

APLICAÇÃO DA RMN NA SELEÇÃO DE MILHO  
COM MAIOR TEOR DE ÓLEO NAS SEMENTES

ORIENTADOR: PROF. CARLOS RETTORI

MARIA CECILIA WILMERS G. GANDRA

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

agosto de 1979

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
BIBLIOTECA

BC 33274 m

I. FÍSICA - UNICAMP		
TM		
n.º classif.	_____	
n.º autor	G 153a	
.....ed.	v. ....	ex. ....
n.º tombo.	TM/380	

OK Dina

15-04-98

CM 000387043

S.N. 9808738

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho, foi realizado no laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Física da UNICAMP, sob a orientação do Prof. Carlos Rettori, a quem quero agradecer pela sua dedicação e eficiência, assim como pela sua paciência e compreensão.

Agradeço ao apoio dos amigos J. Suassuna, E.C. Silva, N.F. Leite e J.P. Donoso, e aos professores G.E. Barberis e H. Vargas, pelas proveitosas discussões sobre este trabalho.

A P. Wirtz e E.A. Camargo, agradeço a colaboração na parte de eletrônica e estatística respectivamente.

A A. Campineiro e Assis, pela assistência técnica, e à A. Furif e Gonçalo pela ajuda no laboratório.

Agradeço também ao Prof. W.J. Silva do Instituto de Biologia da UNICAMP; pela valiosa colaboração na parte genética deste estudo, e igualmente aos colegas biólogos, A. Ciampi, M.B. Lovato, O. Garcia, P. Arruda e A.M. Medina, pela cooperação e pelas pacientes explicações.

Agradeço à colega Rosa pelo trabalho de datilografia, e às amigas Martha Sílvia e Lena pelos desenhos desta tese.

Em especial, quero agradecer a F. Gandra, pela valiosa e necessária ajuda e incentivo, sem os quais, não teria sido possível o desenvolvimento deste trabalho.

Finalmente à minha Família e à todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste estudo, quero deixar meus agradecimentos.

A realização deste trabalho, foi possível graças ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Ao

Flávio

# ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
<u>CAPÍTULO 1</u>	
ASPECTOS TEÓRICOS	
1.1 Princípios Básicos da Ressonância Magnética Nuclear	3
1.2 O Milho - Zea Mays	13
1.2.1 Aspectos Morfológicos	14
1.2.2 A semente	16
<u>CAPÍTULO 2</u>	
TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	
2.1 O espectrômetro de RMN de onda contínua	22
2.1.1 Descrição geral do equipamento	22
2.1.2 Módulo de Rádio Frequência	22
2.1.3 Funcionamento Básico do Equipamento	24
2.2 Orientação da Amostra	26
2.3 Coleta, Armazenamento e Processamento dos Dados	27
2.4 Cálculo da porcentagem de óleo da amostra	28
2.5 Métodos de Seleção	28
2.5.1 Seleção de linhagens puras	29
2.5.2 Seleção recorrente	30
2.6 Método químico para Determinação da Porcentagem de Óleo de sementes	31
<u>CAPÍTULO 3</u>	
RESULTADOS EXPERIMENTAIS	
3.1 Método de avaliação do teor de óleo nas sementes por RMN	33
3.1.1 Precisão do método de Seleção por RMN	42
3.1.2 Precisão do método de Seleção Gold-Fisher	46
3.2 Programas de Seleção	48

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

56

ANEXO 1

PROGRAMA ÁREA

57

ANEXO 2

TESTE DE GERMINAÇÃO

60

ANEXO 3

DISTRIBUIÇÕES DE FREQUÊNCIA  $S_1$  E  $S_2$

62

REFERÊNCIAS

64

INTRODUÇÃO

O intuito do presente trabalho, consiste na obtenção de uma alternativa ao método químico e visual para a seleção de plantas com maior teor de ácidos graxos nas sementes.

Os métodos existentes oferecem progresso lento e baixa eficiência. O problema é ainda agravado pela impossibilidade da utilização no país de cultivares selecionados em zonas temperadas. Num clima tropical as variedades introduzidas podem se comportar de maneira totalmente diferente do local de origem. As alterações no ciclo da planta em função da temperatura e fotoperiodismo podem reduzir sensivelmente a sua produtividade.

O vegetal escolhido para o nosso estudo foi o milho, que apesar de não ser uma planta oleaginosa, tem enorme importância no país. O melhoramento visando maior quantidade de ácidos graxos nas sementes tem bastante interesse, uma vez que os ácidos graxos do milho apresentam alta qualidade nutritiva.<sup>1,2</sup>

O melhoramento de plantas tem alto valor econômico, porque proporciona a elevação da produtividade dos vegetais, sem alterar significativamente o custo da produção, preservando ainda a qualidade do meio ambiente.

Um dos maiores problemas do melhorista consiste na técnica de identificação dos efeitos dos genes que controlam características de valor econômico do vegetal. Quanto melhor essa identificação mais rápido será o progresso de seleção, uma vez que a frequência de genes favoráveis é aumentada mais rapidamente para um mesmo número de gerações de cruzamento por unidade de tempo. Com o aumento do número de plantas com características desejáveis dentro de uma população, obviamente aumenta-se a produ

vidade da nova variedade selecionada.

