

ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO TEOR DE ÓLEO
EM SEMENTES INDIVIDUAIS DE MILHO POR RMN

BC 33389

S. N. 98-101

M

I. FÍSICA TM UNICAMP		
n.º classif.		
n.º autor	V757a	
.....ed.	v.....	ex.....
n.º tombo.	TM/438	

ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO TEOR DE ÓLEO
EM SEMENTES INDIVIDUAIS DE MILHO POR RMN

Orientador:

Prof. CESAR AUGUSTO POR DEUS ÉVORA
Instituto de Física da Universidade
Estadual de Campinas

Co-orientador:

Prof. WILLIAM JOSÉ DA SILVA
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas

CARLOS ALBERTO VINHA

Tese apresentada ao Instituto de
Física da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Dezembro de 1979

Dedico a

minha esposa, Berenice

meu pai, Oswaldo Vinha

meu amigo, Bruno Quaino

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer às seguintes pessoas que, de um modo ou de outro, colaboraram para a concepção deste trabalho.

Ao professor William José da Silva, do Instituto de Biologia da Unicamp, pela escolha do assunto, pela eficiência no treinamento, pelo carinho na orientação, e pelas lições de atitude científica que, tenho certeza, marcarão profundamente minha formação no campo da pesquisa.

Ao professor Cesar Augusto Por Deus Évora, pela paciência e dedicação no trabalho de orientação e treinamento na parte de RMN.

Aos professores Carlos Rettori e Gaston E. Barberis, pela assistência prestada durante as medidas em laboratório.

À Colega Maria Cecilia Wilmers pela colaboração prestada durante o início do trabalho em RMN.

Ao meu irmão Joaquim Miguel Vinha, pela ajuda no acompanhamento e polinização das plantas no campo.

A Antonio Campineiro e Gonçalo Francisco de Cêlis, pela assistência técnica na manutenção da aparelhagem.

Aos colegas Neli Kika Honda, Manoel Alvarez, Eliézer José Marques, Mauro Polizer e Eronides de Jesus Biscola, professores da Universidade Estadual de Mato Grosso, pelo empenho na concretização de meu afastamento e pelos gestos de incentivo mostrados durante o afastamento.

Agradeço também à Universidade Estadual de Mato Grosso pelo suporte financeiro e pela confiança em mim depositada na concessão do afastamento.

Í N D I C E

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	2
3. FUNDAMENTOS DO MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	
3.1. Introdução	4
3.2. Movimento de um núcleo atômico num Campo Magnético	4
3.3. Equações de Bloch	7
3.4. Detecção da Ressonância; Indução Nuclear	12
4. MATERIAL E MÉTODO	
4.1. Aparelhagem Utilizada no Experimento	16
4.2. A Medida do Teor de Óleo em Milho por RMN	19
4.2.1. Seletividade do Método	19
4.2.2. Necessidade de Secagem das Amostras	19
4.2.3. Orientação da Amostra	22
4.2.4. Tratamento dos Espectros de RMN	22
4.2.5. O Cálculo do Teor de Óleo	23
4.2.6. Precisão do Método	24
4.3. Germoplasma Estudado	25
4.3.1. Linhagens Utilizadas	25
4.3.2. Técnica Experimental	26
4.3.3. Polinização	26
4.3.4. Preparo das Sementes	28
4.4. Análise Estatística dos Dados	31
4.4.1. O Teste t para Observações Pareadas	31
4.4.2. O Teste F para Observações Pareadas	33
4.4.3. Coeficiente de Variação	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Efeito Médio	37
5.2. Análise da Variabilidade	40
5.2.1. Análise da Variância	40
5.2.2. Análise dos Coeficientes de Variação	42
6. CONCLUSÕES	50
7. RESUMO	51
8. BIBLIOGRAFIA	53

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O melhoramento de populações de plantas alógamas, como o milho, envolve freqüentemente cruzamentos de plantas heterozigotas capazes de gerar grande variabilidade genética. Essa variabilidade surge do grande número de gametas produzidos por ambas as plantas parentais e do número de combinações desses gametas na formação dos indivíduos da geração F_1 .

Nos programas convencionais de seleção para conteúdo de óleo as análises químicas (destrutivas) obviamente são feitas em uma amostra, geralmente de grande número de sementes. Consequentemente há a perda de informação sobre diferenças genéticas entre sementes, bem como da capacidade de utilizá-las, o que muitas vezes pode ter influência decisiva no ganho genético. Isso é agravado pelo fato da amostra analisada ser diferente da amostra que vai ser cruzada. No caso do teor de óleo, diferenças individuais não são mascaradas quando se utiliza a análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uma vez que esse método permite a determinação do teor de óleo existente em cada semente. Talvez esse seja o ponto fundamental que, no caso do melhoramento para teor de óleo, tenha colocado o método de RMN em posição de destaque.

A análise do teor de óleo por RMN foi utilizada pioneiramente por Conway¹ (1961), sendo posteriormente empregada em programas de seleção em vários países²⁻⁸ e, no caso particular do Brasil, vem sendo utilizada com êxito desde 1975 na Universidade Estadual de Campinas, num programa multidisciplinar envolvendo os Institutos de Física e Biologia⁶. O presente trabalho constitui parte desse programa.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo fundamental deste trabalho é uma tentativa para decompor o efeito do teor de óleo no milho em efeito devido ao genótipo da planta mãe e efeito devido ao genótipo da semente formada nessa planta, em cruzamentos específicos.

Esse estudo envolve a análise de quatro grupos de germoplasmas, constituído cada um de duas linhagens homozigotas. Cada grupo de cruzamento é caracterizado pela fecundação de plantas com genes para endosperma branco e no caso com médio teor de óleo, com uma mistura de pólen constituída de pólen da própria linhagem e pólen de uma linhagem de endosperma amarelo, com maior teor de óleo, escolhida aleatoriamente para formar o grupo. Em milho a característica endosperma branco é recessiva em relação à endosperma amarelo²⁸. Desta forma, nas plantas assim fecundadas, temos dois tipos de sementes: sementes brancas, resultantes da auto-fecundação e sementes amarelas, resultado do cruzamento propriamente dito. Logo, as sementes brancas correspondem ao genótipo da planta, enquanto que as sementes amarelas monitoram o genótipo da semente resultante do cruzamento de plantas de maior teor de óleo com plantas de teor médio.

A decomposição do efeito do teor de óleo na semente devido a esses diferentes genótipos será feita analisando-se sementes adjacentes (pareadas) de cor contrastante na espiga, acrescida eventualmente de informação sobre características de sementes resultantes da auto-fecundação da linhagem amarela de maior teor de óleo, cujo pólen contribuiu com metade da mistura usada nos cruzamentos.

Trata-se portanto de um trabalho básico, para verificar a possibilidade de identificar diferenças genéticas para teor de óleo entre sementes de uma espiga que serão eventualmente capitalizadas em programas de seleção para maior teor de óleo. Essa informação orientaria também a escolha de linhagens que deveriam ser usadas na síntese de híbridos comerciais com alto teor de óleo.

O trabalho, baseado na análise de sementes com genótipos distintos para produção de óleo, visa ainda a determinação do papel exercido pelas diferenças não genéticas que ocorrem dentro de uma mesma espiga e pelas diferenças não genéticas que ocorrem entre plantas diferentes da mesma linhagem, dentro da mesma parcela experimental, ou em repetições (blocos) no experimento de campo.

Os efeitos não genéticos que se acham confundidos com efeitos genéticos constituem-se em sérias barreiras que limitam frequentemente a obtenção de ganhos rápidos de seleção. O conhecimento da magnitude desses efeitos, bem como dos locais em que mais se manifestam, permite a identificação de critérios de seleção mais seguros para aceleração dos progressos genéticos em programas de seleção.

A massa das sementes foi também determinada em sementes individuais para se estudar o possível efeito dessa característica na amostragem de sementes para análise do teor de óleo determinado por RMN.

3. FUNDAMENTOS DO MÉTODO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

3.1. Introdução

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi observada pela primeira vez em 1945 por Bloch et al.²⁰ e por Purcell et al.¹⁹. Desde então essa técnica tem se tornado uma poderosa ferramenta para a medida de momentos de dipolos magnéticos de núcleos, para a caracterização da estrutura de macro-moléculas, bem como para estudar movimento de íons e átomos em sólidos e líquidos²⁴. Nosso interesse em RMN prende-se ao fato dessa técnica ser não-destrutiva, o que é de extrema importância para o estudo de sistemas biológicos.

Neste capítulo resumimos os fundamentos físicos da técnica de RMN para que biólogos e neófitos na área possam entender o trabalho por nós desenvolvido.

3.2. Movimento de um núcleo atômico num campo magnético

O objeto principal de estudo no fenômeno de RMN é o núcleo dos átomos. A maioria dos núcleos possui um momento de dipolo magnético $\vec{\mu}$. Se colocarmos esse dipolo na presença de um campo magnético $\vec{H}_0$, ele sofrerá um torque dado por

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{H}_0 \quad (3.1)$$

O dipolo magnético tenderia a se alinhar com o campo magnético; quando alinhado com o campo, o dipolo assim permaneceria. Os núcleos, entretanto, possuem também um momento angular intrínseco, ou spin, $\vec{J}$, existindo a seguinte relação de proporcionalidade entre esse momento angular e o momento magnético dipolar:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{J} \quad (3.2)$$

A constante de proporcionalidade γ é denominada fator giromagnético e para prótons essa constante assume o valor de 4,25 MHz/kg. O torque, neste caso, faz com que o vetor momento angular do núcleo precesse em torno da direção do campo magnético, da mesma forma que o torque exercido pelo peso de um pião faz com que o vetor momento angular do pião precesse em torno do campo gravitacional terrestre, como mostrado na Figura 3.1. A equação de movimento do momento angular $\vec{J}$ é

$$\frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\tau} \quad (3.3)$$

Levando (3.2) e (3.1) em (3.3) temos

$$\frac{1}{\gamma} \frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{H}_0 \quad (3.4)$$

considerando a direção do campo magnético como a direção $\hat{z}$, ou seja, considerando o campo magnético dado por $\vec{H}_0 = H_0 \hat{z}$, uma solução da equação diferencial 3.4 é dada por

$$\begin{aligned} \mu_x &= \mu_0 \sin \omega_0 t \\ \mu_y &= \mu_0 \cos \omega_0 t \\ \mu_z &= \mu_{0z} \end{aligned} \quad (3.5)$$

onde

$$\omega_0 = \gamma H_0 \quad (3.6)$$

é a chamada frequência de precessão de Larmor.

Num agregado de spins nucleares, como é o caso da matéria condensada, os spins não precessionam livremente em torno de $\vec{H}_0$. Devido às interações entre os spins nucleares e as vibrações dos átomos, as chamadas interações spin-rede, os spins tendem a ceder aos átomos que constituem a rede sua ener-

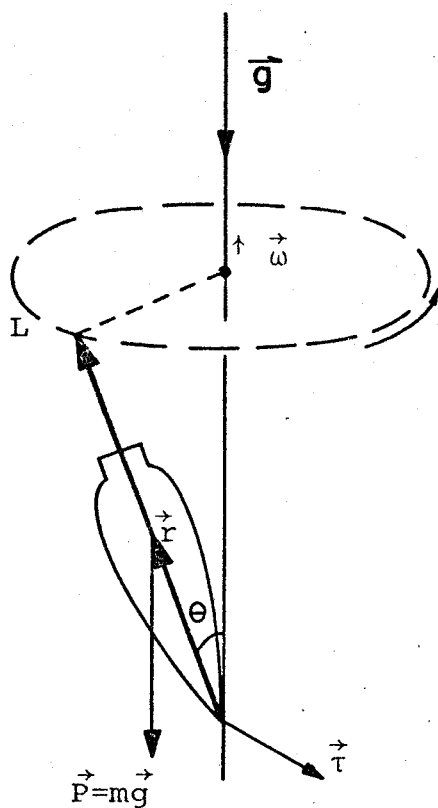
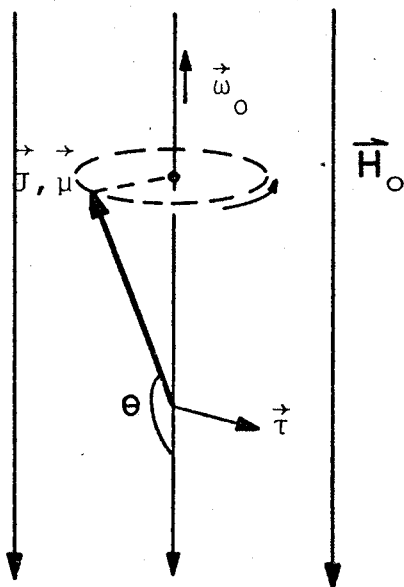


Figura 3.1 : (a) Precessão livre do vetor momento de dipolo magnético em torno da direção do campo magnético.
 (b) precessão do vetor momento angular de um pião em torno da direção do campo gravitacional terrestre.

gia potencial de interação com o campo magnético, dada por

$$U = - \vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 \quad (3.7)$$

Isto significa que a resultante dos momentos magnéticos vai tendendo a se alinhar com o campo magnético externo, assumindo o seu valor de equilíbrio.

