram realizados em esquema de dialelo parcial, conforme esquema apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Esquema de cruzamento em dialelo parcial entre as linhagens duplo-haploides e os 12 testadores utilizados no experimento

Linhagens dos grupos Flint e Dent	Testadores do grupo heterótico intermediário			
	L20	L843	L724	L1017
1. G1F <sub>1</sub>	1x1	1x2	1x3	1x4
2. G1F <sub>2</sub>	2x1	2x2	2x3	2x4
3. G1S <sub>1</sub>	3x1	3x2	3x3	3x4
4. G2F <sub>1</sub>	4x1	4x2	4x3	4x4
5. G2S <sub>1</sub>	5x1	5x2	5x3	5x4
6. G4F <sub>1</sub>	6x1	6x2	6x3	6x4
7. G4F <sub>2</sub>	7x1	7x2	7x3	7x4
8. G4S <sub>1</sub>	8x1	8x2	8x3	8x4
9. G5F <sub>1</sub>	9x1	9x2	9x3	9x4
10. G5S <sub>1</sub>	10x1	10x2	10x3	10x4
11. G6F <sub>1</sub>	11x1	11x2	11x3	11x4

**Tabela 2** - Esquema de cruzamento em dialelo parcial entre as linhagens duplo-haploides e os 12 testadores utilizados no experimento

12. G6F <sub>2</sub>	12x1	12x2	12x3	12x4
13. G8F <sub>1</sub>	13x1	13x2	13x3	13x4
14. G8F <sub>2</sub>	14x1	14x2	14x3	14x4
15. G8S <sub>1</sub>	15x1	15x2	15x3	15x4
16. G9F <sub>1</sub>	16x1	16x2	16x3	16x4
17. G9F <sub>2</sub>	17x1	17x2	17x3	17x4
18. G9S <sub>1</sub>	18x1	18x2	18x3	18x4
19. G10F <sub>1</sub>	19x1	19x2	19x3	19x4
20. G10F <sub>2</sub>	20x1	20x2	20x3	20x4
21. G11F <sub>2</sub>	21x1	21x2	21x3	21x4
22. G12F <sub>1</sub>	22x1	22x2	22x3	22x4
23. G12S <sub>1</sub>	23x1	23x2	23x3	23x4
<hr/>				
<b>Linhagens DH</b>	<b>Testadores Dent</b>			
<b>Flint</b>	<b>521236</b>	<b>5702955</b>	<b>9150130-4</b>	<b>541007</b>
<hr/>				
1. G1F <sub>1</sub>	1x1	1x2	1x3	1x4
2. G1F <sub>2</sub>	2x1	2x2	2x3	2x4
3. G1S <sub>1</sub>	3x1	3x2	3x3	3x4
4. G2F <sub>1</sub>	4x1	4x2	4x3	4x4
5. G2S <sub>1</sub>	5x1	5x2	5x3	5x4
6. G4F <sub>1</sub>	6x1	6x2	6x3	6x4
7. G4F <sub>2</sub>	7x1	7x2	7x3	7x4
8. G4S <sub>1</sub>	8x1	8x2	8x3	8x4
9. G5F <sub>1</sub>	9x1	9x2	9x3	9x4
10. G5S <sub>1</sub>	10x1	10x2	10x3	10x4
11. G6F <sub>1</sub>	11x1	11x2	11x3	11x4
12. G6F <sub>2</sub>	12x1	12x2	12x3	12x4
<hr/>				
<b>Linhagens DH</b>	<b>Testadores Flint</b>			
<b>Dent</b>	<b>531542</b>	<b>5100290 – 11</b>	<b>9160006-3</b>	<b>521274</b>
<hr/>				
13. G8F <sub>1</sub>	13x1	13x2	13x3	13x4
14. G8F <sub>2</sub>	14x1	14x2	14x3	14x4
15. G8S <sub>1</sub>	15x1	15x2	15x3	15x4
16. G9F <sub>1</sub>	16x1	16x2	16x3	16x4
17. G9F <sub>2</sub>	17x1	17x2	17x3	17x4
18. G9S <sub>1</sub>	18x1	18x2	18x3	18x4
19. G10F <sub>1</sub>	19x1	19x2	19x3	19x4
20. G10F <sub>2</sub>	20x1	20x2	20x3	20x4
21. G11F <sub>2</sub>	21x1	21x2	21x3	21x4
22. G12F <sub>1</sub>	22x1	22x2	22x3	22x4
23. G12S <sub>1</sub>	23x1	23x2	23x3	23x4
<hr/>				

O campo de cruzamento foi implantado em março de 2020, nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG. O plantio foi feito de forma mecanizada, sendo cada linhagem DH semeada em uma fileira de 4,2 m, espaçada de 0,7 m, sendo os testadores plantados no início do campo, em oito fileiras de 4,2 m x 0,7 m, resultando em 192 fileiras totais. No plantio, foi utilizada adubação de 500 kg/ha de 4-28-16 (N-P-K) + 0,3% B, e após 40 dias de plantio foi realizada a adubação de cobertura com 300 kg/ha de ureia, . Os demais tratamentos culturais foram efetuados conforme as exigências da cultura (Amaral Filho et al. 2005).

Para obtenção dos híbridos entre DHs e testadores, foram realizados cruzamentos, totalizando 184 cruzamentos (Tabela 2). Contudo, alguns cruzamentos tiveram baixa produção de sementes, resultando em 146 híbridos DHs, com volume de sementes passível de avaliação. Efetuou-se a colheita em novembro de 2020, sendo as espigas identificadas quanto ao cruzamento e origem dos híbridos.

#### **5.4.4. Avaliação do dialelo em diferentes níveis de adubação**

O plantio dos ensaios para avaliação do dialelo parcial foi realizado em dezembro de 2020, em delineamento látice 13 x 13, com duas repetições, sendo avaliados 146 híbridos derivados de linhagens DHs (76 Flint e 70 Dent), e 23 testemunhas, sendo oito híbridos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo e 15 híbridos comerciais, totalizando 169 genótipos em avaliação.

Este ensaio foi implantado em duas áreas distintas: uma considerada de com adubação, utilizando adubação de base de acordo com o recomendado para a cultura do milho em áreas de alta tecnologia (Amaral Filho et al. 2005), com aplicação de 500 kg/ha de 08-28-16 + 0,3% Boro; e em uma segunda área, que não recebeu adubação de plantio. O plantio foi feito mecanicamente utilizando plantadeira de parcelas, com linhas duplas de 4,2 m para cada tratamento, espaçadas em 0,7 m. Posterior ao plantio, foram realizadas aplicações de herbicidas pós-emergentes e aplicações de inseticidas para controle de pragas (formigas, cigarrinha e lagartas). Os demais tratamentos culturais foram realizados conforme as recomendações para a cultura do milho (Amaral Filho et al., 2005).

Durante o experimento, nos dois ambientes de avaliação, foram coletadas as seguintes características: i) altura de planta (AP): altura média das plantas da parcela, medida da base do colmo até à inserção da folha bandeira, em cm; ii) altura de inserção de espiga (AE): altura

média da inserção da primeira espiga das plantas da parcela, medida da base do colmo até à inserção da primeira espiga, em cm, iii) Tombamento (TOMB): total de plantas tombadas e quebradas por parcela; iv) estande final (ST): número total de plantas por parcela; v) umidade de grãos na colheita (UG) e; vi) Produtividade de grãos por parcela, convertido para t/ha (PROD): obtido pela conversão de quilos por parcela para toneladas por hectare, padronizado a 13% de umidade dos grãos. As características i a iv foram tomadas durante o ciclo da cultura, e UG e PROD foram tomadas na colheita, em maio de 2021, com o uso de colheitadeira de parcelas com determinador de peso e umidade de grãos.

#### 5.4.5. Análises estatísticas

Os dados de AP, AE, TOMB, ST, UG e PROD foram submetidos à análise estatística, considerando delineamento em látice, com duas repetições e 13 blocos, e efeitos fixos de genótipos. Inicialmente, procedeu-se a análise individual de variância em látice para cada local, seguindo-se a análise conjunta, envolvendo os dois níveis de adubação. Os seguintes componentes genéticos de variância foram estimados em cada local:

$$\Phi_g = \frac{QMG - QMR}{r}$$

$\Phi_g$ : componente quadrático genotípico;

QMG: quadrado médio de genótipo;

QMR: quadrado médio de resíduo;

r: repetição.

$$\Phi_f = \Phi_g + \sigma^2 \quad \text{em que: } \sigma^2 = QMR$$

$\Phi_f$ : componente quadrático fenotípico;

$\sigma^2$ : variância ambiental.

$$H^2 = \frac{\Phi_g}{\Phi_f}$$

$H^2$ : coeficiente de determinação.

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$\mu$ : média geral.

$$CVe = \frac{100\sqrt{QMR}}{\hat{\mu}}$$

CVe: coeficiente de variação experimental.

$$CV_g = \frac{100\sqrt{\Phi_g}}{\hat{\mu}}$$

$CV_g$  : coeficiente de variação genético.

$$\frac{CV_g}{CVe} = \sqrt{\frac{\Phi_g}{\sigma^2}}$$

$CV_g/CVe$ : razão do coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação experimental.

As médias das combinações híbridas foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade (Tabela 3 – Anexos). A amplitude da variabilidade das médias para cada característica e nível de adubação foi representada por box-plot. Foram realizados também contrastes ortogonais em cada nível de adubação entre os híbridos derivados de linhagens DHs e as testemunhas para todas as características avaliadas, comparando-se os desempenhos de cada genótipo-fonte ( $F_1$ ,  $F_2$  e  $S_1$ ) com as testemunhas experimentais. Foi estimado também a correlação entre as características nos ambientes com e sem adubação.

A análise dialélica parcial entre o grupo de linhagens DH e as linhagens testadoras de diferentes grupos heteróticos foi realizada, seguindo o método II de Griffing (1956) que estima os efeitos da capacidade geral (CGC), e específica (CEC) de combinação (Cruz et al. 2012). O modelo estatístico para análise conjunta dialélica parcial com apenas as gerações  $F_1$ 's é dado por:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + g'_j + s_{ij} + a_k + ga_{ik} + ga_{jk} + sa_{ijk} + \bar{\epsilon}_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, p$ ;  $j = 1, 2, \dots, q$  e  $k=1$  e  $2$

em que:

$Y_{ij}$ : valor médio da combinação híbrida entre o  $i$ -ésimo progenitor do grupo 1 e o  $j$ -ésimo progenitor do grupo 2;

$\mu$ : média geral;

$g_i$ : efeito da capacidade geral de combinação do  $i$ -ésimo progenitor do grupo 1;

$g'_j$ : efeito da capacidade geral de combinação do  $j$ -ésimo progenitor do grupo 2;

$s_{ij}$ : efeito da capacidade específica de combinação entre progenitores de ordem  $i$  e  $j$ , dos grupos 1 e 2, respectivamente;

$a_k$ : efeito do ambiente  $k$ ;

$ga_{ik}$  e  $ga_{jk}$ : efeitos da interação entre a capacidade geral de combinação associados ao  $i$  e  $j$ -ésimo progenitor, dos grupos 1 e 2, respectivamente, com os ambientes;

$sa_{ijk}$ : efeito da interação entre a capacidade específica de combinação entre os progenitores  $i$  e  $j$  e o ambiente;

$\bar{\epsilon}_{ij}$  : erro experimental médio.

Todas as análises foram efetuadas com o auxílio dos softwares Genes (Cruz, 2013) e Sisvar (Ferreira, 2019).

## 5.5. Resultados e Discussão

### 5.5.1. Desempenho agrônômico de híbridos de milho derivados de linhagens duplo-haploides

Constatou-se a existência de variabilidade entre as médias dos genótipos obtidos, tanto com quanto sem adubação (Tabela 3). Houve efeito significativo de ambiente para todos os caracteres, as quais podem interferir na expressão final do fenótipo. Verifica-se que a interação genótipo x ambiente também foi significativa, exceto para altura de planta e altura de espiga, denotando que há existência de um comportamento diferenciado dos genótipos em função dois níveis de adubação, o que pode indicar genótipos com desempenho destacado em cada ambiente.

**Tabela 3** - Estimativas de quadrado médio da análise conjunta de variância para seis características agrônômicas em dois níveis de fertilidade (com e sem adubação), avaliadas em híbridos simples derivados de linhagens duplo-haploides e com testemunhas experimentais e comerciais

FV	GI	Quadrado Médio					
		AP	AE	TOMB	ST	UG	PROD
Genótipos	168	1242,28**	1080,91**	131,67**	120,43**	7,58**	12,83**
Ambiente <sup>1</sup>	1	14912,16**	9099,00**	2672,09**	1273,94**	604,02**	6,84**
GxA <sup>2</sup>	168	208,31 <sup>ns</sup>	145,05 <sup>ns</sup>	23,67**	23,82**	1,57**	1,44**
Resíduo	288	212,04	156,33	15,93	8,29	1,00	0,57

\*\* nível de significância a 1%; <sup>ns</sup> não significativo. AP = altura de planta, AE = altura de espiga, TOMB = tombamento, ST = estande, UG = umidade de grãos e PROD = produtividade. <sup>1</sup>

Ambiente = doses de adubo (0 e 500 kg/ha);<sup>2</sup> Interação Genótipo x Ambientes.

Nardino et al. (2017) apontaram efeitos significativos para híbridos, locais de cultivo e para interação híbridos x locais de cultivos em genótipos de milho em cinco ambientes distintos no Sul do Brasil para altura de planta, altura de espiga e rendimento de grãos por parcela, e recomendaram a análise conjunta do desempenho dos híbridos nos diferentes ambientes como estratégia para seleção dos melhores cruzamentos. Na cultura do milho, existe uma forte interação genótipos x ambientes devido à diversidade entre locais de cultivo e a magnitude da

base genética dos genótipos (Aguiar et al. 2004; Souza Neto et al. 2015).

Nos ambientes com e sem adubação, houve elevada variância genotípica e fenotípica entre as progênies (Tabela 4). Os valores da variância genotípica foram inferiores aos da variância fenotípica, indicando efeitos de ambiente e epistasia na composição deste último parâmetro. A maior variabilidade genética possibilita que métodos de melhoramento mais simples possam ser aplicados. Os valores do coeficiente de determinação genotípico e da relação  $CV_g/ CV_e$  para as características agronômicas em estudo, indicam a viabilidade de melhoramento destas características na geração posterior por seleção das melhores progênies.

**Tabela 4** - Estimativa de componentes quadráticos de variância para seis características agronômicas em dois níveis de fertilidade (com e sem adubação), avaliadas em híbridos derivados de linhagens duplo-haploides e testemunhas experimentais e comerciais.

<b>Com adubação</b>						
<b>Componentes de variância</b>	<b>AP</b>	<b>AE</b>	<b>TOMB</b>	<b>ST</b>	<b>UG</b>	<b>PROD</b>
$\Phi_g$	201,77	205,08	45,70	26,30	1,19	3,54
$\Phi_f$	319,31	261,16	56,01	30,93	1,66	3,87
$H^2$	0,63	0,78	0,81	0,85	0,71	0,91
Média	227,63	129,42	7,89	37,89	14,94	5,05
$CV_e$	6,73	8,18	57,48	8,02	6,47	15,87
$CV_g$	6,24	11,06	85,61	13,53	7,32	37,25
$CV_g/CV_e$	0,92	1,35	1,48	1,68	1,13	2,34
<b>Sem adubação</b>						
$\Phi_g$	311,48	251,64	16,02	37,53	2,38	3,02
$\Phi_f$	405,99	351,89	21,66	41,20	2,91	3,26
$H^2$	0,76	0,71	0,73	0,91	0,81	0,92
Média	218,23	122,08	3,92	35,15	16,83	4,85
$CV_e$	6,29	11,59	85,64	7,70	6,12	14,51
$CV_g$	8,08	12,99	102,12	17,42	9,16	35,80
$CV_g/CV_e$	1,28	1,12	1,19	2,26	1,49	2,46

$\Phi_g$ =componente quadrático genotípico;  $\Phi_f$ =componente quadrático fenotípico;  $H^2$ =coeficiente de determinação genotípico;  $CV_e$  = coeficiente de variação experimental;  $CV_g$ = coeficiente de variação genético. AP = altura de planta, AE = altura de espiga, TOMB = tombamento, ST = estande, UG = umidade de grãos e PROD = produtividade.