Outro ponto importante é o melhor controle dos gametas de um indivíduo de características desejáveis. Com isso aumenta-se ainda mais o ganho de seleção.<sup>3</sup> Daí, a grande importância de métodos não destrutivos para a seleção de sementes.

A Ressonância Magnética Nuclear, RMN, é uma forma de espectroscopia de RF<sup>4,5</sup>, cujo princípio básico na aplicação em análises de óleo, nos dá contagens seguras dos núcleos de hidrogênio em óleos líquidos.

Existem basicamente três técnicas de detecção da RMN, ou seja, RMN pulsado<sup>6</sup>, de alta resolução<sup>4</sup> e de onda contínua<sup>7-9</sup>, que garantem análises rápidas e precisas da quantidade de óleo em sementes de milho.

No nosso caso, temos disponível um equipamento de RMN de onda contínua, Wide-Line, cujo funcionamento básico encontra-se no capítulo 2 deste trabalho, que possibilita medidas da concentração de ácidos graxos num grão de milho, como está discutido no terceiro capítulo.

As sementes selecionadas com alta e baixa porcentagem de óleo, servirão para a síntese de híbridos e sintéticos, como está explicado no capítulo 3.

A primeira parte desta dissertação, apresenta os aspectos teóricos básicos utilizados para o desenvolvimento deste estudo. Por ser uma tese experimental e principalmente de aplicação da técnica de RMN, não cabe neste trabalho um estudo mais detalhado da teoria envolvida, senão o necessário para o desenvolvimento do mesmo.

## CAPÍTULO 1

### ASPECTOS TEÓRICOS

#### 1.1 Princípios Básicos da Ressonância Magnética Nuclear

Os primeiros experimentos de Ressonância Magnética Nuclear, foram realizados em 1946 por Purcell, Torrey, Pound<sup>10</sup> e Bloch, Hansen e Pachard<sup>11</sup>.

A RMN consiste de uma técnica espectroscópica que estuda a natureza dos níveis de energia de sistemas materiais, e as transições induzidas entre esses níveis, através da absorção ou emissão de radiação eletromagnética. Sua teoria possui uma ampla bibliografia<sup>12-14</sup>, e para o desenvolvimento deste trabalho, deveremos estudar basicamente as equações de Bloch, que descrevem as propriedades magnéticas do núcleo sob a ação de um campo magnético externo.

Assim, o momento magnético de um proton ao ser colocado num campo magnético externo  $H$ , interagirá com o mesmo, segundo a Hamiltoniana:

$$\mathcal{H} = - \vec{\mu}_N \cdot \vec{H} = - \gamma_N \hbar \vec{H} \cdot \vec{I} \quad , \quad (1)$$

onde  $\vec{\mu}_N$  é o momento magnético nuclear do proton,  $\gamma_N$  a razão giro magnética nuclear,  $\hbar$  a constante de Planck dividida por  $2\pi$  e  $\vec{I}$  o operador de spin nuclear.

Da teoria da Mecânica Quântica, sabemos que os estados de spin são quantizados e que a componente  $m_I$  do vetor spin nuclear em uma dada direção poderá assumir somente determinados valores de um conjunto discreto que varia de  $I, I-1, \dots, -I$ . Exis

tem  $2I + 1$  estados de energia nos quais uma certa distribuição de spins poderá se localizar. No caso do núcleo do hidrogênio,  $I = 1/2$  e teremos 2 níveis de energia, os quais denotaremos por  $\alpha$  e  $\beta$ , com  $m_I = 1/2$  e  $m_I = -1/2$  respectivamente.

A diferença de energia  $\Delta E$  entre esses dois níveis é dada por  $\gamma_N \hbar H$ , que também pode ser escrita como  $g_N \beta_N H$ , onde  $g_N$  é o chamado fator  $g$  nuclear e  $\beta_N$  o magneton nuclear.

Se temos um sistema de  $N$  spins a uma certa temperatura  $T$ , imersos num campo magnético estático  $\vec{H}_0$ , os mesmos deverão se distribuir nos estados  $\alpha$  e  $\beta$  segundo a lei de Boltzmann:

$$N_\beta = N_\alpha e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (2)$$

como  $N_\alpha + N_\beta = N$ , podemos reescrever a equação (2) na forma:

$$N_\alpha = \frac{N}{1 + e^{-\frac{\Delta E}{kT}}} \quad N_\beta = \frac{N}{1 + e^{+\frac{\Delta E}{kT}}} \quad (3)$$

Nas condições usuais de trabalho  $\Delta E \ll kT$  e a expansão das exponenciais em séries leva a:

$$N_\alpha = \frac{1}{2} N \left( 1 + \frac{\Delta E}{kT} \right) \quad e \quad N_\beta = \frac{1}{2} N \left( 1 - \frac{\Delta E}{kT} \right)$$