Por outro lado, a existência de interações entre os próprios spins faz com que as componentes x e y dos vários spins que precessionam em torno de $\vec{H}_0$ se tornem gradativamente defazadas, até que não exista componente média de spin nessas direções.

Essas considerações sobre a evolução temporal da soma das componentes dos momentos magnéticos dipolares na matéria condensada levaram Bloch²¹ a formular suas conhecidas equações para as componentes M_x , M_y e M_z da Magnetização $\vec{M}$ (soma dos momentos magnéticos sobre um volume unitário).

3.3. Equações de Bloch

Consideremos uma amostra composta de um grande número de spins, colocada em uma região onde existe um campo magnético $\vec{H}_0$ na direção $\hat{z}$. A magnetização $\vec{M}_0$ na situação de equilíbrio é escrita

$$\vec{M}_0 = \chi_0 \vec{H}_0 \quad (3.8)$$

onde χ_0 é a susceptibilidade magnética nuclear estática.

Se além do campo magnético uniforme $\vec{H}_0$ aplicarmos um campo girante no plano xy , como indicado na Figura 3.2, de componentes

$$\begin{aligned} H_x &= H_1 \cos \omega t \\ H_y &= -H_1 \sin \omega t \end{aligned} \quad (3.9)$$

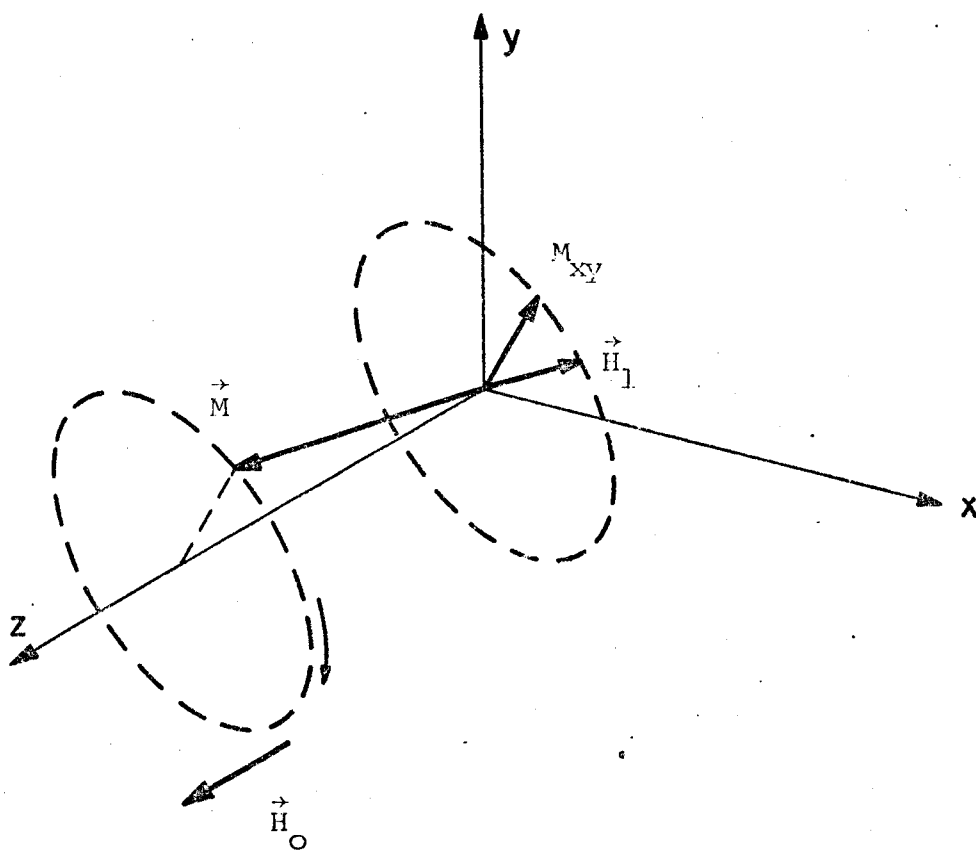


Figura 3.2 : Precessão do vetor magnetização $\vec{M}$. A amostra está sujeita a um campo estático na direção do eixo $\underline{z}$ e a um campo magnético girante no plano $\underline{xy}$.

a equação de movimento de $\vec{M}$ deverá considerar o campo total $\vec{H}$, da do por

$$\vec{H} = H_1 \cos \omega t \hat{x} - H_1 \sin \omega t \hat{y} + H_0 \hat{z} \quad (3.10)$$

assumindo forma diferente da equação (3.4). Bloch sugeriu que a equação do movimento de $\vec{M}$, além dos termos de interação da magnetização com o campo externo resultante, $\vec{H}$, deveria incluir também as interações spin-rede e spin-spin. Propôs, então, as seguintes equações para M_x , M_y , M_z

$$\begin{aligned} \frac{dM_x}{dt} &= \gamma(M_y H_0 + M_z H_1 \sin \omega t) - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma(M_z H_1 \cos \omega t - M_x H_0) - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= \gamma(-M_x H_1 \sin \omega t - M_y H_1 \cos \omega t) + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \end{aligned} \quad (3.11)$$

onde T_1 é o tempo de relaxação spin-rede, ou, o tempo de decaimento da componente M_z da magnetização ao seu valor de equilíbrio M_0 e T_2 é o tempo de relaxação spin-spin, ou, o tempo de decaimento das componentes M_x e M_y ao seu valor nulo de equilíbrio. Resolvendo essas equações, obtemos

$$M_x = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \frac{(2H_1 \cos \omega t)(\omega_0 - \omega)T_2 + 2H_1 \sin \omega t}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (3.12)$$

$$M_y = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \frac{2H_1 \cos \omega t - (2H_1 \sin \omega t)(\omega_0 - \omega)T_2}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (3.13)$$

$$M_z = \chi_0 H_0 \frac{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 T_1 T_2} \quad (3.14)$$

Na maioria dos experimentos reais, o campo magnético ao invés de girante é linearmente polarizado, podendo ser da forma

$$H_x = 2H_1 \cos \omega t \quad (3.15)$$

Podemos colocar as equações (3.12) e (3.13) em função das componentes longitudinal χ_o e transversais χ' e χ'' da susceptibilidade magnética nuclear

$$\begin{aligned} M_x &= \frac{1}{2} \frac{\chi_o \omega_o T_2}{1 + (\omega_o - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \{ (\omega - \omega_o) T_2 2H_1 \cos \omega t + 2H_1 \sin \omega t \} \\ &= \chi' 2H_1 \cos \omega t + \chi'' 2H_1 \sin \omega t \\ &= 2H_1 (\chi' \cos \omega t + \chi'' \sin \omega t) \end{aligned} \quad (3.16)$$

$$\begin{aligned} M_y &= \frac{1}{2} \frac{\chi_o \omega_o T_2}{1 + (\omega_o - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \{ 2H_1 \cos \omega t - (\omega_o - \omega) T_2 2H_1 \sin \omega t \} \\ &= \chi'' 2H_1 \cos \omega t - \chi' 2H_1 \sin \omega t \\ &= 2H_1 (\chi'' \cos \omega t - \chi' \sin \omega t) \end{aligned} \quad (3.17)$$

onde consideramos

$$\chi' = \frac{1}{2} \chi_o \omega_o T_2 \left\{ \frac{(\omega_o - \omega) T_2}{1 + (\omega_o - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \right\} \quad (3.18)$$

$$\chi'' = \frac{1}{2} \chi_o \omega_o T_2 \left\{ \frac{1}{1 + (\omega_o - \omega)^2 T_2^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \right\} \quad (3.19)$$

Como em nosso experimento trabalhamos com um campo H_1 de pequena intensidade, podemos desprezar os terceiros termos dos denominadores de (3.18) e (3.19), pois

$$\gamma^2 H_1^2 T_1 T_2 \ll 1 \quad (3.20)$$

essa aproximação conduz a

$$M_z \cong M_o = \chi_o H_o \quad (3.21)$$

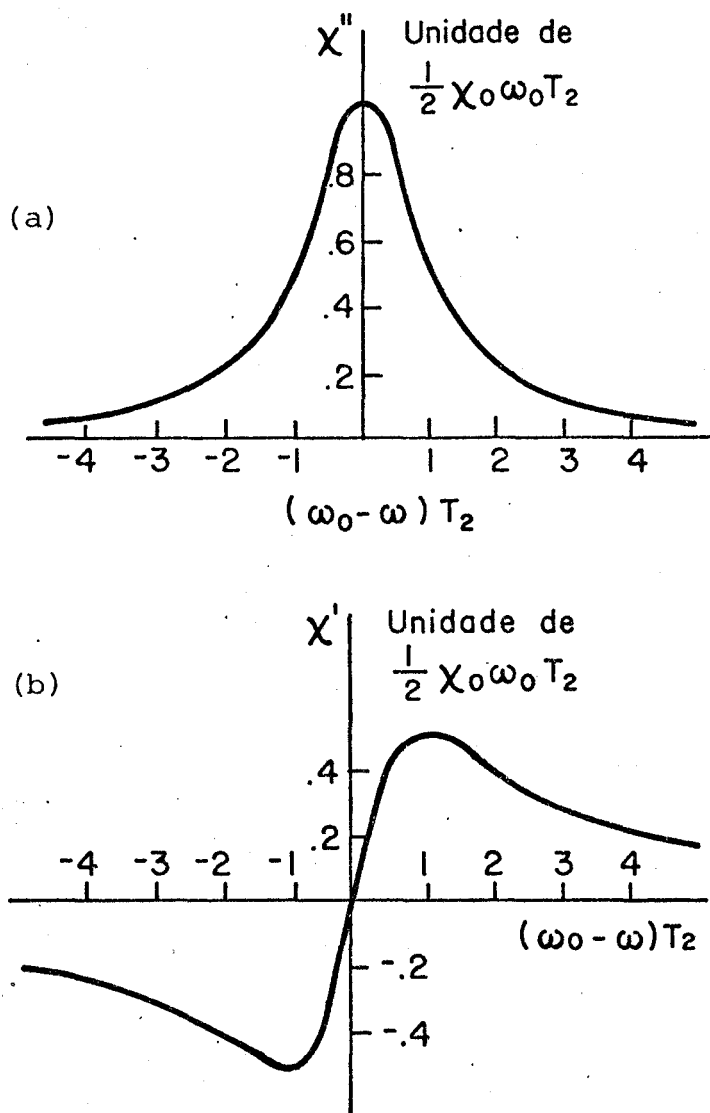


Figura 3.3. : Curvas correspondentes às componentes da Susceptibilidade Magnética Nuclear

- (a) absorção
- (b) dispersão

e

$$\chi' = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \left\{ \frac{(\omega_0 - \omega) T_2}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2} \right\} \quad (3.22)$$

$$\chi'' = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \left\{ \frac{1}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2} \right\} \quad (3.23)$$

A componente χ'' é conhecida por absorção e a componente χ' por dispersão. Os gráficos dessas susceptibilidades são vistos na Figura 3.3. Observa-se que a largura à meia altura da absorção é dada por $1/2T_2$.