Os maiores ganhos genéticos são proporcionados pelos caracteres com maior coeficiente genético (Cruz et al. 2012). Pelos valores do coeficiente de variação e média é possível avaliar o potencial agronômico dos genótipos. Nos dois ambientes, o maior coeficiente de determinação e coeficiente de variação genético foram para estande, tombamento e produtividade, o que permite o uso de estratégias de seleção mais simples para ganhos de seleção nestas características (Borém et al. 2017).

A minimização da influência ambiental e a maior variabilidade genética indica melhor predição de ganho genético. Sob adubação, o maior coeficiente de determinação e relação  $CV_g/CVe$  foi observada para produtividade, enquanto que, sem adubação, as características de maior coeficiente de determinação e relação  $CV_g/CVe$  foram estande e produtividade.

Os caracteres umidade de grãos, estande, altura de planta, altura de espiga e produtividade apresentaram valores de  $CVe$  abaixo de 20%. Para características quantitativas, tais como as avaliadas, no presente trabalho o valor do coeficiente de variação apresenta boa precisão experimental (Cruz et al. 2012). O elevado coeficiente de variação para tombamento é explicado pela variação natural da característica, que pode ir de zero até todo o estande da parcela. O  $CVe$  depende da característica e da estrutura genética das populações avaliadas (Maioli et al. 2020). Observando os valores dos componentes genéticos de variância, a maior potencialidade dos genótipos é expressa no ambiente com adubação.

Os coeficientes de correlação fenotípica (Tabela 5) indicam a associação entre os caracteres em estudo, Com adubação, observou-se alta correlação entre altura de espiga e altura de planta. As análises de correlação indicam que a produtividade foi desfavorecida pelo tombamento de plantas, que implicam em perda de plantas na parcela. No entanto, a produtividade teve correlação positiva com altura de planta e estande. A produtividade pode ser favorecida por estas características.

**Tabela 5** - Coeficientes de correlações fenotípicas entre seis características agronômicas em dois níveis de fertilidade (com e sem adubação), avaliadas em híbridos simples derivados de linhagens duplo-haploides e em testemunhas experimentais e comerciais.

Caracteres	Com adubação						
	UG	ST	TOMB.	AP	AE	PROD	
Sem adubação	UG		0,016*	-0,152	0,164	0,006	0,240
	ST	-0,031*		0,054	0,449	0,407	0,427
	TOMB	-0,197	0,025		-0,093	0,126	-0,477**
	AP	0,329	0,516	-0,001		0,743	0,430
	AE	0,242	0,414	0,093	0,793		0,368
	PROD	0,342	0,574	-0,347*	0,563	0,410	

AP = altura de planta, AE = altura de espiga, TOMB = tombamento, ST = estande, UG = umidade de grãos e PROD = produtividade

Na ausência de adubação observa-se alta correlação da altura de espiga e altura de planta. A produtividade apresentou correlação negativa com o tombamento, e correlação positiva com a altura de planta, altura de espiga e estande. Observa-se que no ambiente sem adubação, as características agronômicas, estande e altura de planta foram mais expressivos do que no ambiente com adubação. Ribeiro et al. (2016) destacam a altura de planta como uma característica que afeta a produção de grãos.

Faria e Oliveira (2019) também observaram a alta correlação linear entre altura de espiga e altura de planta. Em uma avaliação via análise de trilha, Silva et al. (2016) observaram efeito direto e positivo do estande sobre a produção de grãos e negativo do tombamento sobre a produtividade, destacando que a seleção de genótipos menos suscetíveis ao acamamento e quebraimento podem resultar em aumento de produtividade.

Na Tabela 6 estão apresentados os contrastes ortogonais entre característica agronômicas avaliadas em DH oriundos de genótipos-fonte de diferentes gerações de endogamia e testemunhas experimentais, sob condições de adubação. Para tombamento não houve diferença significativa para todos os contrastes ortogonais, indicando que DHs teriam um desempenho equivalente a genótipos comerciais em condições de lavoura quanto ao acamamento e quebraimento.

Para umidade de grãos, houve diferença significativa para o contraste DHsF<sub>1</sub> vs Test, indicando maior precocidade no grupo de híbridos derivados de DHs. Para estande, altura de planta, altura de espiga e produtividade, houve diferenças significativas entre híbridos derivados de linhagens duplo-haploides e testemunhas em todas as situações, evidenciando efeito de gerações, e principalmente, de heterose no desempenho agrônômico destes híbridos.

**Tabela 6** - Contrastes ortogonais entre híbridos simples derivados de doze linhagens duplo-haploides (DHs) (Flint e Dent) nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, e doze linhagens testadoras (Flint, Dent e Intermediário) *versus* testemunhas (Test.) no ambiente com e sem adubação para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), estande(ST), umidade de grãos(UG) e produtividade(PROD)

<b>Com adubação</b>						
<b>Características Agronômicas</b>	<b>DHs vs Testemunhas</b>			<b>DHsF<sub>1</sub> vs Testemunhas</b>		
	Médias DHs	Médias Test.	Contraste	Médias DHsF <sub>1</sub>	Médias Test.	Contraste
AP	229,98	212,71	38,309**	229,82	212,71	24,706**
AE	131,66	115,21	47,307**	132	115,21	33,276**
TOMB	7,66	7,63	0,009 <sup>ns</sup>	9,26	7,63	1,490 <sup>ns</sup>
ST	38,94	31,26	115,395**	38,54	31,26	69,566**
UG	14,86	15,02	0,772 <sup>ns</sup>	14,51	15,02	4,685*
PROD	3,14	2,19	69,393**	2,97	2,19	38,451**
<b>Características Agronômicas</b>	<b>DHsF<sub>2</sub> vs Testemunhas</b>			<b>DHsS<sub>1</sub> vs Testemunhas</b>		
	Médias DHsF <sub>2</sub>	Médias Test.	Contraste	Médias DHsS <sub>1</sub>	Médias Test.	Contraste
AP	235,61	212,71	44,225**	224,90	212,71	12,534**
AE	134,59	115,21	43,228**	128	115,21	20,289**
TOMB	7,04	7,63	0,195 <sup>ns</sup>	6,90	7,63	0,294 <sup>ns</sup>
ST	39,02	31,26	78,933**	39,19	31,26	82,590**
UG	15,30	15,02	1,365 <sup>ns</sup>	14,75	15,02	1,338 <sup>ns</sup>
PROD	3,29	2,19	54,126**	3,14	2,19	46,881**

**Tabela 6** - Contrastes ortogonais entre híbridos simples derivados de doze linhagens duplo-haploides (DHs) (Flint e Dent) nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, e doze linhagens testadoras (Flint, Dent e Intermediário) *versus* testemunhas (Test.) no ambiente com e sem adubação para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), estande(ST), umidade de grãos(UG) e produtividade(PROD)

Sem adubação						
Características Agronômicas	DHs vs Test.			DHsF <sub>1</sub> vs Test.		
	Médias DHs	Médias Test.	Contraste	Médias DHsF <sub>1</sub>	Médias Test.	Contraste
AP	220,89	198,36	52,381**	220	198,36	31,623**
AE	124,45	105,86	45,721**	124,68	105,86	30,796**
TOMB	3,46	4,08	0,705 <sup>ns</sup>	3,85	4,08	0,106 <sup>ns</sup>
ST	36,18	28,86	86,282**	36,26	28,86	56,821**
UG	16,84	16,75	0,069 <sup>ns</sup>	16,30	16,75	1,938 <sup>ns</sup>
PROD	3,11	2,14	74,358**	3,04	2,14	46,609**
Características Agronômicas	DHsF <sub>2</sub> vs Test.			DHsS <sub>1</sub> vs Test.		
	Médias DHsF <sub>2</sub>	Médias Test.	Contraste	Médias DHsS <sub>1</sub>	Médias Test.	Contraste
AP	226,91	198,36	56,351**	215,95	198,36	21,141**
AE	128,87	105,86	46,152**	120	105,86	17,807**
TOMB	3,11	4,08	1,149 <sup>ns</sup>	3,50	4,08	0,436 <sup>ns</sup>
ST	36,14	28,86	58,511**	36,16	28,86	57,240**
UG	17,56	16,75	7,417**	16,55	16,75	0,471 <sup>ns</sup>
PROD	3,23	2,14	55,153**	3,06	2,14	47,178**

\*\* nível de significância a 1%; <sup>ns</sup> não significativo

A Tabela 7 indica que, no ambiente sem adubação, o comportamento dos híbridos derivados de linhagens DH e das testemunhas foram semelhantes à com adubação em todas as características agronômicas, denotando que as diferenças entre as duas classes de genótipos são derivadas de efeitos genéticos, que se manifestam independentemente do nível de fertilidade do ambiente, apesar da interação entre doses de adubo detectada pela análise de variância (Tabela 3).

Para umidade de grãos, houve diferença significativa dos contrastes apenas para DHsF<sub>2</sub> vs Testemunhas, em que a média dos híbridos derivados de linhagens duplo-haploides na geração F<sub>2</sub> diferiu das médias das testemunhas. Para tombamento, não houve diferença significativa para todos os contrastes ortogonais. Para estande, altura de planta, altura de espiga e produtividade, houve diferença significativa para os contrastes DHs vs Test., DHsF<sub>1</sub> vs Test., DHsF<sub>2</sub> vs Test. e DHsS<sub>1</sub> vs Test.

No ambiente com adubação (Tabela 6), os híbridos apresentaram médias menores do que as testemunhas em umidade de grãos, com exceção aos híbridos na geração F<sub>2</sub>, e médias maiores para estande, altura de planta, altura de espiga e produtividade. No ambiente sem adubação (Tabela 6), as médias dos híbridos foram maiores quanto comparados às testemunhas para estande, altura de planta, altura de espiga e produtividade. Para a característica agrônômica umidade de grãos, os híbridos apresentaram médias maiores às testemunhas, apenas na geração F<sub>2</sub>. Nos dois ambientes, o tombamento não apresentou diferença significativa entre os híbridos e testemunhas, mas sem adubação, as médias dos híbridos tendem a ser menores do que as testemunhas.

Foram encontradas diferenças significativas no contraste DHs vs Testemunhas para altura de planta e altura de espiga, indicando a possibilidade de sucesso na seleção de linhagens promissoras para a obtenção de populações-base (Oliboni et al. 2013).

Em adição a estes dados, a aplicação do teste de Scott-Knott sob as médias obtidas dos híbridos com e sem adubação resultou em agrupamentos distintos em cada ambiente (Tabela 1 - anexos). Com adubação, houve a formação de três grupos para altura de planta e altura de espiga, enquanto que, para umidade de grãos e tombamento houve a formação de quatro grupos. Os maiores grupos foram formados para estande e produtividade, seis e sete grupos, respectivamente. Sem adubação, houve a formação de três grupos para altura de planta e tombamento. Para umidade de grãos houve a formação de quatro grupos. Os maiores grupos foram formados para estande e altura de espiga e produtividade. Para estande e altura de espigas foram cinco grupos e seis grupos, para produtividade.

**Tabela 7-** Médias dos 15 híbridos mais produtivos em com adubação para seis características de interesse agrônômico em dois níveis de fertilidade (com adubação e sem adubação).

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PRD	
	A1	A2	A1	A1	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
G5S <sub>1</sub> x 9150130-4	245Aa	243 Aa	140 Aa	140 Ac	2 Ad	1 Ac	42 Aa	38 Aa	17,5 Ab	18,5 Aa	10,4 Aa	9,1 Aa
G4F <sub>1</sub> -3 x 9150130-4	233 Aa	215 Ab	128 Aa	105 Ad	1 Ad	1 Ac	41 Aa	38 Aa	17,5 Ab	17,5 Ab	9,8 Aa	7,0 Bb
G4F <sub>2</sub> -1 x 9150130-4	243 Aa	228 Aa	130 Aa	118 Ad	1 Ad	1 Ac	41 Aa	39 Aa	19,0 Aa	20,0 Aa	8,9 Ab	7,9 Aa
G4F <sub>1</sub> -3 x 541007	218 Ab	218 Aa	128 Aa	128 Ac	1 Ad	1 Ac	43 Aa	41 Aa	13,5 Bd	17,0 Ab	8,8 Ab	7,8 Aa
G5S <sub>1</sub> x L1017	230 Aa	223 Aa	153 Aa	133 Ac	1 Ad	2 Ac	38 Aa	26 Bc	16,0 Ac	18,0 Ab	8,8 Ab	6,1 Bc
G8F <sub>2</sub> -3 x 5100290-11	238 Aa	245 Aa	125 Ab	110 Ad	1 Ad	1 Ac	40 Aa	37 Aa	16,0 Bc	18,5 Aa	8,7 Ab	7,6 Aa
G5S <sub>1</sub> x L724	248 Aa	230 Aa	145 Aa	130 Ac	1 Ad	1 Ac	42 Aa	40 Aa	15,5 Bc	18,0 Ab	8,6 Ab	7,3 Ab
G8F <sub>2</sub> -3 x 91600006-3	255 Aa	253 Aa	143 Aa	145 Ab	1 Ad	1 Ac	42 Aa	38 Aa	16,5 Bc	19,0 Aa	8,3 Ab	7,7 Aa
G1S <sub>1</sub> -1 x 9150130-4	243 Aa	225 Aa	138 Aa	133 Ac	6 Ac	3 Ac	39 Aa	36 Ab	15,5 Ac	17,5 Ab	8,1 Ac	7,2 Ab
G4F <sub>2</sub> -1 x L1017	255 Aa	238 Aa	148 Aa	128 Ac	1 Ad	1 Ac	40 Aa	39 Aa	17,0 Bb	19,5 Aa	8,0 Ac	7,2 Ab
G1F <sub>2</sub> -1 x 541007	248 Aa	235 Aa	153 Aa	135 Ac	2 Ad	1 Ac	43 Aa	39 Aa	16,0 Bc	18,5 Aa	7,9 Ac	7,9 Aa
G4F <sub>2</sub> -1 x 541007	235 Aa	230 Aa	130 Aa	118 Ad	1 Ad	1 Ac	39 Aa	40 Aa	16,0 Ac	18,0 Ab	7,9 Ac	7,1 Ab
G4F <sub>1</sub> -3 x L1017	238 Aa	213 Ab	143 Aa	130 Ac	2 Ad	2 Ac	41 Aa	40 Aa	14,0 Ad	13,5 Ad	7,8 Ac	6,5 Ab
G1F <sub>2</sub> -1 x 9150130-4	243 Aa	223 Aa	145 Aa	133 Ac	3 Ad	1 Ac	39 Aa	41 Aa	16,0 Ac	17,5 Ab	7,7 Ac	8,2 Aa
G1S <sub>1</sub> -1 x L20	198 Bc	240 Aa	150 Aa	135 Ac	2 Ad	2 Ac	40 Aa	36 Ab	14,0 Bd	17,5 Ab	7,7 Ac	6,2 Bc
3P2200	240 Aa	230 Aa	120 Ab	128 Ac	5 Ad	1 Ac	36 Ab	36 Ab	15,5 Ac	17,0 Ab	6,5 Ad	5,0 Bc
AG8088VTPRO2	213 Ab	205 Ab	108 Ac	110 Ad	2 Ad	3 Ac	39 Aa	36 Ab	16,0 Bc	18,5 Aa	6,4 Ad	5,5 Ac
DKB310VTPRO2	220 Ab	210 Ab	123 Ab	130 Ac	4 Ad	1 Ac	41 Aa	32 Bb	17,0 Ab	19,0 Aa	6,1 Ad	6,9 Ab
BRS 3042	210 Ab	228 Aa	125 Ab	125 Ac	8 Ac	8 Ab	39 Aa	36 Ab	15,5 Ac	16,0 Ac	6,0 Ad	4,1 Bd
1Q2400	225 Aa	210 Ab	128 Aa	110 Ad	5 Ad	4 Ac	37 Ab	34 Ab	14,0 Ad	16,0 Ac	5,9 Ad	5,8 Ac
Médias	228	218	130	122	8	4	38	35	14,9	16,8	5,1	4,9

Limite Inferior	163	133	80	63	1	1	2	1	12,0	12,5	1,0	1,0
Limite superior	265	268	173	193	32	25	44	44	20,5	21,5	10,4	9,1

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal ou por letras minúsculas na vertical constituem grupo estatisticamente homogêneo, pelo teste Scott-Knott. A1 = com adubação; A2 = sem adubação. Altura de planta = AP, altura de espiga = AE, tombamento = TOMB, estande final = ST, umidade de grãos = UG, e produtividade = PROD.