Introduzindo a diferença de população  $n$  entre os estados  $\alpha$  e  $\beta$  fica-se com:

$$N_\alpha = \frac{1}{2} (N+n) \quad N_\beta = \frac{1}{2} (N-n) \quad (4)$$

Para induzirmos transições entre os níveis, temos que aplicar uma perturbação no sistema. Esta perturbação é dada

pelo campo de rádio frequência  $\vec{H}_1$  cuja direção é perpendicular à  $\vec{H}_0$ . Esse campo é dependente do tempo e sua frequência  $\nu$  é tal que  $h\nu$  é igual a diferença de energia entre os níveis. Desta forma, temos a condição de ressonância, ou seja:

$$h\nu = \Delta E = g_N \beta_N H_0$$

O número de transições obtido por métodos estatísticos, é dado por:

$$P_{\alpha\beta} = \frac{2\pi}{h} |\langle \beta | \vec{H}_1(t) | \alpha \rangle|^2 \delta(E_\beta - E_\alpha - h\nu)$$

O termo  $|\langle \beta | \vec{H}_1(t) | \alpha \rangle|^2$  é a probabilidade de transição induzida  $w_{\beta\alpha}$ . Esta, é a mesma tanto para transições de  $\alpha$  para  $\beta$ , como de  $\beta$  para  $\alpha$ .

A variação no tempo do número de spins no estado  $\alpha$  em termos de  $P_{\alpha\beta}$  fica dada por:

$$\frac{dN_\alpha}{dt} = N_\beta P_{\beta\alpha} - N_\alpha P_{\alpha\beta} = -Pn \quad (5)$$

Substituindo (4) em (5) encontramos:

$$\frac{dn}{dt} = -2Pn$$

cuja solução é do tipo

$$n(t) = n(0) e^{-2Pt} \quad (6)$$

Nota-se nesta última equação, que com o decaimento exponencial, a diferença de população entre os níveis tenderá a

a desaparecer com o decorrer do tempo. Apesar da diferença inicial na população  $n(0)$ , temos a introdução do fenômeno da saturação.

Além das transições induzidas, ocorrem também as espontâneas, devido à procura da condição de equilíbrio. Essas transições espontâneas, denominadas relaxação, são representadas por dois tipos de mecanismos. O primeiro deles é caracterizado pela busca do equilíbrio da população dos níveis de energia. Isso faz com que haja uma interação entre os spins e a própria rede num tempo  $T_1$ , conhecido como tempo de relaxação spin-rede ou longitudinal. Portanto,  $T_1$  é o tempo necessário para que os spins troquem energia com sua vizinhança.

No segundo tipo de mecanismo, temos uma troca de energia entre os próprios spins. Este tipo de relaxação deve-se principalmente às componentes dos diferentes campos magnéticos locais que sentem esses spins, e é caracterizado pelo tempo de relaxação spin-spin ou transversal  $T_2$ . A combinação dos campos magnéticos locais com o campo magnético externo aplicado, faz com que haja um deslocamento da frequência de ressonância. Isto explica o relacionamento desse tempo  $T_2$  com a largura de linha da ressonância, como será visto no decorrer deste estudo.

O cálculo dos tempos de relaxação, assim como a teoria dos mecanismos destas, constituem uma parte muito estudada e complexa, tendo assim uma ampla bibliografia, razão pela qual apenas citamos sua existência para o entendimento da fenomenologia da técnica da RMN.

Se chamamos  $W_{\alpha\beta}$  a probabilidade de transição espontânea de  $\alpha$  para  $\beta$ , por analogia a (5), ficaremos com:

$$\frac{dN_{\alpha}}{dt} = N_{\beta}W_{\beta\alpha} - N_{\alpha}W_{\alpha\beta} \quad (7)$$

De (4) e (7), resulta que:

$$\frac{dn}{dt} = - \frac{(n-n_0)}{T_1} \quad (8)$$

onde  $n_0$  representa a diferença de população em equilíbrio térmico, valendo  $N[(W_{\beta\alpha} - W_{\alpha\beta}) \cdot (W_{\beta\alpha} + W_{\alpha\beta})]$  e  $1/T_1 = W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}$ , o inverso do tempo necessário para adquirir esse equilíbrio.

A esta altura do nosso estudo, é conveniente que comecemos a analisar o problema da Ressonância Magnética Nuclear sob um ponto de vista macroscópico. No lugar dos protons com momento magnético  $\vec{\mu}$ , introduziremos a magnetização nuclear  $\vec{M}$  que é a somatória desses momentos.

Consideraremos o campo magnético externo estático  $\vec{H}_0$  aplicado na direção  $\hat{k}$ . A componente  $z$  da magnetização, que é diretamente proporcional à diferença de população  $n$ , é dada por analogia a (8) por:

$$\frac{dM_z}{dt} = - \frac{(M_z - M_0)}{T_1} \quad (9)$$

onde  $M_0$  é a magnetização inicial,  $M_0 = \chi_0 H_0$ .

Da mesma forma, as componentes  $x$  e  $y$  ficam:

$$\frac{dM_x}{dt} = \frac{-M_x}{T_2} \quad \text{e} \quad \frac{dM_y}{dt} = \frac{-M_y}{T_2} \quad (10)$$

Deduzidas as equações que descrevem a interação entre o momento magnético do proton e o campo magnético  $\vec{H}$ , estudaremos o movimento dessa partícula sob a ação desse campo.