3.4. Detecção da Ressonância; Indução Nuclear

Se o sistema, constituído de um grande número de spins nucleares, estiver colocado no interior de uma bobina alinhada com o eixo y , a variação de M_y , que corresponde também a uma variação no fluxo de indução magnética dentro da bobina, pode ser detetada. Um sistema capaz de produzir e detetar a variação de fluxo é representado na sua essência na Figura 3.4. Nessa figura, T é a bobina transmissora que produziria o campo magnético $H_x = 2H_1 \cos \omega t$ e R a bobina receptora que detetaria a variação de M_y . A perpendicularidade entre as bobinas transmissora e receptora visa garantir a inexistência na bobina receptora de fluxo de indução magnética produzido pela bobina transmissora.

A força eletromotriz (f.e.m.) induzida na bobina receptora é dada pela lei de Faraday:

$$\varepsilon = - \frac{d\Phi_y}{dt} \quad (3.24)$$

onde Φ_y é o fluxo de indução magnética que atravessa a área das espiras da bobina receptora. Como a variação de fluxo só é produ

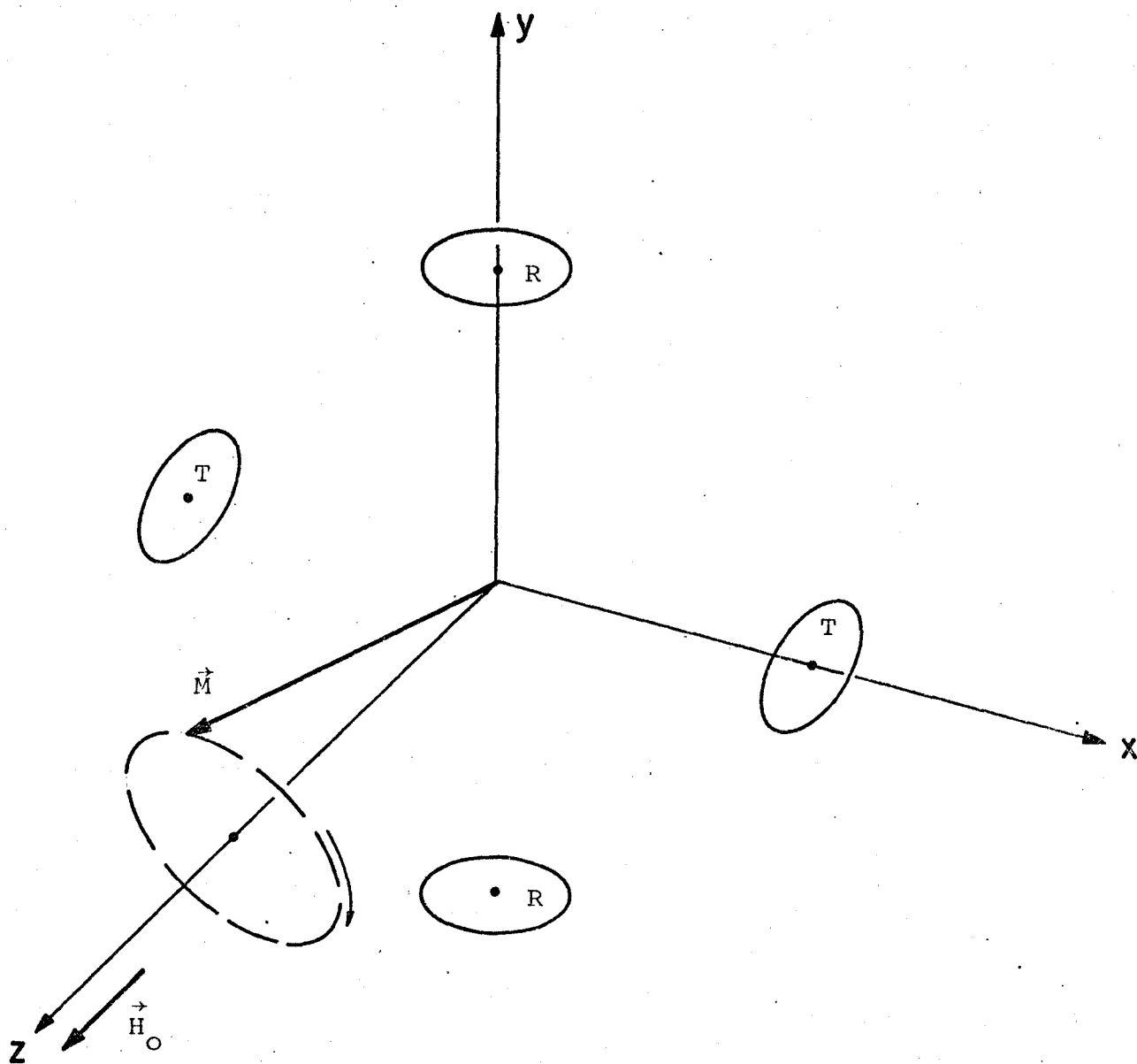


Figura 3.4 : Representação esquemática do Sistema de Bobinas Cruzadas para detecção da Indução Nuclear.

As letras T designam a bobina transmissora que produz o campo magnético $2H_1 \cos \omega t$ e as letras R designam a bobina receptora que detecta a variação de M_y .

b) Espécies químicas diferentes, mesmo contendo igual número de spins nucleares, apresentarão f.e.m. induzidas diferentes, em decorrência dos diferentes tempos de relaxação T_2 . Entretanto, para curvas suficientemente estreitas ($\omega_0 \gg 1/2T_2$), a integral

$$\int_{-\infty}^{\infty} \varepsilon''_{\chi}(\omega) d\omega = 8\pi^2 n' V_a M_0 \gamma H_1 \omega_0$$

é proporcional somente ao número de spins nucleares da amostra, sendo independente da largura de linha ($1/2T_2$).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Aparelhagem Utilizada no Experimento

O espectrômetro de RMN banda-larga utilizado em nos sas análises de teor de óleo, esquematizado na Figura 4.1 , cons titui-se das seguintes partes:

a) Módulo de rádio-frequência (RF) WL-210 com as sub-unidades :

TRANSMISSOR DE RF

É um oscilador de RF, sintonizável na faixa de 2 a 35 MHz, fun cionando a níveis de potência de até 100 mW. O oscilador de RF gera o campo magnético variável $H_x = 2H_1 \cos \omega t$ na bobina transmissora.

RECEPTOR E DETETOR DE RF

É um amplificador sintonizado à mesma frequência do transmissor que é ligado à bobina receptora. Após a amplificação, o sinal de RF é detetado produzindo-se um sinal de corrente con tínua proporcional à amplitude da RF induzida pelos spins nucleares.

SISTEMA DE BOBINAS CRUZADAS

As bobinas cruzadas constituem a parte principal do espectrômetro. Como já descrevemos, esse sistema é formado por duas bobinas, a transmissora e a receptora, desacopladas magnética mente pela ortogonalidade de sua disposição. Uma malha de Faraday garante o desacoplamento elétrico das bobinas. Parafusos dotados de materiais condutores nas suas extremidades, e que podem ser movimentados nas proximidades da bobina transmissora, são empregados para provocar deslocamentos nas linhas de força do campo magnético da bobina transmissora. Isso possibi

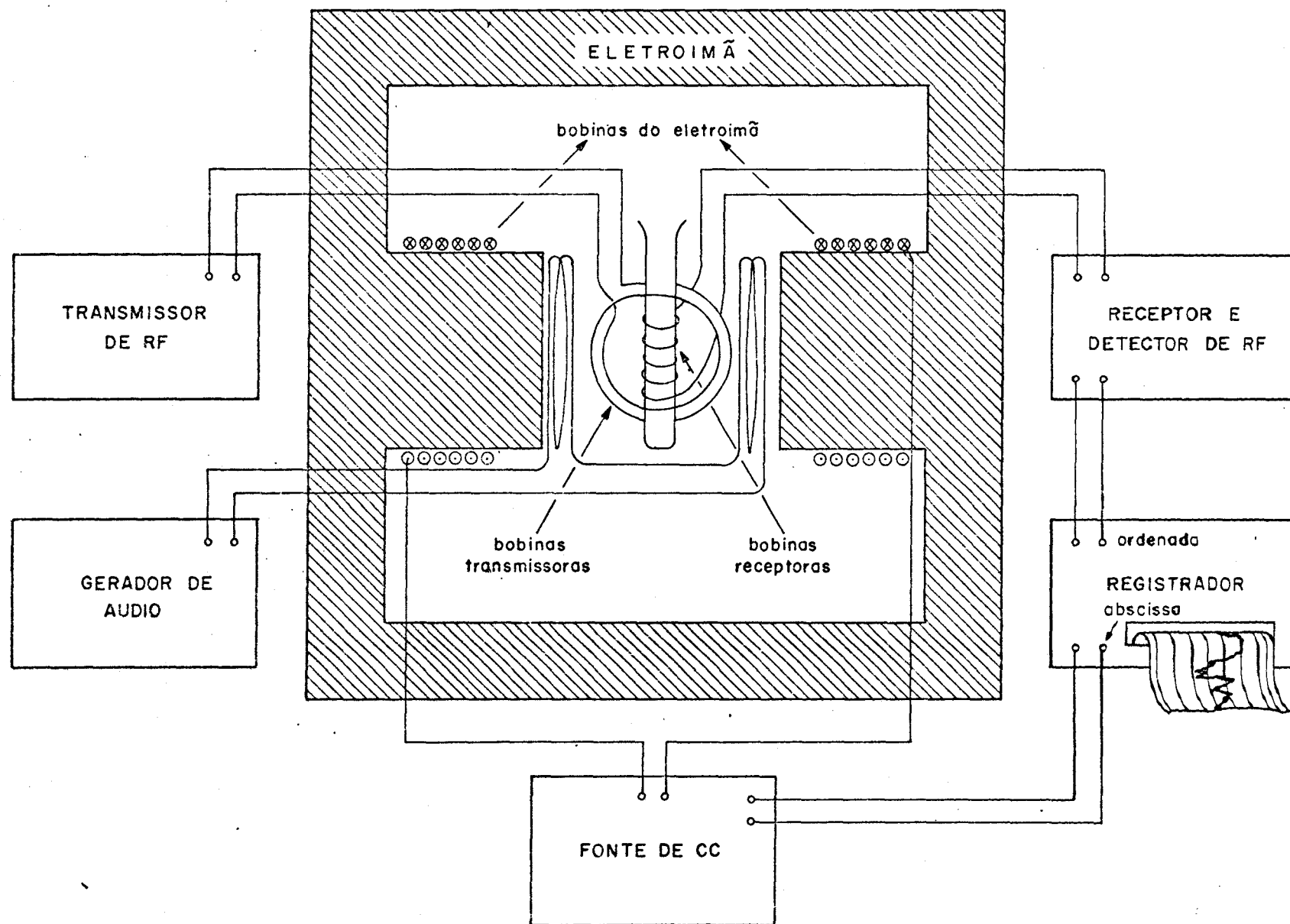


Figura 4.1 : Representação esquemática da aparelhagem utilizada no experimento de RMN :

lita controlar o acoplamento magnético entre as bobinas transmissora e receptora.

b) Sistema Eletroímã-Fonte de Corrente Contínua

O eletroímã utilizado é o Varian E-12 que produz na região entre os núcleos de ferro (2,5 polegadas) campos magnéticos de até 15 kG, com homogeneidade de 20 mG por polegada.

c) Registrador

O registrador utilizado é parte do sistema E-12 da Varian. No seu eixo das abscissas é injetado um sinal proporcional à intensidade do campo magnético $\vec{H}_0$ e no eixo das ordenadas é injetada a amplitude do sinal detetado pelo receptor.