Na Tabela 7 estão destacados os 15 híbridos de maior produtividade com adubação, em comparação com as cinco melhores testemunhas do ensaio (3P2200, AG8088VTPRO2, DKB310VTPRO2, BRS 3042 e 1Q2400). Os dados expressam a superioridade de linhagens duplo-haploides em comparação com as testemunhas para as características avaliadas, com 10,4 e 9,1 t/ha de produtividade nos ambientes com e sem adubação, respectivamente para o híbrido G5S1 x 9150130-4. Cabe destaque aos testadores 9150130-4, 541007 e L1017 como os que resultaram nos híbridos de maior produtividade com adubação.

A análise de médias via teste de Scott-Knott não resultou em distinções entre os ambientes com e sem adubação para os genótipos avaliados, mas sim em diferenças quanto ao agrupamento dos genótipos dentro de cada ambiente. Observando-se os dados dos melhores híbridos em conjunto (Tabela 7), verifica-se que os mesmos têm em comum poucas perdas em estande final (menos de 20% de perda), altura de planta elevada (entre 255 e 233 cm) e valores intermediários de umidade de grãos (entre 20 e 14%), denotando um ciclo precoce normal. Estes parâmetros correspondem ao ideótipo desejável para híbridos comerciais, demonstrando o potencial de DHs na obtenção de cultivares superiores.

#### **5.5.2. Capacidade combinatória de linhagens DH em cruzamento com testadores de três grupos heteróticos**

Na análise conjunta do dialelo parcial (Tabela 8) observaram-se diferenças significativas nos cruzamentos. O desdobramento dos efeitos de cruzamento em capacidade geral de combinação (CGC) dentro do conjunto de linhagens testadoras (G1) e dentro do conjunto de linhagens DHs (G2), e em capacidade específica de combinação (CEC) resultou em efeitos significativos para todas as características avaliadas, indicando que nos genótipos avaliados existem efeitos de aditividade e de dominância. Considerando os efeitos significativos de CEC, verifica-se que as linhagens avaliadas estão resultando em combinações híbridas superiores. As melhores linhagens são selecionadas em híbridos com alta CEC, as quais foram oriundas de cruzamentos com um progenitor de alta CGC (Cruz et al. 2012; Maioli et al. 2020)

**Tabela 8** - Análise conjunta de variância do dialelo parcial nos ambientes com e sem adubação para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), estande(ST), umidade de grãos(UG) e produtividade(PROD) de híbridos simples derivados de 23 linhagens duplo-haploides (Flint e Dent) e 12 linhagens testadoras (Flint, Dent e Intermediário)

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios					
		AP	AE	TOMB	ST	UG	PROD
Cruzamento	275	46098,90**	15413,90**	130,42**	1260,69**	222,01**	41,91**
CGC (G1)	11	118077,00**	39829,45**	442,94**	3278,07**	521,67**	126,79**
CGC (G2)	22	103709,86**	32863,00**	270,95**	2973,84**	488,57**	122,18**
CEC	242	37589,80**	12717,82**	103,44**	1013,24**	184,16**	30,75**
Ambiente <sup>1</sup>	1	70944,29**	38081,75**	1096,01**	1484,05**	13,48 <sup>ns</sup>	34,79 <sup>ns</sup>
Cruz. x Amb. <sup>2</sup>	275	6928,00**	2445,20**	31,99**	198,92**	35,46**	4,70 <sup>ns</sup>
CGC (G1) x Ambiente	11	7814,61**	2783,28**	60,32**	202,72**	40,05**	9,27 <sup>ns</sup>
CGC (G2) x Ambiente	22	18291,79**	6115,44**	58,93**	521,37**	99,92**	9,81 <sup>ns</sup>
CEC x Ambiente	242	5854,63**	2096,18**	28,26**	169,43**	29,50**	4,03 <sup>ns</sup>
Erro	576	135,93	111,88	13,84	8,68	4,41	127,75

\*\* nível de significância a 1%; \* nível de significância a 5%; <sup>ns</sup> não significativo; <sup>1</sup>Ambiente= doses de adubo (0 e 500 kg/ha); <sup>2</sup>Cruz.xAmb.= Interação cruzamento x ambiente; CGC = capacidade geral de combinação; CEC = capacidade específica de combinação; G1= linhagens testadoras; G2=linhagens testadoras duplo-haploides.

Quando foi incluso o efeito dos níveis de adubação (ambiente) na análise, observou-se diferença significativa para todos os caracteres, exceto produtividade (Tabela 8). Este resultado indica que, para produtividade, os comportamentos dos genótipos foram similares nos ambientes com e sem adubação, o que denota que, para produtividade, pode ser feita a seleção das melhores progênies com base na média de cada ambiente. Este dado reforça a ausência de diferenças significativas entre as médias de cada genótipo em cada ambiente para produtividade apontada pelo teste Scott-Knott (Tabela 1 - anexos).

As diferenças significativas encontradas na interação cruzamento x ambientes, efeito CGC(G1) x ambiente, efeito CGC(G2) x ambiente e CEC x ambiente para umidade, estande, tombamento, altura de planta e altura de espiga inferem respostas diferenciadas de testadores, linhagens DHs e combinações híbridas frente às variações no nível de adubação. Os resultados concordam com o observado por Nardino et al. (2019) em análise dialélica de linhagens endogâmicas de milho, onde foi possível encontrar para altura de planta e rendimento de grãos diferença significativa para cruzamentos x ambientes, CGC x ambientes e CEC x ambientes.

As médias dos efeitos aditivos de CGC (gi) nos dois ambientes evidenciam a contribuição dos testadores (Tabela 9). Para umidade de grãos os testadores 531542, 5100290-11, 521274, 521236, 9150130-4, 5702955 e 541007 tiveram valores negativos, indicando redução de ciclo das cultivares avaliadas, e os testadores L20, L724, L843 e L1017 valores positivos.

Para o estande final, os testadores L20, L724, L845 e L1017 foram o que mais contribuíram para esta característica, enquanto os testadores 531542, 5100290-11, 521274, 9150130-4, 5702955 apresentaram valores negativos. Em tombamento, os testadores 9160006-3, L845, L1017 apresentaram valores baixos, podendo ser recomendados para melhoramento desta característica agrônômica, caso também contribuam para boa produtividade. Para altura de planta e altura de espiga os testadores 521274, 9150130-4 e 5702955 apresentaram valores negativos, podendo contribuir para a redução deste caráter, se não houver interferência em produtividade. Para produtividade, os testadores L20 e L1017 se destacaram.

**Tabela 9** - Efeitos capacidade geral de combinação (gi) para seis características agronômicas, avaliadas em oito doze linhagens de milho utilizadas como testadores em dois níveis de fertilidade (com e sem adubação)

<b>Genitores</b>	<b>AP</b>	<b>AE</b>	<b>TOMB</b>	<b>ST</b>	<b>UG</b>	<b>PROD</b>
531542	-21,857	-11,754	1,801	-3,13	-1,835	-0,938
5100290-11	-18,487	-9,362	-1,004	-4,239	-1,596	-0,482
91600006-3	-10,553	-3,493	0,453	-1,63	-0,553	0,431
521274	-43,596	-25,449	1,714	-7,304	-2,9	-1,895
L20	48,034	23,681	-1,308	8,326	3,665	1,475
L724	31,295	21,833	5,301	4,783	2,121	-0,33
L845	39,23	15,094	0,214	6,674	2,339	0,801
L1017	64,447	42,703	0,236	10,565	3,969	2,409
521236	-7,726	-8,21	-0,895	-1,37	-0,161	-0,395
9150130-4	-25,226	-14,58	-1,525	-4,00	-1,639	0,192
5702955	-33,596	-19,906	-2,264	-5,804	-1,879	-1,156
541007	-21,966	-10,558	-2,721	-2,87	-1,531	-0,112

Altura de planta = AP, altura de espiga = AE, tombamento = TOMB, estande final = ST, umidade de grãos = UG, e produtividade = PROD.

Avaliando os efeitos aditivos de CGC (gi) para as linhagens DHs (Tabela 10), considerando a média dos ambientes para umidade de grãos, os valores inferiores foram encontrados G2F<sub>1</sub>, G5F<sub>1</sub>, G6F<sub>2</sub>, G8F<sub>1</sub>, G9S<sub>1</sub>, , indicando a presença de genes aditivos que podem contribuir para a precocidade. Os genótipos G6F<sub>1</sub>, G8S<sub>1</sub>, G9F<sub>1</sub> apresentaram comportamento diferenciado, com expressão de efeitos para redução da umidade de grãos quando sem adubação (Tabela 10).

Para estande final, os genótipos G1F<sub>2</sub>, G1S<sub>1</sub>, G4F<sub>1</sub>, G4S<sub>1</sub>, G5S<sub>1</sub>, G8F<sub>2</sub>, G10F<sub>2</sub>, e G12S<sub>1</sub> se destacaram com valores altos e positivos, contribuindo para progênes superiores nestas características. Quanto ao tombamento, a maioria dos genótipos apresentou valores negativos, contribuindo para a redução deste caráter, que constitui o pior defeito em híbridos de milho, com efeitos diretos na produção. Entre os valores negativos, inferiores os genótipos G2F<sub>1</sub>, G4F<sub>2</sub>, G5F<sub>1</sub>, G5S<sub>1</sub>, G8F<sub>1</sub>, G8F<sub>2</sub> se destacaram.

**Tabela 10** - Efeitos capacidade geral de combinação (gi) para seis características agronômicas, avaliadas em 23 linhagens de milho utilizadas como testadores duplo-haploides em dois níveis de fertilidade (com e sem adubação)

<b>Genitores</b>	<b>AP</b>	<b>AE</b>	<b>TOMB</b>	<b>ST</b>	<b>UG</b>	<b>PROD</b>
G1F <sub>1</sub>	-31,857	-16,428	-0,15	-6,498	-2,31	-1,272
G1F <sub>2</sub>	42,935	27,114	-0,317	7,502	3,19	2,145
G1S <sub>1</sub>	43,56	27,322	0,391	7,335	2,607	1,27
G2F <sub>1</sub>	-84,774	-48,928	-2,359	-14,957	-5,685	-2,647
G2S <sub>1</sub>	27,518	13,989	1,183	5,835	2,815	-0,105
G4F <sub>1</sub>	45,435	24,406	-1,442	9,585	3,149	2,562
G4F <sub>2</sub>	37,935	12,322	-2,817	6,002	3,899	1,978
G4S <sub>1</sub>	50,018	25,031	2,058	7,96	2,899	0,895
G5F <sub>1</sub>	-62,274	-33,719	-2,525	-10,29	-4,018	-1,563
G5S <sub>1</sub>	53,351	26,822	-2,484	8,085	4,399	2,853
G6F <sub>1</sub>	-11,857	-5,803	-0,317	-0,957	-1,018	-0,397
G6F <sub>2</sub>	-49,982	-26,428	-0,65	-7,582	-3,393	-1,813
G8F <sub>1</sub>	-92,274	-53,511	-2,984	-15,373	-6,393	-2,313
G8F <sub>2</sub>	48,351	22,114	-2,65	7,21	2,315	1,52
G8S <sub>1</sub>	-24,982	-13,511	-0,484	-3,957	-1,226	-1,188
G9F <sub>1</sub>	2,726	1,489	0,85	0,627	-0,06	-0,063
G9F <sub>2</sub>	-12,482	-9,344	1,391	-2,165	-0,476	-1,063
G9S <sub>1</sub>	-48,732	-26,844	2,225	-7,415	-3,143	-1,647
G10F <sub>1</sub>	-25,815	-15,178	0,641	-4,79	-1,976	-0,855
G10F <sub>2</sub>	53,351	39,822	6,641	7,043	3,024	0,978
G11F <sub>2</sub>	-16,649	-3,511	-1,609	-4,748	-1,685	-0,48
G12F <sub>1</sub>	22,518	11,489	4,141	4,002	0,732	0,228
G12S <sub>1</sub>	33,976	21,281	1,266	7,543	2,357	0,978

Altura de planta = AP, altura de espiga = AE, tombamento = TOMB, estande final = ST, umidade de grãos = UG, e produtividade = PROD.

Para altura de planta e altura de espiga, os efeitos negativos de CGC foram encontrados nos genótipos G1F<sub>1</sub>, G2F<sub>1</sub>, G5F<sub>1</sub>, G6F<sub>1</sub>, G6F<sub>2</sub>, G8F<sub>1</sub>, G8S<sub>1</sub>, G9F<sub>2</sub>, G9S<sub>1</sub>, G10F<sub>1</sub> e G11F<sub>2</sub>. Para produtividade, os genótipos que se destacaram com valores mais elevados foram G1F<sub>2</sub>, G1S<sub>1</sub>, G4F<sub>1</sub>, G4F<sub>2</sub>, G5S<sub>1</sub>, G8F<sub>2</sub>, sendo as principais linhagens DHs para avanço em um programa de melhoramento visando à obtenção de híbridos superiores. Destacaram-se para produtividade os genótipos G1F<sub>2</sub>, G4F<sub>1</sub>, G4F<sub>2</sub>, G5S<sub>1</sub> que possuíram os valores de efeito genético positivo e superior.

Os programas de melhoramento de milho buscam híbridos que combinem alta produtividade e estande com baixos índices de tombamento. Em suma, apesar de possuir alta umidade de grãos, elevada altura de planta e de espiga para os dois ambientes os melhores testadores foram L20 e L1017 apresentando bom desempenho em produtividade e estande, e baixo índice de tombamento.

Com relação ao grupo de linhagens duplo-haploides avaliadas, os genótipos G1F<sub>2</sub>, G4F<sub>1</sub>, G4F<sub>2</sub>, G5S<sub>1</sub> não se destacaram para umidade de grãos, altura de planta e altura de espiga, porém, híbridos que possuíam estes DHs como parentais se destacaram em estande e produtividade e apresentaram valores inferiores de tombamento.