Utilizando a representação de Heisenberg:

$$\frac{d\vec{\mu}_N}{dt} = \frac{\partial \vec{\mu}_N}{\partial t} + \frac{1}{i\hbar} [\vec{\mu}_N, \mathcal{H}]$$

teremos para a magnetização

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{H}) \quad (11)$$

Essa última expressão descreve o movimento da magnetização nuclear de um conjunto de spins livres.

Introduzindo à equação (11) o efeito da relaxação das equações (9) e (10), ficamos com:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{H}) - \frac{M_x i + M_y j}{T_2} - \frac{M_z - M_0}{T_1} k \quad (12)$$

que são conhecidas como Equações de Bloch.

Mudando do referencial do laboratório  $(i, j, k)$  para um que gira com o campo da rádio frequência  $\vec{H}_1(t)$ , podemos reescrever a equação (12) da forma:

$$\frac{d\vec{M}'}{dt} = \gamma(\vec{M}' \times \vec{H}') - \frac{u i' + v j'}{T_2} - \frac{M_z - M_0}{T_1} k \quad (13)$$

onde

$$\vec{H}_1 = H_1 i$$

$$\vec{M}' = u i' + v j' + M_z k$$

$$\vec{H}' = (H_0 + \frac{\omega}{\gamma}) k + H_1 i'$$

Substituindo  $H_0 \gamma$  por  $\omega_0$  e  $H_1 \gamma$  por  $\omega_1$ :

$$\vec{H}' = \frac{(\omega_0 - \omega) k' + \omega_1 i'}{\gamma} = \frac{\Delta \omega k' + \omega_1 i'}{\gamma}$$

e as três componentes da magnetização no novo referencial ficam:

$$\frac{du}{dt} = \Delta\omega v - \frac{u}{T_2}$$

$$\frac{dv}{dt} = \Delta\omega u - \frac{v}{T_2} + \omega_1 M_z$$

$$\frac{dM_z}{dt} = -\omega_1 v - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}$$

As soluções estacionárias para as equações acima são encontradas fazendo-se  $\frac{d\vec{M}}{dt} = 0$  e desprezando-se os efeitos transientes

$$u = M_0 \frac{\gamma H_1 T_2^2 (\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (14)$$

$$v = M_0 \frac{\gamma H_1 T_2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (15)$$

$$M_z = M_0 \frac{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (16)$$

Escolhendo  $\vec{H}_1$  no referencial do laboratório como sendo  $H_{1x} = H_1 \cos \omega t$  ou em sua forma complexa  $H_{1x} = 2H_1 e^{-i\omega t}$ , reescreveremos a magnetização  $M_x$  como:

$$M_x = u \cos \omega t + v \sin \omega t \quad (17)$$

ou

$$M_x = 2H_1 e^{-i\omega t} \chi(\omega)$$

onde

$$X(\omega) = X'(\omega) + iX''(\omega)$$

é a susceptibilidade magnética complexa.

Esta magnetização para ter sentido físico, deve ser constituída somente da parte real da sua forma complexa. Consequentemente,

$$M_x = H_1 [X(\omega)e^{-i\omega t} + X^*(\omega)e^{i\omega t}]$$

$$M_x = 2H_1 X'(\omega) \cos\omega t + 2H_1 X''(\omega) \sin\omega t \quad (18)$$

Comparando as equações (17) e (18) tiramos as relações das componentes da susceptibilidade, ou seja:

$$X'(\omega) = \frac{1}{2} M_0 \frac{T_2^2(\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma_N^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (19)$$

$$X''(\omega) = \frac{1}{2} M_0 \frac{T_2}{1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma_N^2 H_1^2 T_1 T_2} \quad (20)$$

A potência da RF absorvida por um sistema de spins é dada por:

$$P = - \vec{M} \frac{d\vec{H}}{dt} \quad (21)$$

como

$$\vec{H}_1 = H_{1x} \hat{i} = 2H_1 \cos\omega t$$

$$P = - M_x \frac{d H_{1x}}{dt} = 2H_1^2 X''\omega$$

e por (18), (22) e (20)

$$P = H_1^2 M_0 \omega \frac{T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 T_1 T_2 H_1^2}$$

Para relacionar essas equações com a parte experimental propriamente dita da RMN, devemos observar que uma curva Lorentziana normalizada tem a forma

$$g_{T_2}(\Delta\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2 (\Delta\omega)^2} \quad (24)$$

onde  $1/T_2$  é a largura desta curva, tomada na metade de sua altura máxima.

Se o termo  $\gamma H_1^2 T_1 T_2$ , conhecido como fator de saturação, na equação (23) da potência absorvida for pequeno, a absorção de energia tomará a forma de uma curva Lorentziana. Portanto, uma maneira de expressarmos a potência absorvida de um campo  $\vec{H}_1$  por um sistema de spins imersos num campo magnético, seria:

$$P = H_1^2 M_0 \omega \pi g_{T_2}(\Delta\omega) \quad (25)$$

A máxima absorção de potência ocorre na ressonância, e vale

$$P_{\max} = \frac{H_1^2 M_0 \omega T_2}{2 + \gamma H_1^2 T_1 T_2} \quad (26)$$

Caso haja saturação teremos

$$P = \frac{H_1^2 M_0 \omega \pi}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} g_{T_2}(\Delta\omega) \quad (27)$$

onde  $1/T_2' = \frac{1}{T_2} (1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2)^{1/2}$  implica num alargamento da curva de ressonância.