Os espectros de RMN são usualmente obtidos a uma frequência fixa (ω), procedendo-se à variação do campo magnético H_0 , ao invés de fixar o campo magnético e variar a frequência, como idealizamos na exposição da teoria. O tipo de conexão que liga o registrador à fonte de corrente contínua que produz o campo H_0 , possibilita que esse campo seja variado, dentro de determinados intervalos, através do movimento da pena do registrador sobre o eixo das abscissas. Na prática, pequenas variações do campo H_0 são manipuladas através desse procedimento no manuseio do registrador.

d) Gerador de Áudio

Para se aumentar a relação sinal/ruído, o sinal induzido pelos spins é modulado numa frequência de áudio de 35 Hz e detetado sincrônicamente por um detetor em fase à mesma frequência. Para se obter essa modulação, o campo magnético estático H_0 é modulado por bobinas auxiliares que geram campos magnéticos de áudio com amplitudes de 25 mG a 20G. Em conse-

quência dessa modulação do campo magnético, o sinal detectado passa a ser proporcional à derivada de $\chi''(H_0)/dH_0$ da f.e.m. induzida e não à própria f.e.m. induzida $\chi''(H_0)$. Na Figura 4.2 são mostradas as curvas correspondentes a essas duas funções relacionadas com a absorção.

4.2. A Medida do Teor de Óleo em Milho por RMN

4.2.1. Seletividade do Método

Numa semente de milho existem duas fases³: a fase líquida, constituída de óleos e água e a fase sólida, constituída de carboidratos, proteínas, etc. Como em todos esses compostos existe hidrogênio, à primeira vista parece impossível medir conteúdo oleaginoso a partir de sinais de RMN do hidrogênio. Entretanto, como o sinal de RMN dos hidrogênios pertencentes às espécies sólidas é muito largo, a intensidade de seu sinal é muito pequena. Assim, o sinal de RMN dos hidrogênios de uma semente é essencialmente proveniente dos hidrogênios da água e dos ácidos graxos (óleo).

4.2.2. Necessidade de Secagem das Amostras

Na figura 4.3 mostramos dois espectros de RMN obtidos para a mesma semente. A figura (a) reproduz o espectro obtido para a semente "in natura" com teor de umidade elevado e a figura (b) refere-se ao espectro obtido após a secagem da semente. O espectro da figura (a) mostra o sinal do óleo (ácidos graxos), mais intenso e de menor largura de linha, sobreposto ao sinal da água, menos intenso e mais largo. Isso indica claramente que o conteúdo de água é da mesma ordem de grandeza do conteúdo de óleo. Para evitar a detecção dos prótons da água é portanto necessária a secagem prévia das sementes, para que a análise por RMN forneça resultados precisos para o teor de óleo.

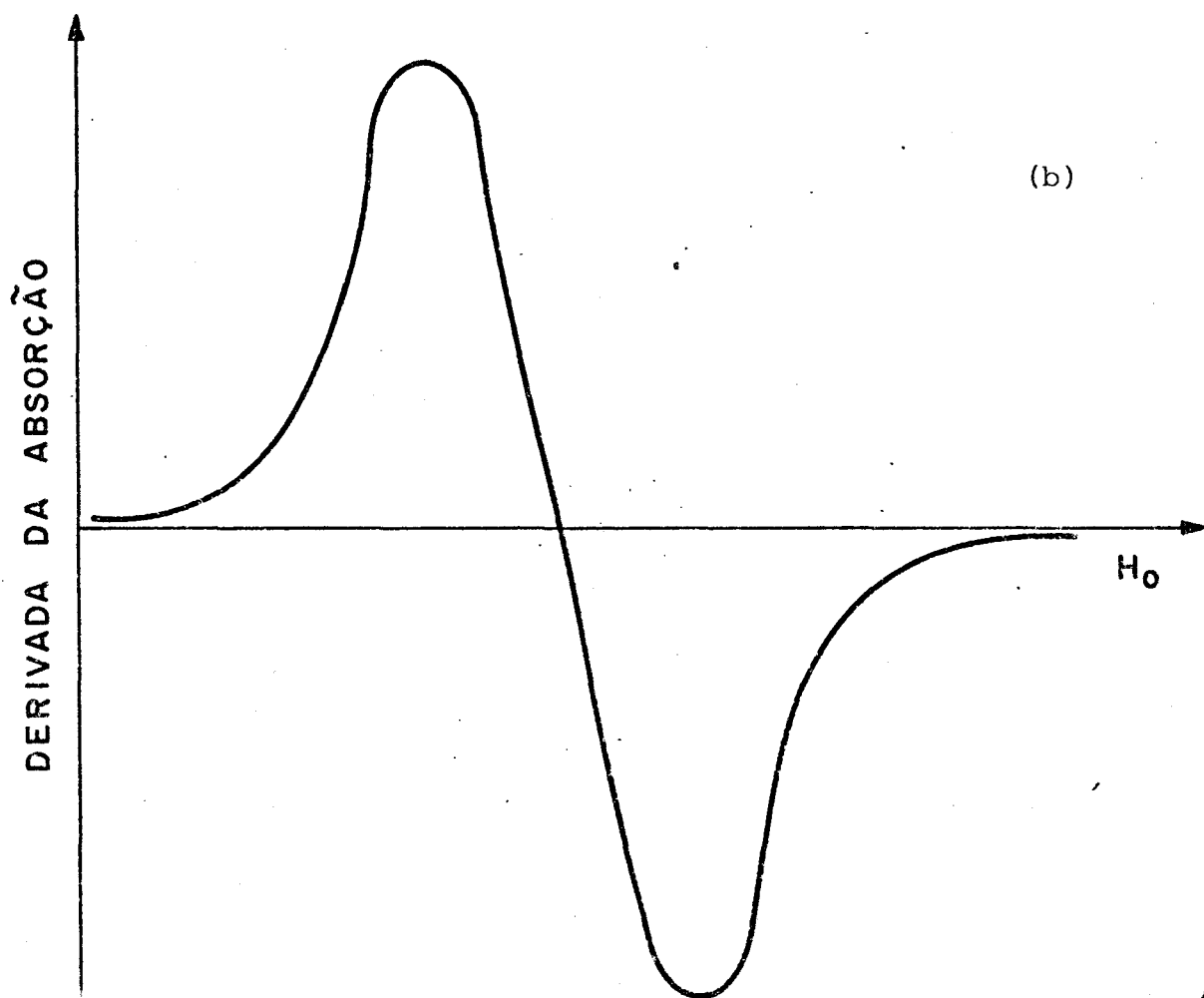
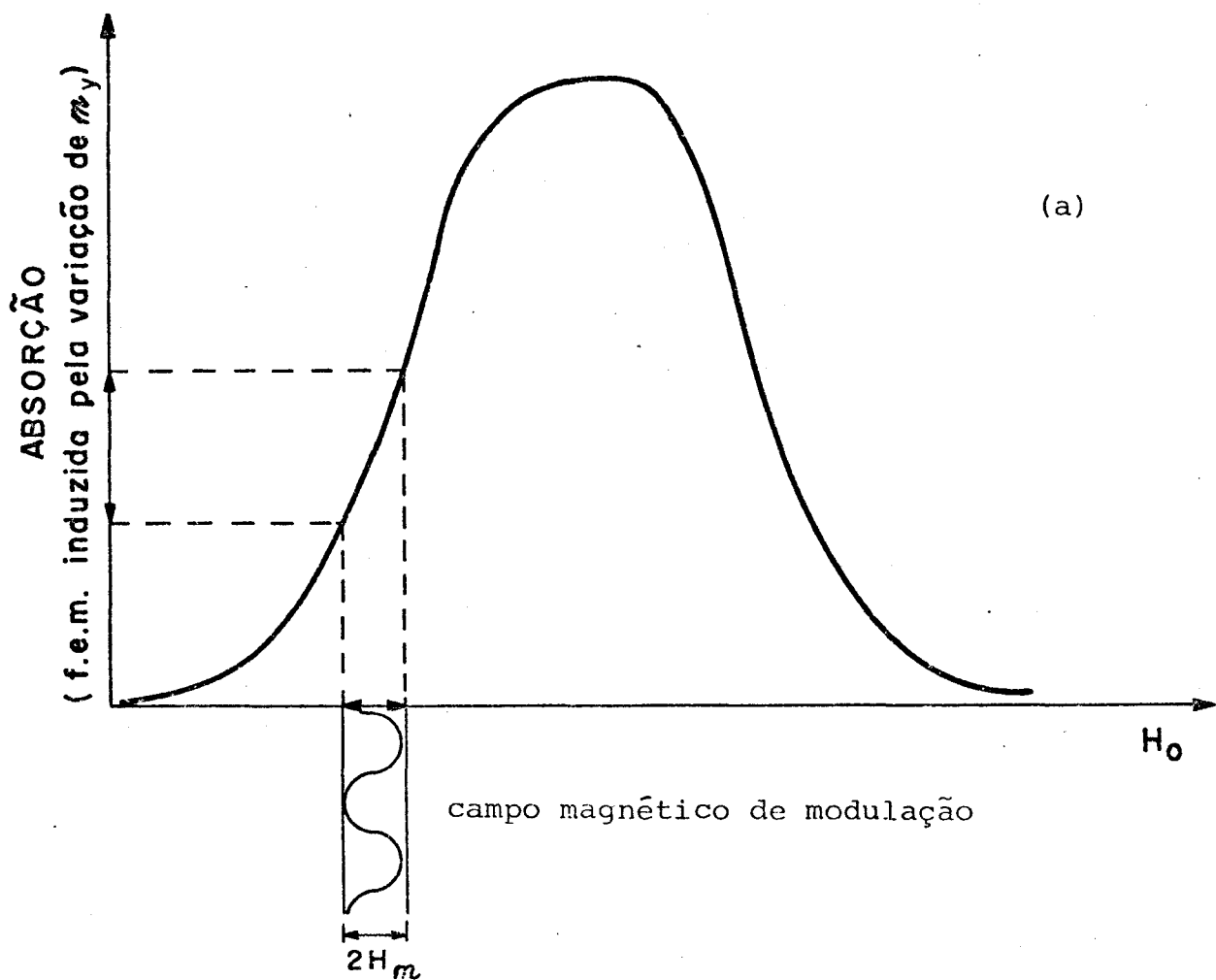


Figura 4.2 : Curvas das funções relacionadas com a detecção da RMN.
A curva (a) pode ser obtida da curva (b) por integração.