A escolha de genitores que contribuam para a melhoria do maior número de características agronômicas possíveis é importante para extração de linhagens em programas de melhoramento que visam à obtenção de híbridos (Simon et al. 2012). Maioli et al. (2020) relataram impossibilidade de selecionar um único genótipo com melhor desempenho em características tais como: florescimento feminino e masculino, altura de planta e espiga, comprimento e diâmetro da espiga, plantas acamadas e quebradas, massa de 100 grãos e rendimentos de grãos. Naquele trabalho, foram selecionadas as linhagens com maiores valores de CGC considerando cada característica de forma isolada. No presente trabalho, as linhagens selecionadas possuíam valores altos de CGC para estande, tombamento e produtividade concomitantemente. Amiruzzaman et al. (2010) identificou capacidade geral de combinação para produtividade.

As estimativas elevadas de CEC indicam qual cruzamento específico foi melhor ou pior do que esperado com base na CGC dos progenitores, sendo o sinal positivo ou negativo determinante no sentido deste caráter. Estes cruzamentos específicos evidenciam efeitos não aditivos, ou seja, desvio de dominância e epistasia (Cruz et al. 2012). Além disso, a CEC também está relacionada à divergência genética entre os pais (Lippman & Zamir, 2007). Para cada característica, as melhores combinações híbridas devem possuir uma das linhagens DH ou testadores que se destacaram na CGC, sendo os híbridos selecionados com base nas estimativas de CEC (Cruz et al. 2012).

Para umidade de grãos, estande, tombamento, altura de planta, altura de espiga e produtividade houve uma combinação híbrida distinta. Em umidade de grãos observa-se desvio de dominância e epistasia nas combinações híbridas G2F<sub>1</sub> x L724, G5F<sub>1</sub> x 91600006-3 e G8F<sub>1</sub> x 541007 (Tabela 2 - anexo). Em estande, as melhores combinações híbridas foram G5F<sub>1</sub> x L1017, G6F<sub>2</sub> x L20, G9F<sub>2</sub> x L724, G9S<sub>1</sub>x L1017 e G12F<sub>1</sub> x L724. Para tombamento,

destacaram-se os híbridos G8F<sub>2</sub> x L845 e G6F<sub>1</sub> x L20. Em altura de planta e altura de espigas, os cruzamentos G5S<sub>1</sub> x 5100290-11, G5F<sub>1</sub> x 91600006-3 e G8F<sub>1</sub> x 541007 apresentaram destaque.

Para produtividade, observa-se altos efeitos de CEC nas combinações híbridas, G4S<sub>1</sub> x L20, G1F<sub>1</sub> x L1017 e G10F<sub>1</sub> x L1017. Atendendo as demandas do programa de melhoramento genético as combinações híbridas de alta produtividade, estande e baixo índice de tombamento são, G4S<sub>1</sub> x L20, G6F<sub>1</sub> x L20, G5F<sub>1</sub> x L1017, G6S<sub>2</sub> x L20, G1F<sub>1</sub> x L1017, G5F<sub>1</sub> x L1017, G10F<sub>1</sub> x L1017, G9S<sub>1</sub> x L1017 e G8F<sub>2</sub> x L845.

Os efeitos de CEC para produtividade e características relacionadas à produção de grãos foram relatadas por Amiruzzaman et al. (2010), Haddadi et al. (2012), Aminu et al. (2014). Na cultura do milho, a exploração dos efeitos não aditivos através da seleção das melhores combinações híbridas são de grande relevância nos programas de melhoramento (Guerrero et al. 2014).

## 5.6. Conclusões

As linhagens DH G1F<sub>2</sub>, G4F<sub>1</sub>, G4F<sub>2</sub> e G5S<sub>1</sub> expressaram alta capacidade geral de combinação para produtividade e estande, e baixa capacidade geral de combinação para tombamento, nos dois níveis de adubação.

O desempenho agrônômico dos 15 melhores híbridos derivados de linhagens DH em comparação com testemunhas, indicou superioridade de linhagens duplo-haploides em comparação com os híbridos obtidos de linhagens convencionais para as cinco características avaliadas, nos dois níveis de adubação.

## 5.7. Referências

AGUIAR, C.G.D.; SCAPIM, C.A.; PINTO, R.J.B.; AMARAL JÚNIOR, A.T.D.; SILVÉRIO, L.; ANDRADE, C.A.D.B. Diallel analysis of maize lines in the second crop. **Ciência rural**, v. 34, n. 6, p. 1731-1737, 2004.

AMARAL FILHO, J.P.R.D.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J.C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.3, p.467-473, 2005.

AMINU, D.; MOHAMMED, S.G.; KABIR, B. G. Estimates of combining ability and heterosis for yield and yield traits in maize population (*Zea mays* L.) under drought conditions in the Northern Guinea and Sudan savanna zones of Borno State, Nigeria. **Ijair**, v. 2, n. 5, p. 824-830, 2014.

AMIRUZZAMAN M.; ISLAM M.A.; HASSAN L.; ROHTNAN M.M. Combining Ability and Heterosis for Yield and Yield Component Characters in Maize. **Academic Journal Plant Scient**, v. 3, n. 2, p. 79-84, 2010.

BARRETA, D.; NARDINO, M.; KONFLANZ, V.A.; de PELEGRIN, A.J.; FERRARI, M.; SZARESKEI, V.J.; CARVALHO, I.R.; da MAIA, L.C. Diallelic analysis of endogamic Maize lines with emphasis on agronomic traits of tassel in different environments. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 101-111, 2019.

BEYENE, Y.; MUGO, S.N.; OIKEH, S.O.; JUMA, C.; OLSEN, M.; PRASANNA, B. M. Hybrids performance of doubled haploid lines derived from 10 tropical bi-parental maize populations evaluated in contrasting environments in Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 371-379, 2017.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2017. 543p.

CHAIKAM, V.; MOLENAAR, W.; MELCHINGER, A.E.; BODDUPALLI, P. M. Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 12, p. 3227-3243, 2019.

COUTO, E.G.D.O.; PINHO, É.V.D.R.V.; PINHO, R.G.V.; VEIGA, A.D.; BUSTAMANTE, F.D.O.; DIAS, K.O.D.G. In vivo haploid induction and efficiency of two chromosome duplication protocols in tropical maize. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, p. 435-442, 2015.

CRUZ, C.D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2012. 514p.

GUERRERO, C.G.; ROBLES, M.A.G.; ORTEGA, J.G.L.; CASTILLO, I.O.; VÁZQUEZ, C.V.; CARRILLO, M.G.; RESENDEZ, A.M.; TORRES, A.G. Combining ability and heterosis in corn breeding lines to forage and grain. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p. 845-856, 2014.

DEIMLING, S.; ROBER, F.; GEIGER, H.H. Methodik und genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei mais. **Vorträge für Pflanzenzüchtung**, Quedlinburg, v. 38, p. 203-224, 1997.

FARIA, P.N.; OLIVEIRA, D.S. Análise de agrupamentos no estudo de caracteres agronômicos para a cultura do milho. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 743-750, 2019.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

GALLAIS, A.; BORDES, J. The use of doubled haploids in recurrent selection and hybrid development in maize. **Crop science**, v. 47, p. S-190-S-201, 2007.

GEIGER, H.H.; GORDILLO, G.A. Doubled haploids in hybrid maize breeding. **Maydica**, v. 54, n. 4, p. 485, 2009.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian journal of biological sciences**, v. 9, n. 4, p. 463-493, 1956.

HALLAUER, A.R.; CARENA, J.M.; MIRANDA FILHO, J.B. de. **Quantitative genetics in maize breeding**. New York: Springer, 2010. 500p.

HADDADI, M. H.; EESMAEILOF, M.; CHOUKAN, R.; RAMEEH, V. Combining ability analysis of days to silking, plant height, yield components and kernel yield in maize breeding lines. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 36, p. 5153-5159, 2012.

HUANG, J.; QI, H.; FENG, X.; HUANG, Y.; ZHU, L.; YUE, B. General combining ability of most yield-related traits had a genetic basis different from their corresponding traits per se in a set of maize introgression lines. **Genetica**, v. 141, n. 10-12, p. 453-461, 2013.

LIPPMAN, Z. B.; ZAMIR, D. Heterosis: revisiting the magic. **Trends in genetics**, v. 23, n. 2, p. 60-66, 2007.

MAIOLI, M.F.D.S.D.; PINTO, R.J.B.; SILVA, T.A.D.; RIZZARDI, D.A.; MATSUZAKI, R.A.; SATO, M.A.; EISELE, T.G.; GARCIA, G.D.L. Partial diallel and genetic divergence analyses in maize inbred lines. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 43, 2020.

MAYOR, P. J.; BERNARDO, R. Doubled haploids in commercial maize breeding: one-stage and two-stage phenotypic selection versus marker-assisted recurrent selection. **Maydica**, v. 54, n. 4, p. 439-448, 2009.

MOWERS, R.P.; FOSTER, D.J. Genetic Variance Estimates for Maize Yield, Grain Moisture, and Stalk Lodging for Doubled-Haploid and Conventional Selfed-Line Hybrids. **Plants**, v. 9, n. 2, p. 138, 2020.

MOWERS, R.P.; NYHUS, K.A.; TRAGESSE, S.L.; FOSTER, D.J. Doubled haploid testcross design for predicting corn hybrid performance using molecular markers. **Crop Science**, v. 58, n. 2, p. 521-528, 2018.

NARDINO, M.; BARETTA, D.; CARVALHO, I.R.; FOLLMANN, D.N.; FERRARI, M.; de PELEGRIN, A.J.; SZARESKI, V.J.; KONFLANZ, V.A.; de SOUZA, V.Q. Divergência genética entre genótipos de milho (*Zea mays* L.) em ambientes distintos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 164-174, 2017.

NARDINO, M.; SOUZA, V.Q. D.; BARETTA, D.; KONFLANZ, V. A.; CARVALHO, I. R.; FOLLMANN, D. N.; CARON, B. O. Association of secondary traits with yield in maize F<sub>1</sub>'s. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 776-782, 2016.

OLIBONI, R.; FARIA, M.V.; NEUMANN, M.; RESENDE, J.T.V.; BATTISTELLI, G. M.; TEGONI, R.G.; OLIBONI, D.F. Diallelic analysis in assessing the potential of maize hybrids to generate base-populations for obtaining lines. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 1, p. 7-18, 2013.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 429-478.

PEREIRA FILHO, I.A.; BORGHI, E. Mercado de sementes de milho no Brasil: safra 2016/2017. **Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2016.

RIBEIRO, L.P.; TEODORO, P.E.; CORRÊA, C.C.G.; de OLIVEIRA, E.P.; da SILVA, F.A.; TORRES, F.E. Correlations and genetic parameters in maize hybrids. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 1, 2016.

RIEDELSCHEIMER, C., CZEDIK-EYSENBERG, A., GRIEDER, C., LISEC, J., TECHNOW, F., SULPICE, R., ALTMANN, T.; STITT, M.; WILLMITZER, L.; MELCHINGER, A.E. Genomic and metabolic prediction of complex heterotic traits in hybrid maize. **Nature genetics**, v. 44, n. 2, p. 217, 2012.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, vol. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SILVA, M.F.; MACIEL, G. M.; FINZI, R. R.; PEIXOTO, J.V.M.; REZENDE, W.S.; CASTOLDI, R. Índices de seleção para caracteres agronômicos e químicos em população segregante de milho-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 71-77, 2020.

SILVA, T.N.; MORO, G.V.; MORO, F.V.; SANTOS, D.M.M.D.; BUZINARO, R. Correlation and path analysis of agronomic and morphological traits in maize. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 2, p. 351-357, 2016.

SIMON, G.A.; KAMADA, T.; MOITEIRO, M. Divergência genética em milho de primeira e segunda safra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 449-457, 2012.

SOUZA NETO, I.L.D.; PINTO, R.J.B.; SCAPIM, C.A.; JOBIM, C.C.; FIGUEIREDO, A.S.T.; BIGNOTTO, L.S. Diallel analysis and inbreeding depression of hybrid forage corn for agronomic traits and chemical quality. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 42-49, 2015.

SPRAGUE, G.F.; TATUM, L.A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.34, n.10, p.923-932, 1942.

WANG, X.; ZHANG, Z.; XU, Y.; LI, P.; ZHANG, X.; XU, C. Using genomic data to improve the estimation of general combining ability based on sparse partial diallel cross designs in maize. **The Crop Journal**, v. 8, n. 5, p. 819-829, 2020.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. (1992) Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto, **Sociedade Brasileira de Genética**, 496p.

VIANA, J.M.S.; MATTA, F.P. (2003) Analysis of general and specific combining abilities of popcorn populations, including selfed parents. **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, n.4, p. 465-471.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P. (1999). Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa. Ed. UFV, p. 273-349.

SILVA, K.J.; GUIMARAES, C.T.; GUILHEN, J.H.S.; GUIMARAES, P.E.O.; PARENTONI, S.N.; TRINDADE, R.S.; OLIVEIRA, A.A.; BERNARDINO, K.C.; PINTO, M.O; DIAS, K.O.G.; BERNARDES, C.O.; DIAS, L.A.S.; PASTINA, M.M.; GUIMARAES, L.J.M.. High-density SNP-based genetic diversity and heterotic patterns of tropical maize breeding lines. **Crop Science**, v. 1, p. 1-10, 2019.