Até o presente momento não consideramos efeitos tais como a inhomogeneidade do campo magnético aplicado, ou mesmo a interação magnética entre os protons do núcleo com os elétrons que os rodeiam. Se temos um  $\Delta H$  que caracteriza a não homogeneidade do campo magnético externo aplicado, teremos as frequências de Larmor  $\omega_0$  entre os intervalos  $\omega_0^0 + x$  e  $\omega_0^0 + x + dx$ . O termo  $\omega_0^0$  representa o valor mais frequente de uma distribuição normalizada  $h(x)dx$  dos spins com frequências entre os intervalos citados. Para esses spins são válidas as soluções estacionárias de  $u, v$ , e  $M_z$  das equações 14, 15, 16 substituindo-se  $\Delta\omega$  por  $\omega_0^0 + x - \omega$  e integrando por todo  $x$ . A equação da potência absorvida fica:

$$P = \frac{H_1^2 M_0 \omega \pi}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} \int_{-\infty}^{\infty} g_{T_2}(\omega_0^0 + x - \omega) h(x) dx \quad (28)$$

Assumindo que a mudança na largura da linha da ressonância é determinada exclusivamente pela inhomogeneidade do campo, tomaremos a dependência em  $x$  de  $h(x)dx$  mais suave que  $\text{em } g_{T_2}(\omega_0^0 + x - \omega)$ . Portanto,

$$P = \frac{H_1^2 M_0 \omega \pi}{1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2} h(\omega - \omega_0^0) \quad (29)$$

Como a distribuição  $h(x)dx$  assume a forma de uma curva Lorentziana teremos um alargamento na curva de absorção de potência em relação à predita teoricamente.

Quanto à análise das interações magnéticas do núcleo, salienta-se o efeito magnético das correntes eletrônicas induzidas provenientes dos elétrons que rodeiam os núcleos em questão. Estes causam uma pequena blindagem, fazendo com que o núcleo sinta um campo magnético adicional oposto ao externo aplicado, mas proporcional ao mesmo. Esses campos adicionais locais, variam de acordo com o ambiente químico em que se encontram os núcleos e modificam a Hamiltoniana Zeeman de  $-g_N\beta_N H_I z$  para  $-g_N\beta_N(1-\sigma)H_I z$ , onde  $\sigma$  é a constante que caracteriza o deslizamento observado na frequência de ressonância.

## 1.2 O Milho - Zea Mays

O milho é uma espécie de planta originária da América, e que hoje é cultivada praticamente em todo o globo, cujos ancestrais ocorrem na América Pré-Colombiana.<sup>15</sup>

Através da análise da grande variabilidade genética encontrada e das descobertas arqueológicas de fósseis de pólen<sup>16</sup> e outras partes da espiga, acredita-se que a espécie seja natural do México. O milho atual tem muita homologia cromossômica com espécies do gênero Zea e Tripsacum, tendo na espécie Zea mexicana (teosinte) possivelmente seu ancestral.

É um vegetal de grande variabilidade genética e adaptação, que é tão domesticado que depende estritamente do homem para sua sobrevivência.

No Brasil são cultivados anualmente cerca de 12 milhões de hectares, sendo esta a maior área coberta por uma espécie de planta econômica no país. Isso permite uma produção de 18 a 20 milhões de toneladas anuais que coloca o país como 2º produtor mundial de milho no mundo.

### 1.2.1 Aspectos Morfológicos

A botânica<sup>17</sup> classifica as plantas em duas grandes categorias: as Fanerógamas, que produzem flores com estrutura bem definida, e as Criptogamas que não apresentam essas características. No primeiro grupo, encontramos as Angiospermas que desenvolvem frututos e são subdivididas em monocotiledoneas e dicotiledoneas. O milho é uma espécie monocotiledonea, por apresentar um único cotilédone, e tem anatomia básica das gramíneas.

É uma planta anual robusta e ereta com altura que pode variar de 1 a 4m. O sistema radicular<sup>18</sup> consiste de raízes primárias, responsáveis pela nutrição da plântula, e de raízes adventícias que são as raízes permanentes, responsáveis pela absorção de água e nutrientes da planta adulta. O sistema radicular pode ter de 1,5 a 3m de comprimento, distribuindo-se numa profundidade mêdia de 30cm.

As folhas são arranjadas alternadamente e são suportadas pelas bainhas que envolvem o colmo. Os limbos foliares são geralmente longos, largos e planos e são mantidos em ângulos aproximadamente retos com o colmo, por uma forte nervura central.

O milho é uma planta monóica, isto é, tem flores femininas e masculinas no mesmo indivíduo, porém em estruturas diferentes. Isso acarreta na oportunidade para a polinização cruzada, cujo principal agente é o vento.