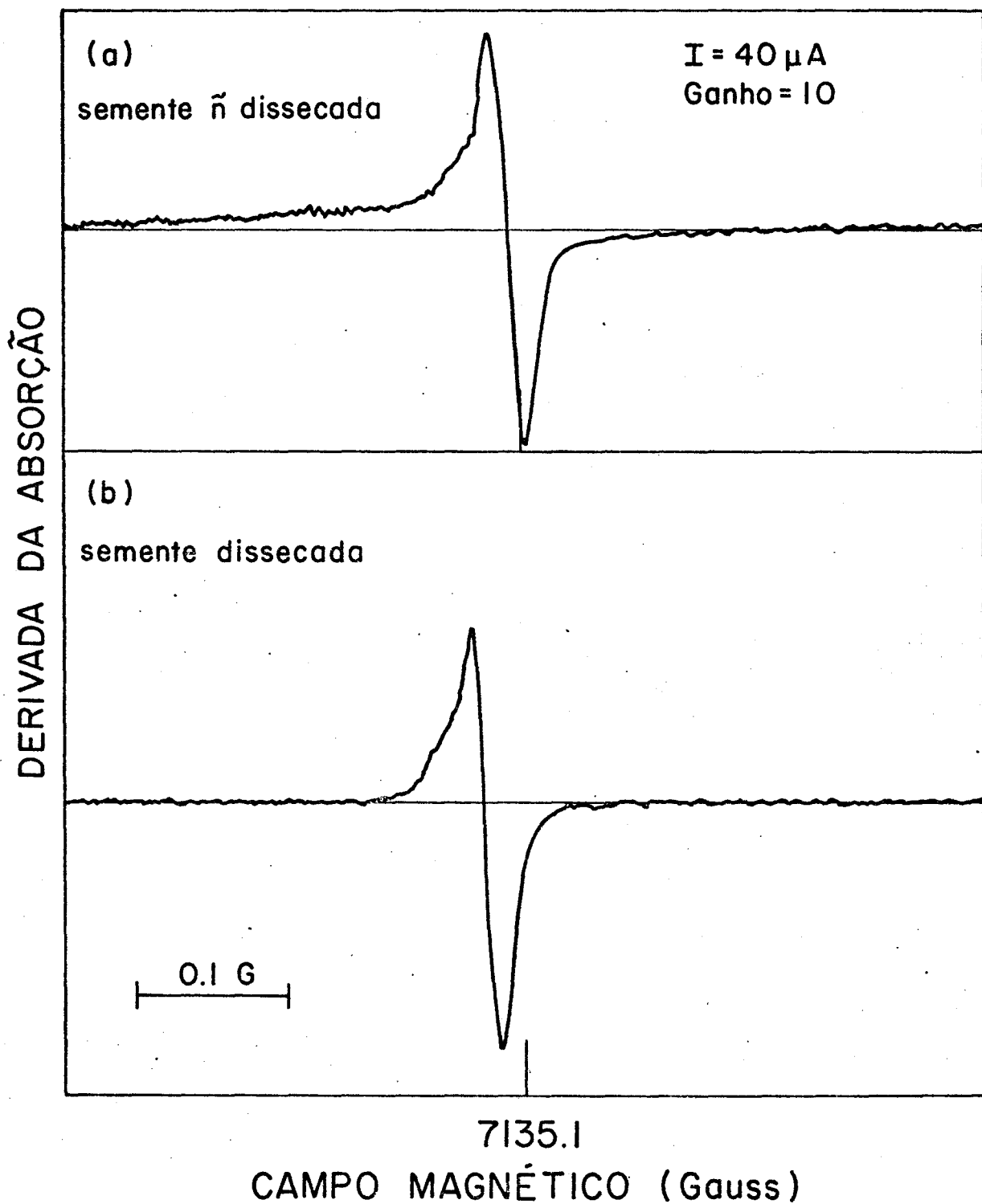


Figura 4.3 : Espectros da Derivada da Absorção obtidos na análise por NMR de sementes de milho com
(a) teor normal de umidade
(b) baixo teor de umidade.

Observações de Wilmers et al.⁶ revelam que uma secagem em estufa a 40°C durante aproximadamente oito dias é suficiente para a confiabilidade dos dados obtidos por RMN para o teor de óleo. No presente trabalho adotamos tal procedimento.

4.2.3. Orientação da Amostra

Cuidado especial deve ser tomado no sentido de situar a amostra na região de maior homogeneidade do campo H_0 , bem como no centro da bobina receptora. Para que essa orientação seja facilitada, a semente é colocada em um tubo de ensaio possuindo fundo em forma de cunha, permitindo que sementes de geometria usual possam nele se encaixar, permanecendo fixas. O tubo contendo a semente é colocado num suporte que permite seu deslocamento na vertical e rotações em torno dessa vertical, até que a semente esteja na posição ideal, que é indicada pela amplitude máxima da linha de ressonância. A orientação leva em média dez minutos por espécimen, sendo talvez o aspecto mais negativo da análise do teor de óleo pelo sistema RMN banda-larga e, mais recentemente, tem levado melhoristas a preferir o espectrômetro pulsado, que parece minimizar esse tempo^{7,8}.

4.2.4. Tratamento dos Espectros de RMN

O espectrômetro utilizado deteta a derivada da curva de absorção em relação ao campo magnético aplicado; uma primeira integração desta curva nos dá a curva absorção x campo aplicado. Com uma segunda integração é possível determinar um número proporcional ao número de hidrogênios da fase fluida existentes na semente.

Os espectros de RMN são diretamente armazenados na memória de um computador Varian 620-L, acoplado ao espectrômetro.

As sucessivas integrações são efetuadas através de um programa que utiliza o método dos trapézios para a integração das curvas.

4.2.5. O Cálculo do Teor de Óleo

Para chegar ao número que fornece o teor de óleo em sementes, duas providências adicionais são necessárias:

1. a pesagem das sementes

As massas das sementes são previamente determinadas. Utilizamos para isso uma balança digital Sauter-Mod.414, com leitura de até décimos de miligramas.

2. a escolha de um padrão de óleo

Imediatamente após a obtenção do espectro de RMN de cada semente, é traçado o espectro de uma quantidade de óleo tomada como padrão. A obtenção do espectro do padrão de óleo visa possibilitar a determinação do teor de óleo na semente por comparação. Assim são minimizados fatores de erro no teor de óleo, oriundos de flutuações próprias da aparelhagem, influenciando na amplitude do sinal, e cuja eliminação não é possível. No caso do nosso trabalho, foi escolhido como padrão um óleo comercial de milho, num volume de $0,1 \text{ cm}^3$ (v_p) e cuja massa específica (ρ_p) também foi por nós determinada.

As integrais obtidas a partir dos espectros da semente e do padrão e as massas de óleo são relacionadas da seguinte maneira :

$$\frac{I_o}{I_p} = \frac{m_o}{m_p} \quad m_o = \frac{I_o m_p}{I_p}$$

onde

I_o = integral relativa ao espectro do óleo na semente

I_p = integral relativa ao espectro do óleo no padrão

m_o = massa de óleo na semente

m_p = massa de óleo no padrão ($m_p = \rho_p v_p$)

A porcentagem em massa (O) de óleo na semente resulta, então:

$$O = \frac{m_o}{m_s} 100 (\%) = \frac{I_o}{I_p} \frac{m_p}{m_s} 100 (\%)$$

4.2.6. Precisão do Método

Operando a aparelhagem com valores adequados de potência da rádio-frequência, amplitude de modulação, etc., o método de RMN para a determinação do teor de óleo em milho revelou-se altamente correlacionado com o método químico (Gold-Fisher)⁶. Além disso, a reprodutibilidade de cada espectro é da ordem de 3%, implicando em uma reprodutibilidade no teor de óleo da ordem de 7% (ou menos), uma vez que a determinação do teor de óleo no grão requer a comparação das integrais correspondentes aos espectros do grão e do padrão, com propagação de erro. Os demais fatores de erro, entre os quais a pesagem das amostras e a determinação da massa específica do padrão, são desprezíveis em comparação com o erro implícito na reprodutibilidade do espectro de RMN.

4.3. Germoplasma Estudado

4.3.1. Linhagens Utilizadas

Tendo em vista que o objetivo do trabalho era a decomposição do efeito do óleo nas sementes em duas partes, uma devida ao genótipo da planta e outra devida ao genótipo da semente, foram escolhidas oito linhagens com as seguintes características:

- 1) Linhagens que diferiam no teor médio de óleo.

O estudo de sementes oriundas do cruzamento de linhagens contrastantes no teor de óleo possibilitaria a determinação dos efeitos devidos ao genótipo materno e efeitos devidos ao novo genótipo da semente, no teor de óleo.

- 2) Linhagens cujas sementes diferiam na cor do endosperma, possibilitando a identificação das sementes provenientes da autofecundação e sementes provenientes de cruzamentos.
- 3) Linhagens puras resultantes de pelo menos seis autofecundações e que por isso deveriam apresentar-se homozigotas, de modo a permitir o estudo da decomposição do efeito fenotípico em efeitos genéticos e não genéticos.

Foram então escolhidas quatro linhagens de endosperma branco de teor médio de óleo (+4,0%), denominadas L278, L243, L382, L654 e quatro linhagens de endosperma amarelo de maior teor de óleo (+5,5%) denominadas L2a-2, L28a-4, L16b-7, L139a-10. Estas últimas resultam do programa de seleção de linhagens para maior teor de óleo baseado na análise individual de sementes por RMN efetuada por Wilmers et al.⁶.

4.3.2. Técnica Experimental

As quatro linhagens brancas foram plantadas em ensaio com delineamento em blocos ao acaso, com 3 repetições, instalado em 20/11/78 na Área Experimental do Campus da Universidade Estadual de Campinas. Adjacentes ao ensaio foram plantadas as quatro linhagens de endosperma amarelo. A distribuição das parcelas experimentais no campo e os cruzamentos previstos são mostrados na Figura 4.4 .

Cada parcela experimental foi constituída de um canteiro de 10 metros de comprimento, no espaçamento de 1,0 x 0,4 m com duas plantas por cova correspondendo a uma densidade de 50.000 plantas por hectare.

O ensaio foi submetido ao seguinte tratamento com fertilizantes: 60 Kg/hectare de Nitrogênio na forma de Sulfato de Amonio, sendo aplicado 20 Kg/ha por ocasião do plantio e 40 Kg/ha quarenta dias após o plantio, em cobertura. Além disso foram aplicados 80 Kg/ha de P_2O_5 na forma de Superfosfato Simples e 30 Kg/ha de K_2O na forma de Cloreto de Potássio. No plantio foi aplicado o inseticida sistêmico Furadan G-5, na base de 20g/10 m para proteger as plantas dos insetos Elasmopalpus lignosellus e Spodoptera frugiperda, até os quarenta dias do plantio. Em seguida as plantas foram tratadas com inseticida granulado à base de Aldrin.

4.3.3. Polinização

No florescimento, quando as plantas começaram a emitir espigas, foi iniciado um trabalho de cobertura de espigas com sacos plásticos de 5 x 18cm, para evitar a ocorrência de polinizações naturais, obviamente não controláveis.

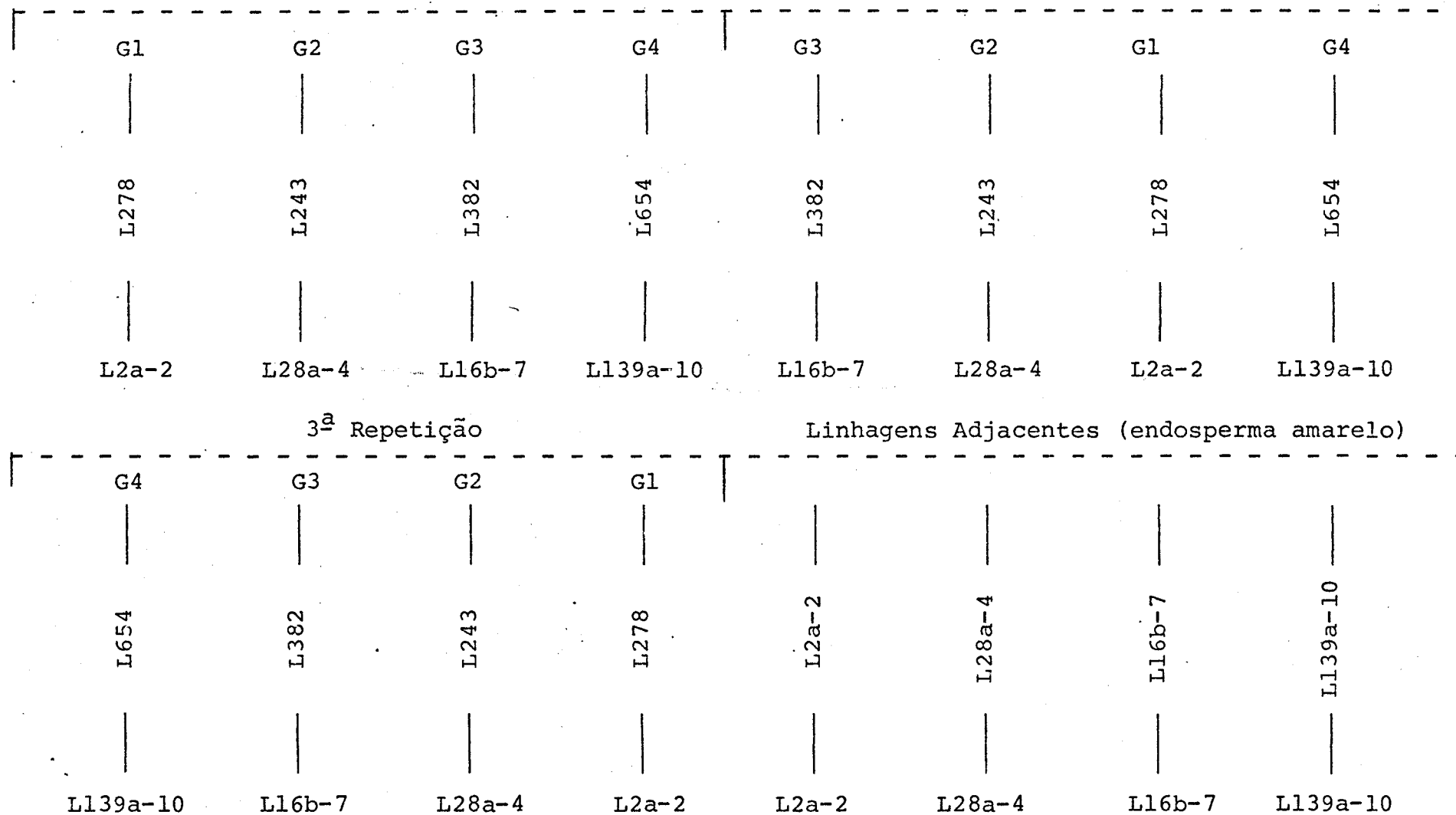


Figura 4.4 : Distribuição dos germoplasmas no experimento de campo. No experimento, com três repetições, as linhagens identificadas no traço interrompido correspondem às plantas cujas espigas receberam uma mistura de 1:1 de pólen da própria linhagem e pólen da linhagem de endosperma amarelo indicada na base do traço. As linhagens adjacentes de endosperma amarelo e selecionadas para maior teor de óleo cederam pólen para os cruzamentos indicados e foram também auto-fecundadas.