## **ANEXOS**

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haploides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD													
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
G1F <sub>1</sub> -1 x L20	220	A b	223	A a	123	A b	120	A d	14	A b	1	B c	39	A a	34	A b	16,5	B c	19,0	A a	3,6	A e	4,1	A d
G1F <sub>1</sub> -1 x L724	228	A a	210	A b	140	A a	128	A c	19	A b	5	B c	41	A a	26	B c	15,0	A d	15,0	A d	3,1	A f	2,9	A e
G1F <sub>1</sub> -1 x L1017	245	A a	245	A a	140	A a	160	A b	7	A c	1	A c	43	A a	42	A a	15,5	B c	19,5	A a	7,1	A c	6,9	A b
G1F <sub>1</sub> -1 x 521236	238	A a	218	A a	135	A a	115	A d	15	A b	4	B c	40	A a	35	A b	14,5	B d	17,0	A b	3,6	A e	3,9	A d
G1F <sub>1</sub> -1 x 5702955	233	A a	240	A a	150	A a	130	A c	2	A d	1	A c	27	B c	40	A a	15,0	A d	17,0	A b	2,3	B f	5,1	A c
G1F <sub>2</sub> -1 x L20	230	A a	218	A a	118	A b	120	A d	1	A d	1	A c	40	A a	37	A a	16,5	A c	18,0	A b	7,0	A c	6,0	A c
G1F <sub>2</sub> -1 x L724	243	A a	225	A a	143	A a	128	A c	13	A b	7	A c	41	A a	40	A a	15,0	A d	16,5	A c	4,3	A e	4,9	A c
G1F <sub>2</sub> -1 x L845	230	A a	225	A a	123	A b	123	A c	16	A b	2	B c	42	A a	39	A a	14,0	A d	15,5	A c	6,2	A d	6,4	A c
G1F <sub>2</sub> -1 x L1017	225	A a	235	A a	135	A a	143	A c	7	A c	1	A c	43	A a	39	A a	14,5	B d	19,0	A a	6,6	A d	6,4	A c
G1F <sub>2</sub> -1 x 521236	238	A a	238	A a	138	A a	133	A c	13	A c	2	B c	40	A a	38	A a	15,5	B c	19,0	A a	5,4	A d	6,7	A b
G1F <sub>2</sub> -1 x 521236	245	A a	213	B b	128	A a	123	A c	2	A d	1	A c	32	A c	24	B c	15,5	B c	20,5	A a	4,8	A e	4,0	A d
G1F <sub>2</sub> -1 x 9150130-4	243	A a	223	A a	145	A a	133	A c	3	A d	1	A c	39	A a	41	A a	16,0	A c	17,5	A b	7,7	A c	8,2	A a
G1F <sub>2</sub> -1 x 9150130-4	223	A b	228	A a	135	A a	133	A c	6	A c	1	A c	39	A a	36	A b	16,5	A c	17,5	A b	6,9	A c	6,8	A b
G1F <sub>2</sub> -2 x 9150130-4	233	A a	215	A b	145	A a	128	A c	8	A c	1	A c	43	A a	40	A a	15,0	A d	17,0	A b	6,6	A d	7,0	A b
G1F <sub>2</sub> -1 x 5702955	180	B c	220	A a	135	A a	120	A d	6	A c	4	A c	41	A a	37	A a	14,5	B d	17,0	A b	4,6	A e	4,9	A c
G1F <sub>2</sub> -2 x 5702955	225	A a	230	A a	133	A a	123	A c	3	A d	1	A c	37	A b	40	A a	13,5	B d	16,0	A c	3,3	B e	5,3	A c
G1F <sub>2</sub> -1 x 541007	248	A a	235	A a	153	A a	135	A c	2	A d	1	A c	43	A a	39	A a	16,0	B c	18,5	A a	7,9	A c	7,9	A a
G1S <sub>1</sub> -1 x L20	198	B c	240	A a	150	A a	135	A c	2	A d	2	A c	40	A a	36	A b	14,0	B d	17,5	A b	7,7	A c	6,2	B c
G1S <sub>1</sub> -1 x L724	235	A a	243	A a	145	A a	143	A c	24	A a	16	B b	40	A a	41	A a	14,5	A d	14,5	A d	3,9	A e	4,6	A d
G1S <sub>1</sub> -1 x L845	225	A a	223	A a	115	A b	105	A d	5	A d	2	A c	40	A a	31	B b	14,0	A d	16,0	A c	5,1	A d	5,1	A c
G1S <sub>1</sub> -1 x L1017	225	A a	218	A a	143	A a	128	A c	7	A c	1	A c	41	A a	35	B b	13,5	B d	16,5	A c	5,8	A d	5,3	A c
G1S <sub>1</sub> -1 x 521236	253	A a	230	A a	133	A a	138	A c	6	A c	3	A c	41	A a	39	A a	14,0	A d	15,5	A c	4,4	A e	5,0	A c

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haploides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD													
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
G1S <sub>1</sub> -1 x 9150130-4	243	A a	225	A a	138	A a	133	A c	6	A c	3	A c	39	A a	36	A b	15,5	A c	17,5	A b	8,1	A c	7,2	A b
G1S <sub>1</sub> -1 x 9150130-4	240	A a	225	A a	143	A a	130	A c	1	A d	3	A c	36	B b	44	A a	16,5	A c	18,5	A a	7,7	A c	7,5	A b
G1S <sub>1</sub> -1 x 5702955	205	B b	248	A a	138	A a	128	A c	5	A d	3	A c	38	A a	37	A a	15,0	A d	16,5	A c	2,8	B f	4,3	A d
G1S <sub>1</sub> -1 x 541007	250	A a	243	A a	153	A a	148	A b	1	A d	2	A c	41	A a	40	A a	14,5	B d	17,5	A b	6,1	A d	6,6	A b
G2F <sub>1</sub> -3 x 521236	228	A a	200	A b	118	A b	110	A d	7	A c	2	A c	35	A b	23	B c	15,0	A d	17,0	A b	2,6	A f	1,6	A f
G2S <sub>1</sub> -5 x L20	225	A a	208	A b	125	A b	108	A d	4	A d	3	A c	38	A a	37	A a	16,0	B c	19,0	A a	6,3	A d	5,7	A c
G2S <sub>1</sub> -4 x L724	208	A b	208	A b	118	A b	118	A d	20	A b	7	B c	38	A a	27	B c	15,0	A d	17,0	A b	1,9	A g	1,7	A f
G2S <sub>1</sub> -5 x L845	215	A b	210	A b	105	A c	98	A e	7	A c	3	A c	38	A a	37	A a	14,0	A d	15,5	A c	4,2	B e	6,0	A c
G2S <sub>1</sub> -4 x L1017	215	A b	208	A b	130	A a	123	A c	11	A c	8	A c	36	A b	37	A a	14,0	A d	15,5	A c	4,0	A e	4,6	A d
G2S <sub>1</sub> -4 x 521236	215	A b	188	A b	115	A b	103	A d	6	A c	6	A c	34	A b	37	A a	15,0	A d	13,5	A d	3,0	A f	3,6	A e
G2S <sub>1</sub> -4 x 521236	218	A b	165	B c	118	A b	115	A d	12	A c	10	A b	41	A a	35	B b	15,0	A d	16,0	A c	2,3	A f	3,1	A e
G2S <sub>1</sub> -4 x 9150130-4	210	A b	200	A b	100	A c	95	A e	2	A d	3	A c	27	B c	37	A a	14,0	B d	16,5	A c	4,8	A e	5,5	A c
G2S <sub>1</sub> -5 x 9150130-4	235	A a	218	A a	133	A a	123	A c	9	A c	6	A c	38	A a	38	A a	14,5	A d	16,0	A c	6,3	A d	6,1	A c
G2S <sub>1</sub> -4 x 5702955	218	A b	210	A b	103	A c	110	A d	1	A d	2	A c	40	A a	37	A a	15,0	A d	16,0	A c	2,0	A g	2,9	A e
G2S <sub>1</sub> -4 x 541007	220	A b	195	A b	130	A a	110	A d	3	A d	1	A c	39	A a	37	A a	13,5	B d	16,0	A c	4,6	A e	3,5	A e
G4F <sub>1</sub> -3 x L20	220	A b	210	A b	125	A b	115	A d	3	A d	1	A c	39	A a	35	A b	15,5	A c	16,0	A c	5,7	A d	4,5	A d
G4F <sub>1</sub> -3 x L724	213	A b	213	A b	118	A b	123	A c	8	A c	3	A c	40	A a	32	B b	12,0	B d	14,5	A d	4,4	A e	2,6	B f
G4F <sub>1</sub> -3 x L845	230	A a	213	A b	123	A b	108	A d	2	A d	5	A c	36	A b	40	A a	13,5	A d	13,0	A d	5,6	A d	4,5	A d
G4F <sub>1</sub> -3 x L1017	238	A a	213	A b	143	A a	130	A c	2	A d	2	A c	41	A a	40	A a	14,0	A d	13,5	A d	7,8	A c	6,5	A b
G4F <sub>1</sub> -3 x 521236	215	A b	218	A a	115	A b	120	A d	1	A d	2	A c	40	A a	38	A a	14,0	B d	17,0	A b	4,2	A e	4,9	A c
G4F <sub>1</sub> -3 x 9150130-4	233	A a	215	A b	128	A a	105	A d	1	A d	1	A c	41	A a	38	A a	17,5	A b	17,5	A b	9,8	A a	7,0	B b
G4F <sub>1</sub> -3 x 5702955	230	A a	208	A b	133	A a	113	A d	1	A d	1	A c	41	A a	38	A a	16,0	B c	18,5	A a	7,2	A c	7,5	A b

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haploides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD	
-----------	----	--	----	--	------	--	----	--	----	--	------	--

	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
G4F <sub>1</sub> -3 x 541007	218	A b	218	A a	128	A a	128	A c	1	A d	1	A c	43	A a	41	A a	13,5	B d	17,0	A b	8,8	A b	7,8	A a
G4F <sub>2</sub> -1 x L20	233	A a	223	A a	120	A b	105	A d	1	A d	1	A c	39	A a	41	A a	18,5	A a	19,0	A a	7,5	A c	5,8	B c
G4F <sub>2</sub> -1 x L724	235	A a	238	A a	125	A b	123	A c	2	A d	3	A c	37	A b	42	A a	15,5	B c	19,0	A a	5,4	A d	5,4	A c
G4F <sub>2</sub> -1 x L845	240	A a	220	A a	130	A a	130	A c	1	A d	1	A c	38	A a	38	A a	14,5	B d	18,5	A a	5,7	A d	6,3	A c
G4F <sub>2</sub> -1 x L1017	255	A a	238	A a	148	A a	128	A c	1	A d	1	A c	40	A a	39	A a	17,0	B b	19,5	A a	8,0	A c	7,2	A b
G4F <sub>2</sub> -1 x 521236	245	A a	235	A a	120	A b	120	A d	1	A d	1	A c	40	A a	40	A a	18,5	A a	20,5	A a	7,2	A c	7,5	A b
G4F <sub>2</sub> -1 x 9150130-4	243	A a	228	A a	130	A a	118	A d	1	A d	1	A c	41	A a	39	A a	19,0	A a	20,0	A a	8,9	A b	7,9	A a
G4F <sub>2</sub> -1 x 5702955	245	A a	228	A a	115	A b	108	A d	1	A d	1	A c	36	A b	23	B c	20,5	A a	21,5	A a	4,4	A e	4,1	A d
G4F <sub>2</sub> -1 x 541007	235	A a	230	A a	130	A a	118	A d	1	A d	1	A c	39	A a	40	A a	16,0	A c	18,0	A b	7,9	A c	7,1	A b
G4S <sub>1</sub> -3 x L20	223	A b	223	A a	123	A b	118	A d	1	A d	1	A c	42	A a	37	A a	14,5	A d	16,0	A c	6,1	A d	5,6	A c
G4S <sub>1</sub> -2 x L724	230	A a	228	A a	140	A a	128	A c	28	A a	23	A a	42	A a	38	A a	15,0	A d	17,0	A b	1,7	A g	1,9	A f
G4S <sub>1</sub> -2 x L845	213	A b	210	A b	105	A c	95	A e	2	A d	5	A c	38	A a	33	A b	14,0	A d	14,0	A d	4,2	A e	3,0	A e
G4S <sub>1</sub> -2 x L1017	243	A a	213	A b	135	A a	123	A c	7	A c	2	A c	35	A b	35	A b	13,5	A d	14,0	A d	5,9	A d	4,7	A d
G4S <sub>1</sub> -2 x 521236	240	A a	240	A a	128	A a	125	A c	6	A c	4	A c	39	A a	32	B b	15,0	A d	17,0	A b	3,0	A f	2,5	A f
G4S <sub>1</sub> -2 x 9150130-4	233	A a	210	A b	130	A a	110	A d	8	A c	7	A c	40	A a	37	A a	16,0	A c	15,5	A c	6,0	A d	5,2	A c
G4S <sub>1</sub> -2 x 5702955	228	A a	215	A b	118	A b	113	A d	12	A c	14	A b	38	A a	34	A b	15,0	A d	16,0	A c	1,6	A g	2,9	A e
G4S <sub>1</sub> -2 x 541007	240	A a	230	A a	148	A a	128	A c	2	A d	1	A c	42	A a	38	A a	14,0	A d	15,5	A c	6,7	A d	6,2	A c
G5F <sub>1</sub> -1 x L724	243	A a	225	A a	153	A a	145	A b	12	A c	2	B c	39	A a	38	A a	16,0	B c	19,0	A a	4,3	A e	5,1	A c
G5F <sub>1</sub> -1 x 521236	233	A a	235	A a	138	A a	130	A c	1	A d	1	A c	39	A a	37	A a	16,0	A c	17,5	A b	5,6	A d	5,4	A c
G5S <sub>1</sub> x L20	233	A a	215	A b	130	A a	115	A d	5	A d	1	A c	40	A a	34	B b	15,5	B c	18,5	A a	5,9	A d	5,0	A c
G5S <sub>1</sub> x L724	248	A a	230	A a	145	A a	130	A c	1	A d	1	A c	42	A a	40	A a	15,5	B c	18,0	A b	8,6	A b	7,3	A b
G5S <sub>1</sub> x L845	225	A a	218	A a	120	A b	108	A d	1	A d	1	A c	40	A a	39	A a	14,0	A d	15,0	A d	7,3	A c	6,7	A b

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haplóides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2

G5S <sub>1</sub> x L1017	230	A a	223	A a	153	A a	133	A c	1	A d	2	A c	38	A a	26	B c	16,0	A c	18,0	A b	8,8	A b	6,1	B c
G5S <sub>1</sub> x 521236	228	A a	228	A a	130	A a	72	B f	1	A d	1	A c	37	A b	37	A a	15,0	B d	20,0	A a	6,7	A d	7,9	A a
G5S <sub>1</sub> x 9150130-4	245	A a	243	A a	140	A a	140	A c	2	A d	1	A c	42	A a	38	A a	17,5	A b	18,5	A a	10,4	A a	9,1	A a
G5S <sub>1</sub> x 5702955	248	A a	218	A a	135	A a	125	A c	1	A d	1	A c	42	A a	37	A a	17,0	A b	19,0	A a	6,6	A d	5,3	A c
G5S <sub>1</sub> x 541007	238	A a	225	A a	153	A a	133	A c	2	A d	1	A c	41	A a	37	A a	15,5	B c	18,5	A a	5,1	A d	3,9	A d
G6F <sub>1</sub> -1 x L724	213	A b	205	A b	140	A a	123	A c	25	A a	14	B b	39	A a	23	B c	15,0	A d	17,0	A b	2,1	A g	1,6	A f
G6F <sub>1</sub> -1 x L845	208	A b	195	A b	105	A c	113	A d	4	A d	1	A c	39	A a	36	A b	14,0	A d	13,0	A d	3,8	A e	3,5	A e
G6F <sub>1</sub> -1 x L1017	208	A b	205	A b	115	A b	125	A c	3	B d	12	A b	35	A b	39	A a	15,0	A d	16,0	A c	3,1	B f	4,7	A d
G6F <sub>1</sub> -1 x 9150130-4	233	A a	223	A a	148	A a	133	A c	8	A c	12	A b	39	A a	37	A a	12,0	B d	15,0	A d	5,5	A d	4,4	A d
G6F <sub>2</sub> -4 x 541007	220	A b	225	A a	133	A a	138	A c	1	A d	3	A c	36	A b	39	A a	13,0	B d	16,5	A c	4,3	A e	4,5	A d
G8F <sub>1</sub> -6 x 5100290-11	245	A a	248	A a	128	A a	138	A c	1	A d	1	A c	35	A b	38	A a	15,5	B c	19,0	A a	7,1	A c	7,7	A a
G8F <sub>2</sub> -3 x L20	233	A a	215	A b	118	A b	110	A d	1	A d	1	A c	39	A a	36	A b	17,0	A b	16,5	A c	5,3	A d	3,3	B e
G8F <sub>2</sub> -3 x L724	228	A a	228	A a	135	A a	125	A c	3	A d	1	A c	42	A a	41	A a	13,0	B d	15,5	A c	5,0	A e	4,1	A d
G8F <sub>2</sub> PL07-4 x L845	218	A b	218	A a	113	A b	103	A d	4	A d	1	A c	38	A a	31	B b	13,5	A d	15,0	A d	5,2	A d	3,1	B e
G8F <sub>2</sub> -3 x L1017	253	A a	225	A a	145	A a	120	A d	1	A d	1	A c	41	A a	41	A a	13,0	A d	14,5	A d	7,6	A c	6,8	A b
G8F <sub>2</sub> -3 x 531542	253	A a	235	A a	140	A a	125	A c	1	A d	1	A c	43	A a	41	A a	12,0	A d	13,5	A d	6,6	A d	5,8	A c
G8F <sub>2</sub> -3 x 5100290-11	238	A a	245	A a	125	A b	110	A d	1	A d	1	A c	40	A a	37	A a	16,0	B c	18,5	A a	8,7	A b	7,6	A a
G8S <sub>1</sub> -4 x L20	245	A a	205	B b	130	A a	120	A d	1	A d	2	A c	39	A a	42	A a	14,0	A d	15,0	A d	4,7	A e	3,6	A e
G8S <sub>1</sub> -4 x L724	218	A b	205	A b	133	A a	120	A d	23	A a	3	B c	41	A a	24	B c	15,0	A d	17,0	A b	2,3	A f	1,5	A f
G8S <sub>1</sub> -4 x L845	215	A b	193	A b	120	A b	105	A d	10	A c	1	B c	39	A a	33	B b	14,5	A d	15,5	A c	4,1	A e	3,0	A e
G8S <sub>1</sub> -4 x L1017	225	A a	218	A a	135	A a	138	A c	3	A d	2	A c	43	A a	38	A a	13,5	B d	16,0	A c	7,2	A c	5,8	A c
G8F <sub>2</sub> -3 x 91600006-3	255	A a	253	A a	143	A a	145	A b	1	A d	1	A c	42	A a	38	A a	16,5	B c	19,0	A a	8,3	A b	7,7	A a