A inflorescência masculina ou flecha ou pendão, é encontrada na extremidade superior do caule. É do tipo panícula, com um eixo central e várias ramificações laterais (figura 1). Nas ramificações, as espiguetas são arranjadas aos pares e são constituidas de duas flores, cada uma delas contendo 3 estames, 2 lodículas e um pistilo abortado. Da lodícula temos a emergência das anteras,

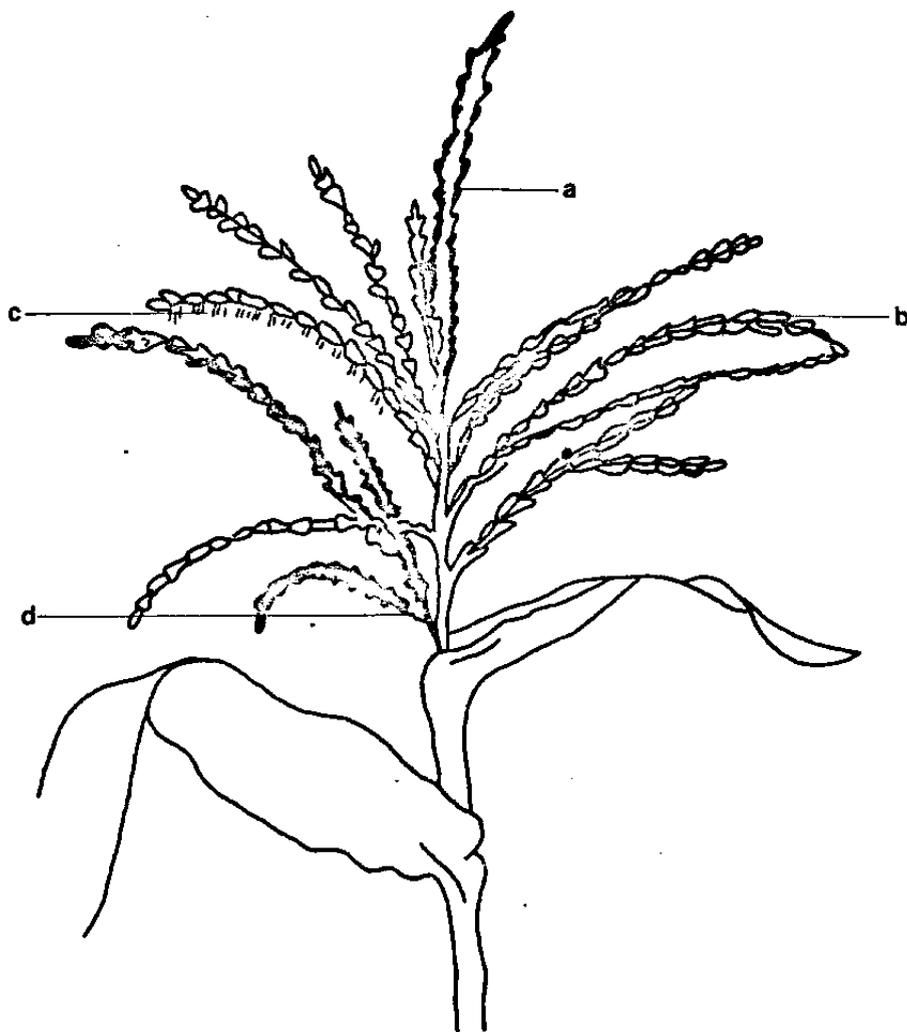


FIGURA 1 - PENDÃO (segundo Anderson, Pioneer Hi-Bred. Corn Company, Des Moines, pg. 26, 1951)

a - eixo central, b - espiguetas, c - estames, d - ramificações secundárias.

responsáveis pela formação dos grãos de pólen, os quais são uninucleares até a aproximação da diescência das anteras. O núcleo sofre então uma primeira divisão mitótica e produz um núcleo vegetativo ou núcleo do tubo polínico, e um núcleo generativo que forma duas células espermatícas, produzindo assim um gameta masculino que carrega 10 cromossomos. Na ocasião da antese, após a abertura das espiguetas, as anteras sofrem ruptura e permitem a saída dos grãos de pólen, que são produzidos em enorme quantidade.

A inflorescência feminina ou espiga, surge num ramo lateral da planta, e é sustentada por bainhas foliares (palha) que se originam no nó. É formada por um eixo ou raquis (sabugo), ao longo do qual estão dispostas reentrâncias que se transformam em espiguetas com duas flores, das quais somente uma é funcional (figura 2). Esta flor é constituída de um único ovário basal, com longos estilo-estigmas (barba). Do óvulo temos a formação de quatro células com 10 cromossomos, das quais somente uma não se degenera, e que funciona como a primeira célula do saco embrionário. O núcleo desse megásporo através de divisões mitóticas, forma dois grupos de 4 núcleos, que se localizam em cada extremidade do saco embrionário. Um núcleo de cada grupo move-se na direção do centro até se tocarem, afim de formar os dois núcleos polares. Os 3 núcleos da região chalazal, dividem-se até a formação das células denominadas antípodas, enquanto que os outros 3 da região micropilar formam o núcleo da cosfera, ladeados pelas sinérgidas.