Após a exposição total das panículas, por ocasião da antese, as plantas com estigmas expostos protegidos pelos sacos plásticos estavam em condições para a execução dos cruzamentos e auto-fecundações previstos.

Para a coleta do pólen, as panículas foram cobertas sacos especiais de papel de 20 x 45cm, logo pela manhã. Ao final de algumas horas, a quantidade de pólen depositada nos sacos era suficiente para que se procedesse à polinização. Considerando o fato de que as linhagens empregadas no trabalho eram homozigotas juntou-se o pólen de várias plantas de uma mesma linhagem, para a obtenção de um maior volume de micrósporos. Foram então medidas e misturadas quantidades iguais de pólen de duas linhagens a serem cruzadas, uma de sementes brancas e outra de sementes amarelas. Essas medidas foram feitas com um recipiente com volume aproximado de $0,1 \text{ cm}^3$, uma vez que o diâmetro do grão de pólen desse material não diferia significativamente. Com essa mistura de pólen procedeu-se à fecundação das linhagens brancas dispostas no ensaio. Os cruzamentos foram divididos em quatro grupos.

Grupo 1: L2a-2 (endosperma amareló) x L278 (end.branco)

Grupo 2: L28a-4 (end.amarelo) x L243 (end.branco)

Grupo 3: L16b-7 (end.amarelo) x L382 (end.branco)

Grupo 4: L139a-10 (end.amarelo) x L654 (end.branco)

Paralelamente foi feita a auto-fecundação das linhagens amarelas de maior teor de óleo. Após as polinizações, as espigas foram cobertas com os próprios sacos de papel utilizados para coleta do pólen, assim permanecendo até a colheita.

4.3.4. Preparo das Sementes

A colheita das espigas foi efetuada em 23/03/79, portanto 133 dias após o plantio. De cada repetição foram tomadas

duas espigas que apresentaram boa granação. Essas espigas foram submetidas a uma secagem parcial ao sol, durante aproximadamente dez dias.

De cada espiga amostrada foram marcados e separados dez pares de sementes adjacentes constituídos de uma semente branca e uma amarela. Esses pares foram tomados ao longo de toda a espiga para eliminar o efeito da posição das sementes na espiga sobre a massa e conteúdo de óleo⁹. Cada semente foi identificada no seu par recebendo um número gravado com grafite no endosperma. Também foram separadas dez sementes de cada espiga das linhagens amarelas auto-fecundadas. O número de análises por RMN totalizou 560 sementes, assim distribuídas:

PLANTAS	LINHAGENS BLOCOS ESPIGAS SEMENTES				TOTAL
Do ensaio	4	3	2	20	480
Das linhagens adjacentes (end.amarelo)	4	1	2	10	80

As sementes de uma mesma espiga foram então acondicionadas em vidros de 10 cm³ e submetidas a uma secagem em estufa a 40°C, durante oito dias, objetivando reduzir o seu teor de umidade ao redor de 4 a 5%, sem afetar, entretanto, a sua capacidade de germinação.

A figura 4.5 é uma foto de duas espigas de cruzamentos. Pode-se notar a existência de dois tipos de sementes: sementes brancas que resultam de auto-fecundação e sementes amarelas fecundadas por pólen de uma linhagem de maior teor de óleo.



Figura 4.5 : Duas espigas de linhagem submetida a cruzamento. As sementes brancas evidenciam auto-fecundação. As sementes amarelas são resultado do cruzamento.

4.4. Análise Estatística dos Dados

A figura 4.6 ilustra o material estudado, estando representados nas linhas horizontais os quatro grupos distintos de cruzamentos e nas linhas verticais as três repetições ou blocos. Dentro de cada célula são representados os dez pares de sementes adjacentes em cada uma das duas espigas amostradas. Deve ser salientado que a ordem e disposição sistemática dos grupos e blocos na figura não correspondem, obviamente, à distribuição das plantas no campo.

Para efeito de cálculos intermediários utilizando medidas das características massa, ou porcentagem de óleo, em sementes pareadas, denominamos:

X_{ai} = valor da característica medida na semente amarela componente do i -ésimo par

X_{bi} = valor da característica medida na semente branca componente do i -ésimo par

4.4.1. O Teste t para observações pareadas

Para aplicar o teste t utilizamos a seguinte tabela:

i	X_{ai}	X_{bi}	$X_{ai} - X_{bi}$	$(X_{ai} - X_{bi})^2$
1				
2				
.				
.				
.				
60				

A variância das diferenças pareadas, s_d^2 , foi estimada pela expressão

$$s_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^{60} (X_{ai} - X_{bi})^2 - \left[\sum_{i=1}^{60} (X_{ai} - X_{bi}) \right]^2 / 60}{60 \times 59}$$

Repetições

	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	
Grupo 1	$\begin{array}{c} A_1 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_2 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_3 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	G_1
Grupo 2	$\begin{array}{c} A_4 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_5 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_6 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	G_2
Grupo 3	$\begin{array}{c} A_7 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_8 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_9 \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	G_3
Grupo 4	$\begin{array}{c} A_{10} \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_{11} \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} A_{12} \\ \text{---}10\text{---}10\text{---} \\ E_1 \quad E_2 \end{array}$	G_4
	$\begin{array}{c} B \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} B \\ 2 \end{array}$	$\begin{array}{c} B \\ 3 \end{array}$	

Figura 4.6 : Cada célula (A_j) corresponde à parcela experimental, constituída de duas plantas, espigas E_1 e E_2 , cada uma envolvendo 10 pares de sementes adjacentes, uma amarela e outra branca.

e o desvio médio, $\bar{d}$, pela expressão:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^{60} (X_{ai} - X_{bi})}{60}$$

Essas duas expressões permitem a estimativa da estatística t

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d}$$

O teste t usado tem por finalidade testar a hipótese que a média da diferença no par é nula. A hipótese é rejeitada quando os valores de t são significativos ao nível de 5 e 1% de probabilidade²⁹. Se o valor de t não for significativo conclue-se que a diferença causada pelos genótipos contrastantes é nula.

4.4.2. O Teste F para observações pareadas

No ensaio de blocos ao acaso a variância total foi decomposta nas seguintes causas de variação:

Variância entre Grupos

Variância entre Blocos

Variância da Interação Grupos x Blocos

Variância entre Espigas dentro dos Grupos e Blocos

Essas variâncias são estimadas com base na soma de quadrados e graus de liberdade respectivos. As somas de quadrados são estimadas da seguinte maneira:

Soma de Quadrados de GRUPOS (SQ_G)

$$SQ_G = \frac{1}{60} (G_1^2 + G_2^2 + G_3^2 + G_4^2) - \frac{C^2}{240}$$

com

$$G_j = \sum_{i=1}^{60} \frac{x_{ai}}{x_{bi}} ; \quad j=1,2,3,4 ; \quad C = G_1 + G_2 + G_3 + G_4$$

a variância entre grupos envolve diferenças genéticas, pois cada grupo envolve um cruzamento diferente de duas linhagens ao longo dos três blocos. Portanto, esta análise de variância está relacionada com comparações entre as linhas horizontais na Figura 4.6 .

Soma de Quadrados de BLOCOS (SQ_B)

$$SQ_B = \frac{1}{80} (B_1^2 + B_2^2 + B_3^2) - \frac{C^2}{240}$$

com

$$B_j = \sum_{i=1}^{80} \frac{x_{ai}}{x_{bi}} ; \quad j=1,2,3$$

O resultado da variância entre blocos envolve apenas diferenças ambientais, pois os quatro grupos apresentam as mesmas diferenças genéticas. Esta análise de variância está relacionada com comparações entre as colunas na figura 4.6 .

Soma de Quadrados de GRUPOS x BLOCOS (SQ_{GxB})

$$SQ_{GxB} = \frac{1}{20} (A_1^2 + A_2^2 + \dots + A_{12}^2) - \frac{C^2}{240} - SQ_G - SQ_B$$

com

$$A_j = \sum_{i=1}^{20} \frac{x_{ai}}{x_{bi}} ; \quad j=1,2,\dots,12$$

A variância de interação Grupos x Blocos é uma medida da interação entre grupos e blocos. Mostra se as diferenças em caracteres existentes entre grupos são mantidas ou modificadas ao longo dos blocos.

Soma de Quadrados de ESPIGAS, dentro de GRUPOS, dentro de BLOCOS

$$(SQ_{E/G/B})$$

$$SQ_{E/G/B} = \sum_{k=1}^{12} \left[\frac{1}{10} (E_1^2 + E_2^2) - \frac{(E_1 + E_2)^2}{20} \right]_k$$

com

$$E_j = \sum_{i=1}^{10} \frac{X_{ai}}{X_{bi}} ; j=1,2$$

Esta variância surge em função de diferenças entre as duas espigas dentro de cada grupo e dentro de cada repetição, referindo-se, portanto, a diferenças ambientais.

Soma de Quadrados TOTAL (SQ_T)

$$SQ_T = \sum_{i=1}^{240} \left(\frac{X_{ai}}{X_{bi}} \right)^2 - \frac{C^2}{240}$$

Soma de Quadrados do RESÍDUO (SQ_R)

$$SQ_R = SQ_T - SQ_G - SQ_B - SQ_{G \times B} - SQ_{E/G/B}$$

Corresponde à variância atribuída a efeitos ao acaso. Corresponde ao erro experimental.

Os Quadrados Médios são dados em todos os casos por

$$QM_{VAR} = \frac{SQ_{VAR}}{g.l.} ; \text{ onde VAR refere-se à causa da variação}$$

Para o delineamento estatístico usado, o valor de F é calculado da seguinte maneira

GRUPOS

$$F = \frac{QM_G}{QM_{E/G/B}}$$

BLOCOS

$$F = \frac{QM_B}{QM_{E/G/B}}$$

GRUPOS x BLOCOS

$$F = \frac{QM_{G \times B}}{QM_{E/G/B}}$$

ESPIGAS/GRUPOS/BLOCOS

$$F = \frac{QM_{E/G/B}}{QM_R}$$

4.4.3. Coeficiente de Variação

O Coeficiente de Variação mede a dispersão dos dados ao redor da média. É calculado com base na seguinte tabela

i	x_{ai}	$x_{ai} - \bar{x}_a$	$(x_{ai} - \bar{x}_a)^2$	x_{bi}	$x_{bi} - \bar{x}_b$	$(x_{bi} - \bar{x}_b)^2$
1						
2						
.						
.						
.						
10						

A variável X representaria dados relativos a uma determinada característica para uma dada espiga. Observa-se que dados referentes às sementes amarelas são tabelados separadamente dos dados referentes às sementes brancas.