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haplóides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD													
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
G8F <sub>2</sub> -3 x 521274	240	A a	228	A a	125	A b	120	A d	1	A d	1	A c	39	A a	40	A a	15,0	B d	17,5	A b	3,4	A e	3,9	A d

G8S <sub>1</sub> -4 x 531542	218	A b	208	A b	120	A b	118	A d	19	A b	6	B c	41	A a	38	A a	15,0	A d	16,5	A c	3,9	A e	5,2	A c
G8S <sub>1</sub> -4 x 5100290-11	228	A a	225	A a	125	A b	125	A c	10	A c	2	B c	36	A b	33	A b	14,0	B d	16,5	A c	4,3	A e	4,1	A d
G8S <sub>1</sub> -4 x 91600006-3	215	A b	225	A a	128	A a	134	A c	11	A c	6	A c	39	A a	36	A b	15,0	B d	18,5	A a	6,9	A c	6,0	A c
G8S <sub>1</sub> -4 x 521274	208	A b	190	A b	118	A b	113	A d	9	A c	4	A c	37	A b	36	A b	16,0	A c	16,5	A c	4,4	A e	3,1	A e
G9F <sub>1</sub> -8 X L845	218	A b	208	A b	113	A b	98	A e	10	A c	2	A c	42	A a	40	A a	12,5	B d	15,0	A d	5,3	A d	4,7	A d
G9F <sub>1</sub> -8 x L1017	223	A b	235	A a	138	A a	133	A c	5	A d	2	A c	38	A a	41	A a	14,5	B d	17,0	A b	7,1	A c	7,5	A b
G9F <sub>1</sub> -8 x 531542	243	A a	220	A a	140	A a	130	A c	13	A c	5	B c	37	A b	38	A a	15,0	A d	16,5	A c	3,9	A e	4,1	A d
G9F <sub>1</sub> -5 x 531542	213	A b	213	A b	128	A a	118	A d	22	A a	7	B c	39	A a	35	A b	14,0	A d	16,0	A c	3,5	A e	3,6	A e
G9F <sub>1</sub> -5 x 5100290-11	238	A a	245	A a	135	A a	140	A c	1	A d	1	A c	40	A a	33	B b	13,5	B d	17,5	A b	6,1	A d	4,5	B d
G9F <sub>1</sub> -5 x 5100290-11	258	A a	230	A a	153	A a	133	A c	1	A d	1	A c	40	A a	29	B b	15,0	A d	17,0	A b	5,2	A d	4,9	A c
G9F <sub>1</sub> -8 x 91600006-3	245	A a	228	A a	148	A a	130	A c	10	A c	4	A c	41	A a	36	A b	18,0	A b	19,5	A a	6,4	A d	6,1	A c
G9F <sub>1</sub> -8 x 521274	228	A a	213	A b	125	A b	130	A c	11	A c	7	A c	30	B c	38	A a	15,0	A d	15,5	A c	1,7	B g	5,6	A c
G9F <sub>2</sub> -2 x L20	208	A b	200	A b	105	A c	98	A e	3	A d	3	A c	42	A a	40	A a	15,0	A d	17,0	A b	3,6	A e	1,9	B f
G9F <sub>2</sub> -2 x L845	190	A c	178	A c	98	A c	95	A e	17	A b	5	B c	40	A a	14	B d	15,0	A d	17,0	A b	3,0	A f	1,7	A f
G9F <sub>2</sub> -2 x L845	205	A b	133	B c	100	A c	93	A e	10	A c	3	A c	35	A b	29	B b	15,0	A d	17,0	A b	3,5	A e	2,4	A f
G9F <sub>2</sub> -1 x 531542	210	A b	208	A b	110	A b	113	A d	17	A b	10	A b	35	A b	34	A b	15,0	A d	15,0	A d	3,2	A e	2,3	A f
G9F <sub>2</sub> -2 x 5100290-11	230	A a	248	A a	135	A a	160	A b	29	A a	3	B c	36	A b	42	A a	15,0	B d	20,5	A a	1,9	B g	9,1	A a
G9F <sub>2</sub> -2 x 91600006-3	220	A b	208	A b	133	A a	115	A d	19	A b	2	B c	41	A a	39	A a	14,5	A d	15,5	A c	6,6	A d	4,9	B c
G9F <sub>2</sub> -2 x 521274	198	A c	185	A c	113	A b	88	A e	32	A a	18	B a	36	A b	34	A b	15,0	A d	17,0	A b	1,4	A g	2,0	A f
G10F <sub>1</sub> x L20	235	A a	245	A a	133	A a	148	A b	7	A c	1	A c	37	A b	42	A a	14,5	B d	18,5	A a	4,4	A e	5,6	A c
G10F <sub>1</sub> x L845	210	A b	200	A b	103	A c	100	A d	5	A d	2	A c	41	A a	23	B c	14,5	A d	16,0	A c	4,9	A e	3,2	B e

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haploides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD													
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
G10F <sub>1</sub> x L1017	240	A a	228	A a	138	A a	125	A c	2	A d	1	A c	40	A a	37	A a	15,5	A c	16,5	A c	5,8	A d	6,3	A c
G10F <sub>1</sub> -3 x 531542	230	A a	223	A a	145	A a	128	A c	28	A a	19	B a	36	A b	37	A a	15,0	A d	15,0	A d	2,7	A f	3,5	A e

G10F <sub>1</sub> x 91600006-3	240	A a	233	A a	135	A a	148	A b	7	A c	2	A c	41	A a	33	B b	16,0	A c	17,0	A b	6,8	A c	5,4	B c
G10F <sub>2</sub> -3 x L20	253	A a	253	A a	155	A a	153	A b	8	A c	1	A c	39	A a	35	A b	16,5	A c	18,5	A a	5,2	A d	5,9	A c
G10F <sub>2</sub> -3 x L724	253	A a	233	A a	173	A a	158	A b	30	A a	25	A a	39	A a	39	A a	15,0	A d	17,0	A b	2,6	A f	2,3	A f
G10F <sub>2</sub> -3 x L845	243	A a	223	A a	143	A a	133	A c	10	A c	2	B c	39	A a	39	A a	15,0	A d	16,5	A c	5,3	A d	6,1	A c
G10F <sub>2</sub> -3 x L1017	265	A a	268	A a	170	A a	178	A a	10	A c	1	B c	37	A b	35	A b	14,5	B d	18,0	A b	4,8	A e	6,2	A c
G10F <sub>2</sub> -3 x 531542	255	A a	238	A a	160	A a	143	A c	25	A a	15	B b	41	A a	37	A a	14,5	A d	16,0	A c	4,2	A e	4,4	A d
G10F <sub>2</sub> -3 x 5100290-11	250	A a	255	A a	150	A a	155	A b	4	A d	6	A c	41	A a	39	A a	17,0	B b	19,5	A a	5,2	A d	6,6	A b
G10F <sub>2</sub> -3 x 91600006-3	255	A a	253	A a	163	A a	153	A b	10	A c	8	A c	38	A a	37	A a	14,5	B d	19,0	A a	7,2	A c	7,2	A b
G10F <sub>2</sub> -3 x 521274	225	A a	250	A a	130	B a	165	A b	28	A a	15	B b	41	A a	34	B b	15,0	B d	20,0	A a	3,0	A f	3,2	A e
G11F <sub>2</sub> PL08 x L20	255	A a	240	A a	140	A a	135	A c	6	A c	7	A c	39	A a	39	A a	17,5	B b	20,5	A a	5,5	A d	5,2	A c
G11F <sub>2</sub> PL08 x L1017	258	A a	245	A a	168	A a	143	A c	1	A d	1	A c	40	A a	36	A b	14,0	B d	17,5	A b	5,4	A d	5,8	A c
G11F <sub>2</sub> PL08 x 531542	240	A a	233	A a	143	A a	135	A c	1	A d	1	A c	41	A a	36	A b	15,0	B d	18,0	A b	6,8	A c	6,6	A b
G11F <sub>2</sub> PL08 x 5100290-11	258	A a	255	A a	143	B a	193	A a	1	A d	1	A c	38	A a	31	B b	13,0	B d	16,5	A c	4,5	A e	5,6	A c
G11F <sub>2</sub> PL08 x 521274	253	A a	230	A a	148	A a	155	A b	8	A c	1	A c	38	A a	40	A a	14,0	B d	17,5	A b	4,6	A e	5,8	A c
G12F <sub>1</sub> -1 x L20	223	A b	220	A a	128	A a	125	A c	6	A c	3	A c	40	A a	36	A b	14,5	A d	16,5	A c	3,5	A e	4,3	A d
G12F <sub>1</sub> -1 x L845	233	A a	200	B b	125	A b	98	B e	9	A c	2	A c	40	A a	40	A a	13,0	A d	13,0	A d	4,3	A e	3,7	A e
G12F <sub>1</sub> -1 x L1017	230	A a	220	A a	140	A a	135	A c	20	A b	13	A b	40	A a	39	A a	14,5	A d	15,0	A d	5,0	A e	4,6	A d
G12F <sub>1</sub> -1 x 531542	235	A a	213	A b	135	A a	118	A d	11	A c	8	A b	39	A a	39	A a	13,0	B d	15,5	A c	5,0	A e	4,9	A c
G12F <sub>1</sub> -1 x 531542	225	A a	223	A a	128	A a	135	A c	16	A b	3	B c	40	A a	36	A b	14,0	A d	14,0	A d	4,4	A e	4,3	A d
G12F <sub>1</sub> -1 x 5100290-11	238	A a	245	A a	140	A a	140	A c	16	A b	3	B c	39	A a	35	A b	13,0	A d	15,0	A d	5,8	A d	5,3	A c

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haploides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD													
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
G12F <sub>1</sub> -1 x 5100290-11	248	A a	225	A a	140	A a	123	A c	16	A b	3	B c	35	A b	37	A a	13,0	B d	16,0	A c	5,7	A d	5,2	A c
G12F <sub>1</sub> -1 x 91600006-3	235	A a	228	A a	138	A a	135	A c	23	A a	14	B b	39	A a	38	A a	14,0	A d	15,5	A c	5,4	A d	4,7	A d
G12F <sub>1</sub> -1 x 91600006-3	238	A a	210	A b	145	A a	118	B d	26	A a	13	B b	41	A a	41	A a	12,5	A d	14,5	A d	5,9	A d	6,3	A c

G12F <sub>1</sub> -1 x 521274	228	A a	218	A a	130	A a	125	A c	22	A a	12	B b	39	A a	37	A a	15,0	A d	17,0	A b	3,3	A e	3,2	A e
G12S <sub>1</sub> -2 x L20	205	A b	198	A b	120	A b	108	A d	1	A d	1	A c	41	A a	40	A a	14,0	A d	14,0	A d	4,9	A e	3,9	A d
G12S <sub>1</sub> -3 x L724	220	A b	215	A b	133	A a	128	A c	22	A a	10	B b	39	A a	35	A b	15,0	A d	17,0	A b	2,8	A f	2,3	A f
G12S <sub>1</sub> -2 x L845	195	A c	190	A b	108	A c	105	A d	7	A c	4	A c	39	A a	35	A b	13,5	A d	12,5	A d	4,7	A e	3,1	B e
G12S <sub>1</sub> -2 x L1017	208	A b	198	A b	118	A b	118	A d	6	A c	2	A c	41	A a	40	A a	16,0	B c	19,5	A a	6,2	A d	6,3	A c
G12S <sub>1</sub> -2 x 531542	228	A a	208	A b	120	A b	110	A d	7	A c	3	A c	42	A a	38	A a	16,0	A c	17,0	A b	6,0	A d	6,0	A c
G12S <sub>1</sub> -2 x 531542	213	A b	220	A a	125	A b	120	A d	10	A c	7	A c	43	A a	41	A a	15,5	A c	16,5	A c	5,5	A d	6,0	A c
G12S <sub>1</sub> -2 x 5100290-11	230	A a	218	A a	125	A b	128	A c	6	A c	1	A c	44	A a	41	A a	16,0	A c	16,0	A c	7,0	A c	5,3	B c
G12S <sub>1</sub> -2 x 91600006-3	218	A b	208	A b	140	A a	115	A d	11	A c	3	B c	42	A a	35	B b	14,0	B d	17,5	A b	6,9	A c	6,1	A c
G12S <sub>1</sub> -2 x 91600006-3	223	A b	220	A a	130	A a	133	A c	9	A c	1	A c	39	A a	36	A b	14,5	A d	16,0	A c	7,2	A c	6,3	A c
G12S <sub>1</sub> -2 x 521274	223	A b	213	A b	125	A b	110	A d	10	A c	4	A c	40	A a	34	A b	14,0	A d	14,5	A d	4,3	A e	4,2	A d
1P2216	223	A b	210	A b	128	A a	108	A d	10	A c	2	B c	20	B d	30	A b	14,5	A d	15,0	A d	3,8	A e	4,7	A d
1P2247	243	A a	235	A a	148	A a	143	A c	19	A b	7	B c	38	A a	39	A a	15,5	A c	16,5	A c	4,8	A e	4,4	A d
3P2200	240	A a	230	A a	120	A b	128	A c	5	A d	1	A c	36	A b	36	A b	15,5	A c	17,0	A b	6,5	A d	5,0	B c
1Q2405	240	A a	205	B b	140	A a	108	B d	10	A c	7	A c	37	A b	29	B b	17,0	A b	17,5	A b	5,3	A d	5,0	A c
1Q2406	238	A a	228	A a	130	A a	128	A c	9	A c	11	A b	34	A b	35	A b	14,5	B d	17,5	A b	5,9	A d	5,8	A c
1P2213	223	A b	213	A b	128	A a	113	A d	10	A c	4	A c	34	A b	32	A b	14,5	A d	16,0	A c	4,6	A e	4,9	A c
1P2258	208	A b	215	A b	115	A b	110	A d	3	A d	2	A c	39	A a	37	A a	14,5	B d	17,0	A b	4,9	A e	5,9	A c
BRS 3040	175	A c	165	A c	83	A c	75	A f	2	A d	1	A c	4	A f	3	A e	15,0	A d	17,0	A b	1,0	A g	1,0	A f
BRS 2022	205	A b	210	A b	128	A a	105	A d	13	A c	9	A b	42	A a	38	A a	15,0	B d	17,5	A b	4,4	A e	4,3	A d