### 1.2.2 A semente

Os grãos de pólen ao serem lançados ao ar pelas anteras, caem nos estilo-estigmas, iniciando assim o processo de germinação. Há a emissão do tubo polínico que cresce em sentido do óvu-

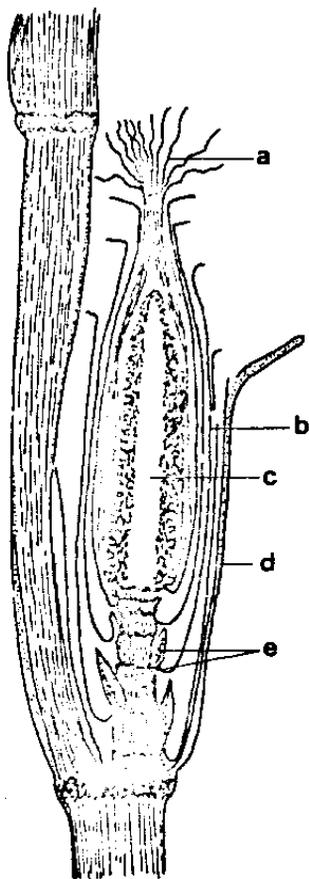


FIGURA 2 - ESPIGA (segundo Weatherwax, Corn and Corn Improvement, G.F. Sprague, pg. 93, 1955)

a - estilo, b - palha, c - espiga, d - folha que envolve a espiga, e - gemas nas axilas das palhas

lo, até penetrar no saco embrionário. Através deste, temos a condução dos núcleos generativos, os quais um se une à oosfera para formar o zigoto  $2n$ . Este se transforma no germen, que é o esporófito embrionário da próxima geração. O outro núcleo espermático funde-se com os dois núcleos polares do saco embrionário para formar o núcleo primário do endosperma, com 30 cromossomos. Este núcleo depois de uma série de divisões, dará origem a um tecido rico em metabólitos de reserva.

Juntamente com a formação do germen e do endosperma, se dá o crescimento das paredes do ovário, formando o revestimento da semente, ou pericarpo. A última camada de células do endosperma, dá-se o nome de aleurona.

O ciclo vital do milho está esquematizado na figura 3, e o período médio de duração do mesmo, é de cerca de 75 dias para o desenvolvimento vegetativo, 50 para o enchimento do grão e 30 para a secagem do mesmo.

O grão de milho, representado na figura 4, é um tipo de fruto simples, seco e indeiscente, denominado cariopse. Como na maioria das gramíneas, tem um alto conteúdo de energia e uma menor quantidade de proteínas.

Sua composição química média é dada na tabela 1,<sup>19,20</sup> em porcentagem do seu peso. Na época da colheita, 12% do peso da semente é devido à umidade.

TABELA I  
Composição Química do grão de milho

Fração	grão	amido	proteína	lipídeos	açúcares	cinzas
grão	-	71,5	10,3	4,8	2,0	1,4
endosperma	82,3	86,4	9,4	0,8	0,6	0,3
embrião	11,5	8,2	18,8	34,5	10,8	10,1
pericarpo	5,3	7,3	3,7	1,0	0,3	0,8
base	0,8	5,3	9,1	3,8	1,6	1,6