O coeficiente de variação, expresso em porcentagem, seria dado por:

$$C.V. = \frac{\sigma_a}{\bar{x}_a} 100$$

onde σ_a é o desvio padrão e $\bar{x}_a$ é a média da característica estudada. Essas estatísticas são estimadas da seguinte maneira:

$$\sigma_a = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (x_{ai} - \bar{x}_a)^2}{9}}$$

$$\bar{x}_a = \frac{\sum_{i=1}^{10} x_{ai}}{10}$$

Nos cruzamentos considerados no presente trabalho, feitos a partir de uma mistura de pólen de linhagens homozigotas, tanto o genótipo das sementes brancas como o das amarelas são invariáveis ao longo de uma mesma espiga. Portanto, o coeficiente de variação deverá evidenciar apenas diferenças ambientais determinadas pela posição da semente na espiga.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito Médio

MASSA DE SEMENTES INDIVIDUAIS

São vistos na Tabela 5.1 os resultados médios para essa característica nos quatro grupos estudados. Para cada grupo são mostrados na linha superior os valores obtidos em sementes brancas e amarelas pareadas, bem como o resultado da aplicação do teste t aos dados referentes às mesmas. Na linha inferior figura o valor médio para a linhagem de endosperma amarelo autofecundada.

GRUPO 1: as sementes amarelas nas espigas de cruzamentos apresentaram massa de valor intermediário em relação às médias dos pais revelando efeito aditivo na transmissão dessa característica. O teste t revela que a diferença genotípica entre sementes de cores distintas, dentro da espiga, é altamente significativa.

GRUPO 2: As sementes amarelas do cruzamento apresentaram massa superior à média aritmética dos pais, tendo ocorrido heterose de 6,8%. Também neste caso a diferença entre sementes brancas e amarelas é altamente significativa.

GRUPO 3: As sementes amarelas do cruzamento apresentaram valor

médio muito próximo do valor médio dessa característica na planta-mãe (diferença de 1%). Consequentemente o teste t não foi significativo.

GRUPO 4: Os resultados foram bastante semelhantes aos obtidos no grupo 2 para essa característica. Nota-se a ocorrência de heterose de 6,1% sendo a diferença genotípica entre sementes amarelas e brancas altamente significativa.

Esses resultados mostram bom acordo com as observações de Curtis et al.⁹ e de Kiesselbach¹⁰, também utilizando técnica de cruzamento de plantas diferindo na cor do endosperma.

PORCENTAGEM DE ÓLEO

São mostrados na Tabela 5.2 dados referentes às médias das porcentagens de óleo nos quatro grupos estudados. A disposição dos dados é idêntica à usada na Tabela 5.1 para a massa.

GRUPO 1: Neste grupo os pais apresentaram valores médios do teor de óleo muito próximos entre si. Esse valor praticamente foi mantido nas sementes de cruzamento, tendo ocorrido uma heterose muito baixa (1%), indicando uma tendência para a existência de efeito aditivo na transmissão dessa característica.

GRUPO 2: As sementes amarelas do cruzamento apresentaram um teor médio de óleo 28% superior ao teor das sementes brancas pareadas, sendo esta a maior diferença genotípica ocorrida nos cruzamentos. O teor de óleo mostrou-se de valor intermediário ao dos pais, revelando ser o teor de óleo condicionado principalmente por efeito aditivo. Nesse caso ocorreu porém leve dominância paterna.

GRUPO 3: O teor médio nas sementes amarelas do cruzamento foi de valor intermediário ao dos pais, não havendo manifestação de do-

minância. A menor diferença no teor de óleo, em consequência das diferenças genotípicas encontradas na mesma espiga, ocorreu neste grupo (14%), sendo esse valor altamente significativo.

GRUPO 4: Neste grupo também manifestou-se efeito aditivo na transmissão do teor de óleo, havendo leve dominância materna.

Vários trabalhos confirmam a ocorrência de efeito aditivo para explicar efeito fenotípico no teor de óleo em sementes de milho. Entre eles Dumanovic¹⁸ (1959), Dumanovic¹¹ (1960), Poneleit¹⁴ (1968) destacam a ocorrência de uma leve dominância do genótipo materno nessa característica. Poneleit e Bauman¹³ (1967), Ruskova¹⁵ (1974) e Gonzalez et al.¹⁶ (1975) evidenciam a inexistência de efeito de dominância. Reich e Alexander¹² (1965) e Dudley et al.¹⁷ (1977) revelam a existência de um efeito significativo do genótipo materno, condicionando o teor de óleo nas sementes. Nenhum dos grupos por nós estudados, entretanto, apresentou tal comportamento.

O fato da característica porcentagem de óleo ser transmitida à progênie por efeito aditivo dos genes representa uma garantia de boas perspectivas em programas de seleção para melhoramento nessa característica.

O efeito aditivo proporciona a elevação rápida da porcentagem de óleo em plantas da população, usando seleção recorrente, através de sucessivos cruzamentos entre plantas de maior teor de óleo.

É importante observarmos, ao final das considerações sobre valores médios, que pequenas diferenças existentes entre valores médios de características em sementes brancas e amarelas pareadas revelaram-se altamente significativas quando o estudo foi feito através da análise individual de sementes.

Isso pode ser constatado na Tabela 5.1 nos grupos 2 e 4 para a característica massa. O mesmo ocorre no grupo 3 para a porcentagem de óleo, como mostrado na Tabela 5.2 . Uma diferença de 14% no teor de óleo entre sementes brancas e amarelas pareadas revelou-se altamente significativa.

É nesse ponto que reside a grande importância da análise do teor de óleo por RMN em sementes individuais. Pequenas diferenças genéticas conduzindo a diferenças no teor de óleo podem ser detetadas dentro de uma mesma espiga, através da redução de efeitos de natureza ambiental, que frequentemente mascaram os efeitos genéticos.

5.2. Análise da Variabilidade

5.2.1. Análise da Variância

MASSA DA SEMENTE

Considerando a Tabela 5.3, onde são representadas as variâncias para a característica massa, verificamos que a variação entre grupos, que compreende apenas diferenças genéticas, foi altamente significativa, mostrando que os grupos tomados aleatoriamente são realmente diferentes.

A variação entre blocos também mostrou-se altamente significativa, revelando a importância dos efeitos ambientais entre blocos na área experimental.

A interação grupos x blocos também foi significativa para essa característica, indicando que os grupos variam relativamente entre si de maneira diferente nos vários blocos.

Verificamos, ainda, que variações entre espigas, espigas/grupos/blocos, não foram significativas, indicando a inexis-

tência de diferenças ambientais significativas entre duas espigas tomadas dentro de cada grupo, para as três repetições, para massa de semente individual.

PORCENTAGEM DE ÓLEO

Para a característica porcentagem de óleo os resultados da análise de variância, mostrados na Tabela 5.4 , levam às seguintes observações:

A variação entre os grupos foi altamente significativa, revelando existirem diferenças genéticas entre esses grupos de cruzamentos.

Não foram observadas diferenças ambientais significativas na análise entre blocos, bem como inexistiu a interação grupos x blocos.

Entre as duas espigas tomadas dentro de cada grupo , para as três repetições, manifestaram-se diferenças que são tipicamente ambientais. Essas diferenças ambientais, que ocorrem entre duas espigas dentro de uma mesma linhagem, constituem-se em grande obstáculo para o progresso em programas de seleção que utilizam métodos convencionais destrutivos para análise do teor de óleo. Isso porque a análise química exige amostragens compostas de grande número de sementes de uma mesma espiga e os dados contrastantes obtidos para o teor de óleo em espigas diferentes são comparados e muitas vezes utilizados para fins de seleção. Como foi demonstrado, as diferenças entre espigas pode ser consequência de efeitos ambientais que reduzirão o progresso de seleção.

5,2,2. Análise de Coeficientes de Variação

MASSA DA SEMENTE

Na Tabela 5.5 são mostrados os coeficientes de variação para massa de sementes nos quatro grupos de cruzamentos. Pode-se notar a ocorrência de maiores coeficientes de variação no grupo 1. Esse grupo teve como particularidade a ocorrência de espigas com pouca granação, cujas sementes, em decorrência disso, cresceram livremente, sem as pressões laterais de sementes vizinhas existentes em espigas de granação normal. A maioria das sementes nesse grupo apresentou geometria aproximadamente esférica e tamanho variado, evidenciando a inexistência de pressões laterais. Os demais grupos, com sementes chatas na parte central da espiga, em decorrência da granação completa, apresentaram coeficientes de variação menores. Aparentemente, a mudança de geometria de semente permite a manifestação de maior efeito ambiental, que poderá confundir-se com efeitos genéticos.

Constatamos que os coeficientes de variação, intimamente relacionados com diferenças ambientais dentro das espigas, variaram nas sementes brancas de 10,5 a 26,9% e nas sementes amarelas de 9,5 a 27,0%. Portanto, as sementes de diferentes genótipos revelaram variabilidade não-genética semelhante.

PORCENTAGEM DE ÓLEO

Para a porcentagem de óleo, como é visto na Tabela 5.6 os coeficientes de variação no grupo 1, com exceção da 3ª repetição, não mostraram grande variação como no caso da massa, considerada anteriormente. Assim, o teor de óleo em espigas pouco granadas com sementes arredondadas de volume semelhante parece não ser muito afetado pela alteração da geometria da semente.

Verificamos para a porcentagem de óleo, a existência de coeficientes de variação entre 3,8 e 24,1% para as sementes

brancas e entre 4,0 e 24,0% para as sementes amarelas. A maior parte dos valores, entretanto, fica mais próxima do limite inferior. No grupo 1, 3^a repetição, os coeficientes de 24,1 e 24,0% para as sementes da espiga 1 resultam não tanto da forma arredondada das sementes, mas da variação de volume que frequentemente ocorre em espigas mal granadas. Essas variações, tipicamente ambientais dentro da espiga, limitam consideravelmente a identificação do efeito dos genes, mesmo quando se executa um programa de seleção para teor de óleo utilizando a análise individual por RMN.

Portanto, é recomendável como cuidado adicional, para redução de efeitos não-genéticos que, na amostragem de sementes para análise, sejam selecionadas, em populações heterozigotas, espigas bem granadas para a comparação de sementes normais com mesma forma e tamanho. Assim procedendo, as diferenças genéticas ficam mais evidentes e o ganho de seleção é acelerado.

GRUPO	LINHAGEM	ENDOSPERMA		teste t
		branco	amarelo	
mg				
1	L278	204 (100) ¹	241 (118)	11,74**
	L2a-2	-	284 (139)	-
2	L243	271 (100)	288 (106)	5,53**
	L28a-4	-	268 (99)	-
3	L382	255 (100)	258 (101)	1,03N.S.
	L16b-7	-	281 (110)	-
4	L654	237 (100)	252 (106)	5,65**
	L139a-10	-	238 (100)	-

1 - os valores entre parênteses referem-se a valores relativos, tomando-se a média das sementes de endosperma branco como 100 .

N.S. - não significativo

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 5.1: Massa de sementes brancas e amarelas pareadas e massa de sementes amarelas de linhagens selecionadas para maior teor de ácidos graxos, nos quatro grupos de cruzamentos.

GRUPO	LINHAGEM	ENDOSPERMA		teste t
		branco	amarelo	
%				
1	L278	4,9 (100) ¹	4,9 (100)	0,40N.S.
	L2a-2	-	4,8 (98)	-
2	L243	3,6 (100)	4,6 (128)	15,6**
	L28a-4	-	5,2 (144)	-
3	L382	4,3 (100)	4,9 (114)	9,64**
	L16b-7	-	5,5 (128)	-
4	L654	3,3 (100)	4,0 (121)	13,4**
	L139a-10	-	5,6 (170)	-

1 - Os valores entre parênteses referem-se a valores relativos, tomando-se a média das sementes de endosperma branco como 100.

N.S. - não significativo

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 5.2 : Porcentagem de óleo em sementes brancas e amarelas pareadas e em sementes amarelas de linhagens selecionadas para maior teor de ácidos graxos, nos quatro grupos de cruzamentos.