**Tabela 1** - Médias de progênies derivadas de 23 linhagens duplo-haploides e 12 linhagens testadores para altura de planta(AP), altura de espiga(AE), tombamento(TOMB), stand(ST), umidade de grãos (UG) e produtividade(PROD) nos ambientes de com adubação (A1) e sem adubação (A2)

PROGÊNIES	AP		AE		TOMB		ST		UG		PROD													
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2												
BRS 3042	210	A b	228	A a	125	A b	125	A c	8	A c	8	A b	39	A a	36	A b	15,5	A c	16,0	A c	6,0	A d	4,1	B d
BRS 1055	228	A a	218	A a	128	A a	115	A d	22	A a	15	A b	34	A b	31	A b	15,0	A d	17,0	A b	1,9	A g	1,7	A f
BRS 1060	203	A b	195	A b	105	A c	113	A d	16	A b	8	A b	35	A b	30	A b	15,0	A d	17,0	A b	2,6	A f	2,5	A f
1Q2400	225	A a	210	A b	128	A a	110	A d	5	A d	4	A c	37	A b	34	A b	14,0	A d	16,0	A c	5,9	A d	5,8	A c
BM709VTPRO2	235	A a	223	A a	143	A a	135	A c	10	A c	8	A b	38	A a	33	A b	15,0	A d	16,0	A c	4,4	A e	3,0	A e

AG8061VTPRO2	218	A b	195	A b	120	A b	123	A c	4	A d	1	A c	24	A d	14	B d	15,0	B d	18,0	A b	3,8	A e	2,4	A f
DKB310VTPRO2	220	A b	210	A b	123	A b	130	A c	4	A d	1	A c	41	A a	32	B b	17,0	A b	19,0	A a	6,1	A d	6,9	A b
2B587PW	195	A c	183	A c	93	A c	90	A e	11	A c	2	B c	37	A b	32	A b	14,0	A d	14,5	A d	3,8	A e	3,6	A e
FÓRMULA TL	180	A c	173	A c	80	A c	83	A f	7	A c	3	A c	30	A c	25	A c	15,0	A d	17,0	A b	1,5	A g	1,7	A f
IMPACTO VIPTERA	225	A a	168	B c	88	A c	78	A f	8	A c	1	A c	34	A b	31	A b	15,0	A d	17,0	A b	1,4	A g	1,5	A f
DKB 240 VTPRO3	163	A c	150	A c	90	A c	63	B f	7	A c	2	A c	10	A e	10	A d	15,0	A d	17,0	A b	1,1	A g	1,0	A f
MORGAN 20A78 PW	168	A c	158	A c	93	A c	65	B f	1	A d	1	A c	2	A f	1	A e	15,0	A d	17,0	A b	1,0	A g	1,0	A f
P30F35VYHR	220	A b	210	A b	113	A b	110	A d	1	A d	1	A c	40	A a	38	A a	15,0	A d	15,0	A d	2,1	A g	3,3	A e
AG8088VTPRO2	213	A b	205	A b	108	A c	110	A d	2	A d	3	A c	39	A a	36	A b	16,0	B c	18,5	A a	6,4	A d	5,5	A c

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL constituem grupo estatisticamente homogêneo;

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL constituem grupo estatisticamente homogêneo, pelo teste Scott-knott

**Tabela 2** - Efeitos capacidade específica de combinação ( $s_{ij}$ ) para altura de planta, altura de espiga, tombamento, estande, umidade de grãos e produtividade, em dois níveis de fertilidade (alta e sem adubação)

ALTURA DE PLANTA												
<b>G2/G1</b>	<b>531542</b>	<b>5100290-11</b>	<b>91600006-3</b>	<b>521274</b>	<b>L20</b>	<b>L724</b>	<b>L845</b>	<b>L1017</b>	<b>521236</b>	<b>9150130-4</b>	<b>5702955</b>	<b>541007</b>
<b>G1F<sub>1</sub></b>	-184,792	-188,161	-196,096	-163,053	-17,183	-115,444	-245,879	-23,596	36,078	-181,422	-55,553	-184,683
<b>G1F<sub>2</sub></b>	-259,583	-262,953	-270,888	-237,844	-101,975	-82,736	-90,67	-110,888	-41,214	-23,714	-22,844	-14,475
<b>G1S<sub>1</sub></b>	-260,208	-263,578	-271,513	-238,469	-87,6	-65,861	-91,295	-129,013	-39,339	-16,839	-40,969	-15,1
<b>G2F<sub>1</sub></b>	-131,875	-135,245	-143,179	-110,136	-201,766	-85,027	-192,962	-218,179	78,995	-128,505	-120,136	-131,766
<b>G2S<sub>1</sub></b>	-244,167	-247,536	-255,471	-222,428	-99,058	-87,319	-85,254	-117,971	-85,797	-13,297	-22,428	-39,058
<b>G4F<sub>1</sub></b>	-262,083	-265,453	-170,888	-240,344	-116,975	-102,736	-100,67	-115,888	-51,214	-26,214	-22,844	-44,475
<b>G4F<sub>2</sub></b>	-254,583	-257,953	-265,888	-232,844	-94,475	-72,736	-190,67	-93,388	-23,714	-6,214	-7,844	-19,475
<b>G4S<sub>1</sub></b>	-266,667	-270,036	-160,471	-244,928	-111,558	-97,319	-115,254	-117,971	-30,797	-43,297	-32,428	-29,058
<b>G5F<sub>1</sub></b>	-154,375	-157,745	-40,679	-132,636	-224,266	27,473	-215,462	-240,679	66,495	-151,005	-142,636	-154,266
<b>G5S<sub>1</sub></b>	-270,00	-163,37	-281,304	-248,261	-117,391	-85,652	-111,087	-118,804	-56,63	-14,13	-23,261	-29,891
<b>G6F<sub>1</sub></b>	-204,792	-208,161	-216,096	-183,053	-162,183	-152,944	-60,879	-88,596	-106,422	26,078	-73,053	-89,683
<b>G6F<sub>2</sub></b>	-166,667	-170,036	-177,971	-144,928	-236,558	-12,319	-127,754	-150,471	-180,797	-48,297	-154,928	50,942
<b>G8F<sub>1</sub></b>	-124,375	-2,745	-135,679	-102,636	-194,266	-177,527	-185,462	-210,679	-138,505	-121,005	-112,636	-14,266
<b>G8F<sub>2</sub></b>	-17,5	-25,87	-16,304	-8,261	-92,391	-83,152	-108,587	-108,804	-279,13	-261,63	-253,261	-264,891
<b>G8S<sub>1</sub></b>	20,833	22,464	-92,971	-84,928	-164,058	-142,319	-147,754	-165,471	-205,797	-188,297	-179,928	-191,558

<b>G9F1</b>	-106,875	22,255	-13,179	-97,636	-154,266	-157,527	-60,462	-75,679	-233,505	-216,005	-207,636	-219,266
<b>G9F2</b>	20,833	-87,536	12,029	27,572	-174,058	-257,319	-65,254	-180,471	-218,297	-200,797	-192,428	-204,058
<b>G9S1</b>	-57,917	-71,286	55,779	-46,178	-130,308	-221,069	-124,004	-254,221	-182,047	-164,547	-156,178	-167,808
<b>G10F1</b>	39,167	-194,203	32,862	-169,094	-140,725	-243,985	-34,42	-47,138	-204,964	-187,464	-179,094	-190,725
<b>G10F2</b>	-27,5	-25,87	-33,804	4,239	-82,391	-80,652	-106,087	-88,804	-284,13	-266,63	-258,261	-269,891
<b>G11F2</b>	32,5	61,63	-211,304	-43,261	-14,891	-253,152	-261,087	-31,304	-214,13	-196,63	-188,261	-199,891
<b>G12F1</b>	-9,167	2,464	-17,971	17,572	-86,558	-292,319	-85,254	-92,971	-253,297	-235,797	-227,428	-239,058
<b>G12S1</b>	-23,125	-23,995	-41,929	-11,386	-108,016	-71,277	-106,712	-131,929	-264,755	-247,255	-238,886	-250,516

**Tabela 2** - Continuação

ALTURA DE ESPIGA												
<b>G2/G1</b>	<b>531542</b>	<b>5100290-11</b>	<b>91600006-3</b>	<b>521274</b>	<b>L20</b>	<b>L724</b>	<b>L845</b>	<b>L1017</b>	<b>521236</b>	<b>9150130-4</b>	<b>5702955</b>	<b>541007</b>
<b>G1F<sub>1</sub></b>	-107,299	-109,69	-115,56	-93,603	-10,234	-65,886	-134,147	-4,255	16,658	-104,473	-21,647	-108,495
<b>G1F<sub>2</sub></b>	-150,841	-153,232	-159,101	-137,145	-63,775	-39,428	-52,688	-57,797	-21,884	-8,014	-12,688	-2,036
<b>G1S<sub>1</sub></b>	-151,049	-153,44	-159,31	-137,353	-46,484	-39,636	-67,897	-70,505	-17,092	-8,223	-2,897	-4,745
<b>G2F<sub>1</sub></b>	-74,799	-77,19	-83,06	-61,103	-110,234	-50,886	-101,647	-129,255	44,158	-71,973	-66,647	-75,995
<b>G2S<sub>1</sub></b>	-137,716	-140,107	-145,976	-124,02	-53,15	-46,303	-62,063	-69,672	-26,259	-9,889	-24,563	-18,911
<b>G4F<sub>1</sub></b>	-148,132	-150,524	-98,893	-134,437	-63,567	-61,719	-57,48	-65,089	-31,676	-20,306	-7,48	-19,328
<b>G4F<sub>2</sub></b>	-136,049	-138,44	-144,31	-122,353	-61,484	-52,136	-100,397	-50,505	-14,592	-10,723	-12,897	-14,745
<b>G4S<sub>1</sub></b>	-148,757	-151,149	-87,018	-135,062	-66,692	-54,844	-75,605	-60,714	-24,801	-20,931	-25,605	-7,453
<b>G5F<sub>1</sub></b>	-90,007	-92,399	-25,768	-76,312	-125,442	28,906	-116,855	-144,464	43,949	-87,181	-81,855	-91,203
<b>G5S<sub>1</sub></b>	-150,549	-92,94	-158,81	-136,853	-63,484	-46,636	-64,897	-50,005	-82,592	-0,223	-4,897	-6,745
<b>G6F<sub>1</sub></b>	-117,924	-120,315	-126,185	-104,228	-90,859	-84,011	-29,772	-52,38	-56,467	19,902	-49,772	-46,62
<b>G6F<sub>2</sub></b>	-97,299	-99,69	-105,56	-83,603	-132,734	-0,886	-76,647	-94,255	-100,842	-19,473	-89,147	41,505
<b>G8F<sub>1</sub></b>	-70,216	-5,107	-78,476	-56,52	-105,65	-103,803	-97,063	-124,672	-73,759	-67,389	-62,063	-13,911
<b>G8F<sub>2</sub></b>	-3,341	-33,232	-1,601	-12,145	-58,775	-41,928	-62,688	-67,797	-149,384	-143,014	-137,688	-147,036
<b>G8S<sub>1</sub></b>	4,784	7,393	-50,976	-44,02	-85,65	-81,303	-74,563	-99,672	-113,759	-107,389	-102,063	-111,411
<b>G9F<sub>1</sub></b>	-57,716	9,893	-5,976	-54,02	-93,15	-88,803	-32,063	-42,172	-128,759	-122,389	-117,063	-126,411
<b>G9F<sub>2</sub></b>	13,118	-46,774	7,357	1,813	-102,317	-147,969	-36,23	-96,339	-117,926	-111,556	-106,23	-115,578

<b>G9S<sub>1</sub></b>	-31,882	-41,774	47,357	-25,687	-77,317	-130,469	-66,23	-151,339	-100,426	-94,056	-88,73	-98,078
<b>G10F<sub>1</sub></b>	28,951	-110,94	23,19	-94,853	-83,984	-142,136	-22,897	-28,005	-112,092	-105,723	-100,397	-109,745
<b>G10F<sub>2</sub></b>	-13,549	-13,44	-19,31	12,647	-43,984	-37,136	-55,397	-40,505	-167,092	-160,723	-155,397	-164,745
<b>G11F<sub>2</sub></b>	12,284	84,893	-128,476	-26,52	-10,65	-153,803	-147,063	-14,672	-123,759	-117,389	-112,063	-121,411
<b>G12F<sub>1</sub></b>	-5,216	-7,607	-5,976	8,48	-38,15	-168,803	-52,063	-54,672	-138,759	-132,389	-127,063	-136,411
<b>G12S<sub>1</sub></b>	-12,507	-9,899	-23,268	-8,812	-57,942	-36,094	-59,355	-76,964	-148,551	-142,181	-136,855	-146,203

**Tabela 2** - Continuação

TOMBAMENTO

<b>G2/G1</b>	<b>531542</b>	<b>5100290-11</b>	<b>91600006-3</b>	<b>521274</b>	<b>L20</b>	<b>L724</b>	<b>L845</b>	<b>L1017</b>	<b>521236</b>	<b>9150130-4</b>	<b>5702955</b>	<b>541007</b>
<b>G1F<sub>1</sub></b>	-7,536	-4,732	-6,188	-7,449	-1,428	-1,536	-5,949	-1,471	11,159	-4,21	-1,971	-3,014
<b>G1F<sub>2</sub></b>	-7,37	-4,565	-6,022	-7,283	-4,261	-3,37	6,717	-4,304	1,826	-2,543	-0,304	-2,848
<b>G1S<sub>1</sub></b>	-8,078	-5,274	-6,73	-7,991	-3,969	8,922	-2,991	-2,013	-2,382	0,748	-1,013	-3,556
<b>G2F<sub>1</sub></b>	-5,328	-2,524	-3,98	-5,241	-2,219	-5,828	-3,741	-3,763	2,368	-2,002	-1,263	-0,806
<b>G2S<sub>1</sub></b>	-8,87	-6,065	-7,522	-8,783	-1,261	-1,87	-3,783	1,696	6,326	2,457	-4,304	-2,348
<b>G4F<sub>1</sub></b>	-6,245	-3,44	-4,397	-6,158	-1,636	-4,245	1,342	-2,179	-2,049	-2,418	-1,679	-1,223
<b>G4F<sub>2</sub></b>	-4,87	-2,065	-3,522	-4,783	-1,761	-6,87	-3,283	-3,304	-2,174	-0,543	-0,804	-0,348
<b>G4S<sub>1</sub></b>	-9,745	-6,94	-8,397	-9,658	-6,136	18,255	-3,158	-3,179	-3,549	0,082	2,321	-4,223
<b>G5F<sub>1</sub></b>	-5,161	-2,357	-3,813	-5,074	-2,053	-2,661	-3,574	-3,596	-2,466	-1,835	-1,096	-0,639
<b>G5S<sub>1</sub></b>	-5,203	-1,899	-3,855	-5,116	-1,594	-8,203	-3,116	-2,638	-1,507	-0,377	-0,638	-0,181
<b>G6F<sub>1</sub></b>	-7,37	-4,565	-6,022	-7,283	-0,261	-0,87	-2,783	1,196	-4,674	2,957	-2,804	-1,848
<b>G6F<sub>2</sub></b>	-7,036	-4,232	-5,688	-6,949	-3,928	10,964	-4,449	-4,471	-4,341	-0,71	-2,971	-0,514
<b>G8F<sub>1</sub></b>	-4,703	-1,399	-3,355	-4,616	-1,594	-8,203	-3,116	-3,138	-2,007	-1,377	-0,638	-0,181
<b>G8F<sub>2</sub></b>	-5,036	-1,732	-3,688	-4,449	-1,928	-7,536	-0,949	-3,471	-2,341	-1,71	-0,971	-0,514
<b>G8S<sub>1</sub></b>	6,797	0,601	-1,355	-3,616	-2,594	-10,203	-5,116	-4,638	-4,507	-3,877	-3,138	-2,681
<b>G9F<sub>1</sub></b>	-5,036	-0,232	0,812	-3,949	-4,928	1,964	0,051	-3,471	-5,841	-5,21	-4,471	-4,014
<b>G9F<sub>2</sub></b>	2,422	-6,274	-0,73	12,509	-5,469	-12,578	2,009	-4,513	-6,382	-5,752	-5,013	-4,556

<b>G9S<sub>1</sub></b>	-1,411	7,393	6,937	6,176	-4,303	-13,411	-2,324	-8,346	-7,216	-6,585	-5,846	-5,389
<b>G10F<sub>1</sub></b>	20,172	-5,524	-2,48	-8,241	0,281	-11,828	-2,741	-5,263	-5,632	-5,002	-4,263	-3,806
<b>G10F<sub>2</sub></b>	13,172	-3,524	-1,98	13,259	-10,219	13,672	-11,241	-4,763	-11,632	-11,002	-10,263	-9,806
<b>G11F<sub>2</sub></b>	-5,578	-2,774	-4,73	1,009	5,531	-9,578	-4,491	-4,013	-3,382	-2,752	-2,013	-1,556
<b>G12F<sub>1</sub></b>	-2,328	-0,024	10,52	7,259	-4,219	-15,328	-6,241	8,737	-9,132	-8,502	-7,763	-7,306
<b>G12S<sub>1</sub></b>	-1,453	-3,649	0,395	0,634	-5,844	4,547	-2,866	-4,888	-6,257	-5,627	-4,888	-4,431

**Tabela 2 - Continuação**

ESTANDE												
<b>G2/G1</b>	<b>531542</b>	<b>5100290-11</b>	<b>91600006-3</b>	<b>521274</b>	<b>L20</b>	<b>L724</b>	<b>L845</b>	<b>L1017</b>	<b>521236</b>	<b>9150130-4</b>	<b>5702955</b>	<b>541007</b>
<b>G1F1</b>	-30,112	-29,004	-31,612	-25,938	-5,069	-18,025	-39,917	-3,308	3,127	-29,243	-15,938	-30,373
<b>G1F2</b>	-44,112	-43,004	-45,612	-39,938	-15,069	-19,025	-14,417	-17,308	-7,373	-3,743	-2,438	-3,373
<b>G1S1</b>	-43,946	-42,837	-45,446	-39,772	-18,402	-10,859	-18,25	-17,141	-7,207	-2,576	-4,772	-4,207
<b>G2F1</b>	-21,654	-20,545	-23,154	-17,48	-33,111	-18,067	-31,458	-35,35	7,085	-20,784	-18,98	-21,915
<b>G2S1</b>	-42,446	-41,337	-43,946	-38,272	-17,902	-16,859	-16,25	-21,141	-6,207	-5,076	-0,772	-5,207
<b>G4F1</b>	-46,196	-45,087	-27,196	-42,022	-18,652	-17,609	-21,00	-18,891	-7,957	-3,826	-3,522	-3,457
<b>G4F2</b>	-42,612	-41,504	-44,112	-38,438	-13,569	-10,025	-31,917	-15,808	-2,873	-2,743	-10,438	-1,373
<b>G4S1</b>	-44,571	-43,462	-27,571	-40,397	-16,027	-12,984	-18,375	-24,766	-10,332	-5,201	-6,397	-5,332
<b>G5F1</b>	-26,321	-25,212	-8,321	-22,147	-37,777	5,266	-36,125	-40,016	10,918	-25,451	-23,647	-26,582
<b>G5S1</b>	-44,696	-29,087	-46,196	-40,522	-18,152	-10,109	-15,00	-28,891	-8,457	-5,326	-3,022	-5,957
<b>G6F1</b>	-35,654	-34,545	-37,154	-31,48	-25,611	-24,067	-9,458	-13,85	-19,415	2,716	-11,98	-14,915
<b>G6F2</b>	-29,029	-27,92	-30,529	-24,855	-40,486	-4,942	-18,333	-24,225	-30,79	-7,159	-26,355	9,21
<b>G8F1</b>	-21,237	-0,629	-22,737	-17,063	-32,694	-29,15	-31,042	-34,933	-22,998	-20,368	-18,563	-3,998
<b>G8F2</b>	-1,821	-3,212	-5,321	-0,147	-19,777	-11,234	-21,125	-19,016	-45,582	-42,951	-41,147	-44,082
<b>G8S1</b>	7,346	1,955	-16,654	-10,48	-23,111	-31,067	-25,958	-28,35	-34,415	-31,784	-29,98	-32,915
<b>G9F1</b>	-18,237	-2,629	0,263	-14,063	-30,694	-25,15	-8,542	-8,933	-38,998	-36,368	-34,563	-37,498

<b>G9F<sub>2</sub></b>	1,554	-13,837	2,554	2,228	-26,402	-42,359	-15,25	-27,641	-36,207	-33,576	-31,772	-34,707
<b>G9S<sub>1</sub></b>	-12,696	-10,587	10,304	-7,022	-20,152	-37,109	-20,00	-42,891	-30,957	-28,326	-26,522	-29,457
<b>G10F<sub>1</sub></b>	7,179	-30,712	3,679	-27,647	-24,777	-39,734	-12,125	-5,516	-33,582	-30,951	-29,147	-32,082
<b>G10F<sub>2</sub></b>	-2,154	-2,045	-10,154	-2,48	-14,611	-12,067	-16,458	-22,35	-45,415	-42,784	-40,98	-43,915
<b>G11F<sub>2</sub></b>	5,138	2,746	-33,362	-8,688	-6,319	-39,775	-41,667	-7,558	-33,623	-30,993	-29,188	-32,123
<b>G12F<sub>1</sub></b>	-0,612	-6,004	-1,112	-0,438	-13,069	-48,525	-10,417	-14,308	-42,373	-39,743	-37,938	-40,873
<b>G12S<sub>1</sub></b>	-2,654	-1,045	-6,154	-2,48	-18,111	-16,067	-16,458	-17,35	-45,915	-43,284	-41,48	-44,415

**Tabela 2** - Continuação

UMIDADE DE GRÃOS												
<b>G2/G1</b>	<b>531542</b>	<b>5100290-11</b>	<b>91600006-3</b>	<b>521274</b>	<b>L20</b>	<b>L724</b>	<b>L845</b>	<b>L1017</b>	<b>521236</b>	<b>9150130-4</b>	<b>5702955</b>	<b>541007</b>
<b>G1F<sub>1</sub></b>	-12,649	-12,888	-13,931	-11,583	0,351	-9,105	-16,822	-2,453	1,178	-12,844	-5,105	-12,953
<b>G1F<sub>2</sub></b>	-18,149	-18,388	-19,431	-17,083	-6,149	-7,605	-7,822	-7,953	-2,322	-0,844	-2,105	-0,953
<b>G1S<sub>1</sub></b>	-17,565	-17,804	-18,848	-16,5	-7,065	-6,522	-5,739	-8,87	-4,739	-1,261	-2,022	-1,87
<b>G2F<sub>1</sub></b>	-9,274	-9,513	-10,556	-8,208	-14,774	-4,73	-13,447	-15,078	5,053	-9,469	-9,23	-9,578
<b>G2S<sub>1</sub></b>	-17,774	-18,013	-19,056	-16,708	-5,274	-5,73	-6,947	-8,578	-3,447	-2,469	-1,73	-3,078
<b>G4F<sub>1</sub></b>	-18,107	-18,346	-10,389	-17,042	-8,107	-10,063	-8,781	-9,911	-4,781	-0,303	-0,563	-2,411
<b>G4F<sub>2</sub></b>	-18,857	-19,096	-20,139	-17,792	-5,357	-4,813	-15,531	-6,661	-0,531	0,447	1,687	-2,161
<b>G4S<sub>1</sub></b>	-17,857	-18,096	-11,139	-16,792	-8,357	-5,813	-8,531	-10,161	-3,531	-2,053	-2,813	-3,661
<b>G5F<sub>1</sub></b>	-10,94	-11,179	-3,223	-9,875	-16,44	2,603	-15,114	-16,745	5,386	-11,136	-10,897	-11,245
<b>G5S<sub>1</sub></b>	-19,357	-11,596	-20,639	-18,292	-7,857	-6,813	-8,531	-8,161	-2,531	-1,553	-0,813	-2,661
<b>G6F<sub>1</sub></b>	-13,94	-14,179	-15,223	-12,875	-11,94	-10,397	-4,614	-3,745	-8,614	-1,136	-5,897	-6,245
<b>G6F<sub>2</sub></b>	-11,565	-11,804	-12,848	-10,5	-17,065	0,478	-8,239	-9,87	-13,239	-5,761	-11,522	3,13
<b>G8F<sub>1</sub></b>	-8,565	0,696	-9,848	-7,5	-14,065	-12,522	-12,739	-14,37	-10,239	-8,761	-8,522	-2,37
<b>G8F<sub>2</sub></b>	-4,774	-1,013	-0,056	-0,208	-6,274	-7,73	-7,947	-9,578	-18,947	-17,469	-17,23	-17,578
<b>G8S<sub>1</sub></b>	1,268	0,529	-6,014	-4,667	-12,232	-9,188	-9,406	-12,036	-15,406	-13,928	-13,688	-14,036
<b>G9F<sub>1</sub></b>	-7,399	0,362	-0,181	-5,833	-12,899	-11,355	-4,072	-5,703	-16,572	-15,094	-14,855	-15,203
<b>G9F<sub>2</sub></b>	1,518	-7,221	0,736	2,583	-11,482	-18,438	-3,156	-13,286	-16,156	-14,678	-14,438	-14,786

<b>G9S<sub>1</sub></b>	-4,315	-4,554	4,402	-3,25	-9,815	-15,772	-8,489	-17,62	-13,489	-12,011	-11,772	-12,12
<b>G10F<sub>1</sub></b>	1,518	-13,221	1,736	-11,917	-11,482	-16,938	-1,656	-2,786	-14,656	-13,178	-12,938	-13,286
<b>G10F<sub>2</sub></b>	-2,482	-1,221	-3,264	0,583	-6,482	-5,938	-7,656	-8,286	-19,656	-18,178	-17,938	-18,286
<b>G11F<sub>2</sub></b>	3,226	0,487	-14,556	-4,708	0,226	-17,23	-17,447	-3,578	-14,947	-13,469	-13,23	-13,578
<b>G12F<sub>1</sub></b>	-1,19	-0,429	-3,473	1,375	-6,19	-19,647	-6,864	-7,495	-17,364	-15,886	-15,647	-15,995
<b>G12S<sub>1</sub></b>	-1,315	-2,054	-2,598	-1,75	-9,815	-5,272	-8,989	-5,62	-18,989	-17,511	-17,272	-17,62

**Tabela 2 - Continuação**

PRODUTIVIDADE												
<b>G2/G1</b>	<b>531542</b>	<b>5100290-11</b>	<b>91600006-3</b>	<b>521274</b>	<b>L20</b>	<b>L724</b>	<b>L845</b>	<b>L1017</b>	<b>521236</b>	<b>9150130-4</b>	<b>5702955</b>	<b>541007</b>
<b>G1F<sub>1</sub></b>	-4,17	-4,627	-5,54	-3,214	-1,583	-2,779	-5,909	0,482	-0,714	-5,301	-2,953	-4,996
<b>G1F<sub>2</sub></b>	-7,587	-8,043	-8,957	-6,63	-1,5	-3,196	-1,326	-3,435	-0,63	0,783	-2,37	1,587
<b>G1S<sub>1</sub></b>	-6,712	-7,168	-8,082	-5,755	-1,625	-2,321	-2,451	-3,06	-2,255	0,658	-1,995	-0,538
<b>G2F<sub>1</sub></b>	-2,795	-3,252	-4,165	-1,839	-5,208	-2,404	-4,534	-6,143	-0,839	-3,926	-2,578	-3,621
<b>G2S<sub>1</sub></b>	-5,337	-5,793	-6,707	-4,38	-1,25	-3,446	-2,076	-4,185	-3,38	0,533	-3,12	-2,163
<b>G4F<sub>1</sub></b>	-8,004	-8,46	-5,373	-7,047	-3,917	-4,612	-3,743	-2,851	-2,547	1,366	2,214	1,67
<b>G4F<sub>2</sub></b>	-7,42	-7,877	-8,79	-6,464	-1,833	-1,529	-5,159	-1,768	0,536	0,449	-2,203	0,754
<b>G4S<sub>1</sub></b>	-6,337	-6,793	-4,207	-5,38	-0,75	-4,946	-3,576	-3,185	-3,38	-0,467	-3,12	0,837
<b>G5F<sub>1</sub></b>	-3,879	-4,335	-0,748	-2,922	-6,292	1,013	-5,618	-7,226	2,078	-5,009	-3,661	-4,705
<b>G5S<sub>1</sub></b>	-8,295	-6,252	-9,665	-7,339	-3,208	1,596	-1,534	-3,143	-0,339	1,574	-1,078	-3,621
<b>G6F<sub>1</sub></b>	-5,045	-5,502	-6,415	-4,089	-3,958	-4,154	-2,284	-3,893	-1,589	-0,176	-1,328	-2,871
<b>G6F<sub>2</sub></b>	-3,629	-4,085	-4,998	-2,672	-6,042	-3,237	-3,368	-4,976	-4,172	-1,259	-3,411	0,545
<b>G8F<sub>1</sub></b>	-3,129	0,915	-4,498	-2,172	-5,542	-3,737	-4,868	-6,476	-3,672	-4,259	-2,911	-0,955
<b>G8F<sub>2</sub></b>	-0,462	2,082	1,668	-2,005	-4,375	-2,071	-3,701	-2,31	-7,505	-8,092	-6,745	-7,788
<b>G8S<sub>1</sub></b>	0,746	-0,71	-2,623	-1,797	-4,667	-3,862	-4,493	-4,601	-4,797	-5,384	-4,036	-5,08
<b>G9F<sub>1</sub></b>	-3,879	-0,335	0,752	-1,922	-4,792	-4,487	-2,118	-0,726	-5,922	-6,509	-5,161	-6,205
<b>G9F<sub>2</sub></b>	-1,379	-1,835	0,752	-2,422	-5,792	-4,987	-2,118	-3,726	-4,922	-5,509	-4,161	-5,205

<b>G9S<sub>1</sub></b>	-2,295	-3,252	3,335	-2,339	-4,208	-4,404	-3,534	-7,143	-4,339	-4,926	-3,578	-4,621
<b>G10F<sub>1</sub></b>	-1,587	-5,043	1,543	-3,63	-4,50	-5,196	-2,326	0,065	-5,13	-5,717	-4,37	-5,413
<b>G10F<sub>2</sub></b>	-1,42	0,623	0,21	-2,464	-1,333	-4,029	-1,659	-3,268	-6,964	-7,551	-6,203	-7,246
<b>G11F<sub>2</sub></b>	2,538	0,582	-6,332	-1,505	-0,375	-5,571	-6,701	-1,81	-5,505	-6,092	-4,745	-5,788
<b>G12F<sub>1</sub></b>	-0,17	-0,127	-0,54	-0,714	-2,583	-6,279	-2,409	-3,518	-6,214	-6,801	-5,453	-6,496
<b>G12S<sub>1</sub></b>	1,08	0,123	0,21	-0,464	-3,833	-4,529	-3,659	-2,268	-6,964	-7,551	-6,203	-7,246