Causa da Variação	g.l.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
GRUPOS	3	0,94	0,31	33,69**
BLOCOS	2	0,27	0,14	15,22**
GRUPOS x BLOCOS	6	0,23	0,038	4,13*
ESPIGAS/GRUPOS/BLOCOS	12	0,11	0,0092	0,81N.S.
RESÍDUO	216	2,46	0,011	

N.S. - não significativo

*,** - significativo respectivamente ao nível de 5% e 1%

Tabela 5.3 : Análise da Variância para a característica massa de semente amarela/massa de semente branca, nos 10 pares de sementes de uma mesma espiga, nos quatro grupos de cruzamentos.

Causa da Variação	g.l.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F
GRUPOS	3	2,71	0,903	25,80**
BLOCOS	2	0,09	0,045	1,28N.S.
GRUPOS x BLOCOS	6	0,08	0,013	0,37N.S.
ESPIGAS/GRUPOS/BLOCOS	12	0,42	0,035	2,19**
RESÍDUO	216	3,41	0,016	

N.S. - não significativo

** - significativo ao nível de 1%

Tabela 5.4 : Análise da variância para a característica por cento de óleo de semente amarela/por cento de óleo de semente branca, nos 10 pares de sementes de uma mesma espiga, nos quatro grupos de cruzamentos.

GRUPO	ENDOSPERMA	1 ^a Repetição		2 ^a Repetição		3 ^a Repetição	
		E ₁	E ₂	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂
%							
1	branco	10,5	12,0	19,0	15,0	26,9	17,1
	amarelo	12,0	9,5	17,6	13,7	27,0	25,2
2	branco	15,5	11,5	4,2	5,1	4,8	3,4
	amarelo	7,8	8,6	4,7	4,6	3,6	4,7
3	branco	6,0	5,6	6,7	4,5	8,9	11,7
	amarelo	5,4	9,3	6,2	5,3	9,1	7,0
4	branco	3,3	5,5	7,5	9,2	4,4	3,4
	amarelo	6,5	3,9	6,9	10,2	4,9	3,6

notação. E = espiga

Tabela 5.5 : Coeficientes de variação para a característica massa nos quatro grupos de cruzamentos e respectivas repetições.

GRUPO	ENDOSPERMA	1 ^a Repetição		2 ^a Repetição		3 ^a Repetição	
		E ₁	E ₂	E ₁	E ₂	E ₁	E ₂
%							
1	branco	10,9	7,7	3,8	7,6	24,1	7,6
	amarelo	4,0	9,8	7,1	6,9	24,0	10,2
2	branco	8,2	12,8	13,3	6,6	8,1	9,1
	amarelo	6,1	7,6	7,0	7,8	9,8	5,9
3	branco	3,9	11,4	4,6	10,0	8,3	8,5
	amarelo	9,3	6,5	7,8	6,4	7,5	11,5
4	branco	9,0	6,2	9,2	6,7	8,8	13,9
	amarelo	12,8	5,7	9,7	9,8	9,1	6,8

notação. E = espiga

Tabela 5.6 : Coeficientes de Variação para a característica porcentagem de óleo nos quatro grupos de cruzamentos e respectivas repetições.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite as seguintes conclusões:

- Os quatro grupos de cruzamentos apresentaram baixa heterose para massa e para o teor de óleo, revelando nessas características predominância de efeito aditivo, o que demonstra a grande potencialidade de programas de seleção recorrente para elevar o teor de ácidos graxos em cultivares de milho.
- Em três dos quatro grupos estudados, onde as linhagens parentais diferiam na concentração de lipídeos, em média, 52% do teor de óleo pode ser explicado pelo genótipo materno e os restantes 48% pelo novo genótipo do grão.
- Diferenças genéticas de apenas 14% para o teor de óleo puderam ser detetadas através de análises de sementes individuais, usando a técnica de RMN. Isso mostra a importância da seleção em grãos individuais, detetando diferenças entre genótipos das sementes na mesma espiga, que irão acelerar os programas de seleção para teor de óleo.
- Coeficientes de variação em amostras de sementes individuais dentro de espigas indicaram a importância de cuidados na amostragem de sementes individuais. As sementes devem ser colhidas da parte central de espigas bem granadas para se evitar o confundimento de efeitos de forma e volume com genes que condicionam maior teor de lipídeos em milho.
- A produção de híbridos de milho de alto teor de óleo deve utilizar linhagens com alto teor de óleo para se evitar variações genéticas indesejáveis que poderiam ocorrer em consequência da segregação, reduzindo o teor médio de óleo nas espigas.

7. RESUMO

Efeitos genéticos e fenotípicos sobre a massa e sobre o teor de óleo das sementes foram estudados em cruzamentos entre quatro linhagens homozigotas de milho de endosperma branco e teor médio de óleo com quatro linhagens homozigotas de endosperma amarelo selecionadas para maior teor de óleo. As linhagens de endosperma foram plantadas em experimento com delineamento em blocos a o acaso com três repetições. Adjacente às linhagens de endosperma branco foram plantadas as quatro linhagens de endosperma amarelo de maior teor de óleo. Cada linhagem de endosperma branco foi designada para ser cruzada artificialmente com uma determinada linhagem de endosperma amarelo, formando quatro grupos de cruzamentos. Os cruzamentos foram caracterizados pela fecundação de cada linhagem de endosperma branco com uma mistura de pólen da própria linhagem e pólen da linhagem de endosperma amarelo, na proporção de 1:1 . Para um estudo comparativo, as linhagens de endosperma a marelo, de maior teor de óleo, foram também auto-fecundadas.

Para as análises, foram tomadas duas espigas de cada grupo de cruzamento e de cada repetição, bem como duas espigas de cada linhagem de endosperma amarelo auto-fecundada. Em cada espiga dos cruzamentos foram marcados e separados dez pares de sementes adjacentes de cores diferentes, tomados aleatoriamente ao lon go de toda a espiga, totalizando 480 sementes. Foram analisadas também dez sementes de cada espiga das linhagens de endosperma amarelo auto-fecundadas, totalizando 80 sementes. Determinou-se, en tão, a massa e o teor de óleo de cada semente individualmente. A análise do teor de óleo foi efetuada pela técnica de RMN.

Para cada grupo de cruzamento foram tabelados e discutidos valores médios de massa e teor de óleo, registrando-se separadamente os valores médios em sementes brancas e amarelas.

Os resultados indicaram ausência de heterose e importância de efeito aditivo para a massa e o teor de óleo nas sementes. Cerca de 52% do teor de óleo na semente é explicado pelo genótipo materno e cerca de 48% pelo efeito do novo genótipo da semente.

Foram feitas considerações sobre a possibilidade de se acelerar o ganho de seleção de plantas para maior teor de óleo, destacando-se a utilidade da análise individual por RMN, o tipo de amostragem de grãos individuais, e a conveniência de se cruzar linhagens de alto teor de óleo para a síntese de híbridos de milho.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1 - T.F. Conway (1961)
Determination of Fat by Nuclear Magnetic Resonance
Proceedings of a Symposium on High Oil Corn
College of Agriculture, University of Illinois
Urbana, Illinois, March 1961, p 29
- 2 - T.F. Conway, F.R. Earle (1963)
Nuclear Magnetic Resonance for Determining Oil Content of Seeds
Journal of the American Oil Chemist's Society, 40, 265-268
- 3 - T.F. Conway (1971)
A Wide-Line NMR R-F Saturation Method to Measure Fat in
Moist Samples of Defatted Corn Germ
J.A.O.C.S., 41, 54-58
- 4 - D.E. Alexander, L. Silvela, F.I. Collins, R.C. Rodgers (1967)
Analysis of Oil Content of Maize by Wide-Line NMR
J.A.O.C.S., 44, 555-558
- 5 - D.L. Garwood, E.J. Weber, R.J. Lambert, D.E. Alexander (1970)
Effect of Different Cytoplasms on Oil, Fatty Acids, Plant
Height, and Ear Height in Maize
Crop Science, 10, 39-41
- 6 - M.C.C. Wilmers, C. Rettori, H. Vargas, G.E. Barberis, W.J. da Silva
Single Corn Kernel Wide-Line Oil Analysis for Breeding Purpose
Revista Brasileira de Física, Vol. 8, Nº 3, 1978
- 7 - P.N. Tiwari, P.N. Gambhir, T.S. Rajan (1974)
Rapid and Nondestructive Determination of Seed Oil by Pulsed
Nuclear Magnetic Resonance Technique
J.A.O.C.S., 51, 104-109
- 8 - S. Ratkovic, J. Dumanovic, L. Ehrenberg (1975)
On a Fast Pulsed NMR Method for Oil Percentage Determination
in Bulk Samples Without Weighing
Newsletter, May, 1975, nº 4, 20-23

- 9 - J.J.Curtis, A.M.Brunson, J.E.Hubbard, F.R.Earle (1956)
Effect of the Pollen Parent on Oil Content of the Corn Kernel
Agronomy Journal, 48, 551-555
- 10- T.A.Kiesselbach (1960)
The Significance of Xenia Effects on the Kernel Weight of Corn
Research Bulletin 191, June 1960, Univ.of Nebraska College
of Agriculture, 1-30
- 11- J.Dumanovic (1960)
Inheritance of Oil Content in the F_1 Generation of Hybrid Maize
Zborn Rad. poljoprivred. Fak/Rev
Res. Wk. Fac. Agric. Beograd. 1960: 8: n^o 303: p 11
- 12 - V.H. Reich, D.E.Alexander (1965)
Maternal Effect on Fatty Acid Distribution and Quantity of Oil
in Corn
Abstracts of the Annual Meetings of the American Society of
Agronomy, held at Columbus, Ohio on October 31-November 5,
1965, pp 134
- 13- C.G.Poneleit, L.F.Bauman (1967)
A Diallel Analysis of the Oil and Fatty Acid Characteristics
of Nine Inbred Corn Lines
Agron. Abstr. Madison 1967. p 22
- 14- C.G.Poneleit (1968)
Diallel Analysis of Fatty Acids in Corn (Zea Mays L.) Oil
Diss. Abst. 29. Order n^o 68 - 12601. p 847B
- 15- K.Ruskova (1974)
The Effect of the Direction of the Cross on Oil, Protein and
Lysine Content in the Grain of Maize
Genetika i Selectsiya (1974) 7(5) 353-360
Plant Breeding Abstracts, Julho 1975, 45, n^o 7, p 422
- 16- J.Moreno Gonzalez, J.W.Dudley, R.J.Lambert (1975)
A Design III Study of Linkage Disequilibrium For Percent Oil
in Maize
Crop Science 1975, 15, 840-843

- 17 - J.W.Dudley, R.J.Lambert, I.A. de La Roche (1977)
Genetic Analysis of Crosses Among Strains Divergently
Selected for Percent Oil and Protein
Crop Science (1977, 17, 111-117)
- 18 - J. Dumanovic (1959)
The Effect of Heterosis on Oil and Protein Content in the
Grain of Intravarietal and Interline Maize Hybrids
Zborn. Wk. Fac. Agric. Beograd 1959: 7: n^o 284, p 77
- 19 - E.M.Purcell, H.C.Torrey, R.Pound (1946)
Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid
Physical Review, 69, 37-38
- 20 - F.Bloch, W.W. Hansen, M.Packard (1946)
Nuclear Induction
Phys.Rev. 69, 127
- 21 - F. Bloch (1946)
Nuclear Induction
Phys. Rev. 70, 460,474
- 22 - N.Bloembergen, E.M.Purcell, R.V.Pound (1948)
Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption
Phys. Rev. 73, 679-712
- 23 - E.R.Andrew (1969)
Nuclear Magnetic Resonance
Cambridge at the University Press
- 24 - A.Abragam (1961)
The Principles of Nuclear Magnetism
Oxford University Press
- 25 - E.H. Rogers (1960)
NMR and EPR Spectroscopy - Cap. I
Pergamon Press
- 26 - C.P.Slichter (1978)
Principles of Magnetic Resonance
Springer-Verlag

- 27 - R.Cencovsky (1978)
Melhoramento e Produção do Milho no Brasil
Fundação Cargill
- 28 - G.Bandel (1978)
Melhoramento e Produção do Milho no Brasil
Fundação Cargill
- 29 - R.G.D.Steel, J.H.Torrie (1960)
Principles and Procedures of Statistics
McGraw Hill Book Co., Inc.