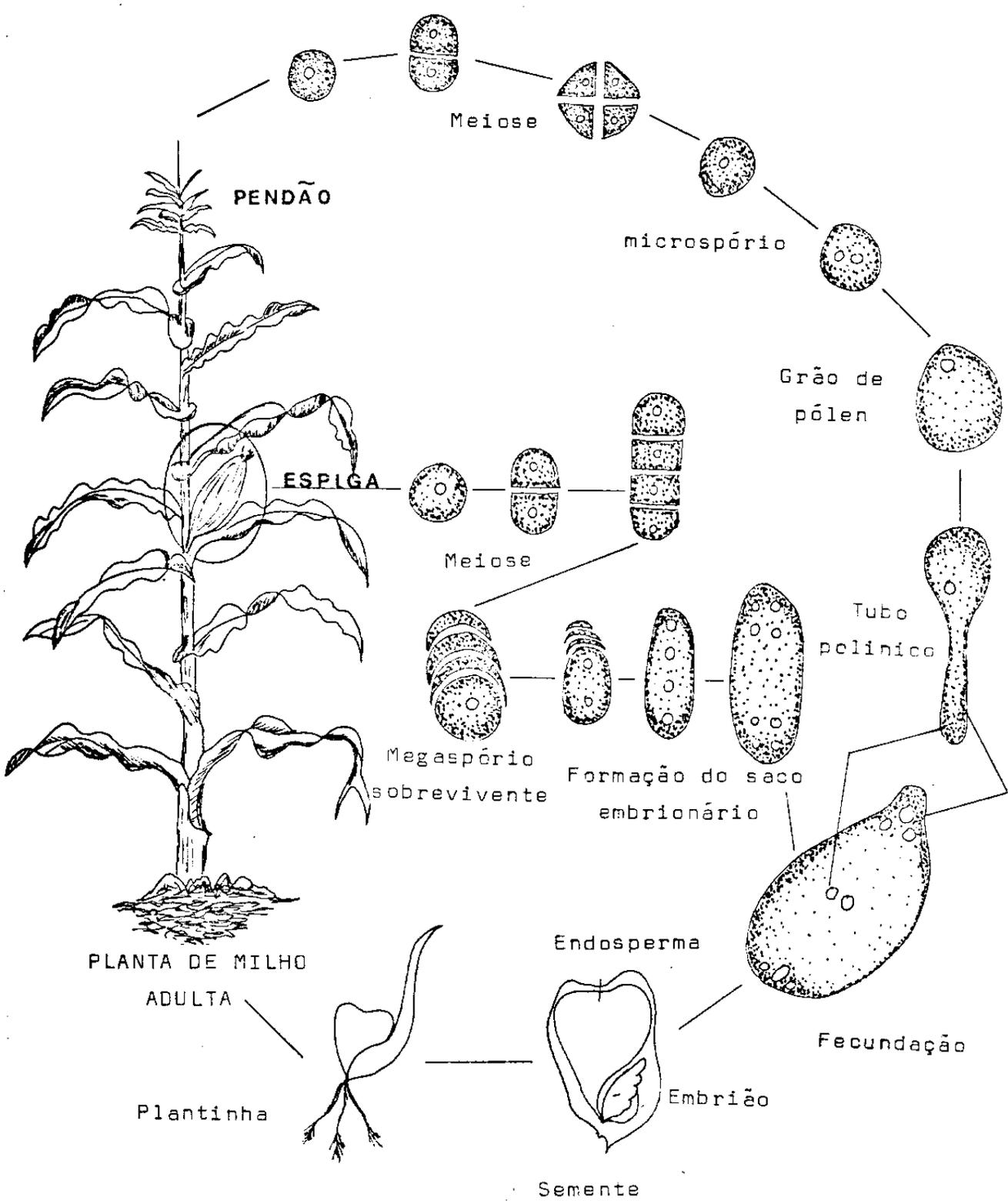


FIGURA 3 - CICLO VITAL DO MILHO (segundo Brewbaker<sup>34</sup>)

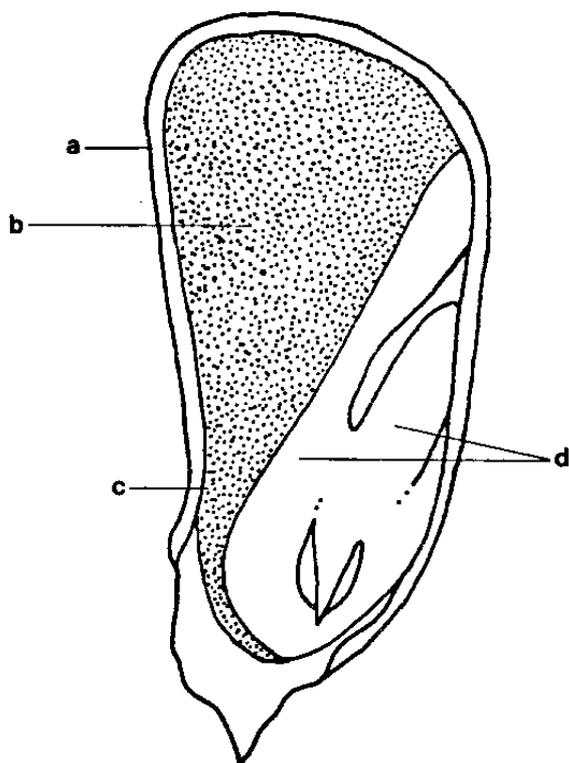


FIGURA 4 - ESQUEMA DO CORTE LONGITUDINAL DO GRÃO DE MILHO  
(segundo Bandel<sup>13</sup>)

a - pericarpo  $2n$ , b - endosperma  $3n$ , c - aleurona  $3n$ ,  
d - embrião + escutelo = germen  $2n$ .

Como o objetivo deste trabalho é o melhoramento do milho em termos da quantidade de óleo, torna-se necessário sabermos as proporções dos ácidos graxos que o compõe. Estas proporções<sup>21,22</sup> estão dadas na tabela 2, levando-se em conta as variações genéticas e ambientais as quais o vegetal está sujeito.

TABELA II  
Composição do óleo de milho

ácido graxo	%	VI	
palmitico C16:0	10-19	11,5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
estearico C18:0	1,5-3	2,2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
oleico C18:1	16-44	26,6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
linoleico C18:2	36-55	58,7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
linolenico C18:3	0,5-1,5	0,8	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
arachidic C20:0		0,2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

O óleo de milho apresenta uma alta qualidade nutritiva, em função de uma maior concentração de ácidos graxos saturados em relação aos não saturados. A saturação é dada pelo inverso do valor de Iodo VI, que corresponde à proporção relativa do ácido em griglicerídeos.<sup>23</sup>

## CAPÍTULO 2

### TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

#### 2.1 O Espectrômetro de RMN de onda contínua

##### 2.1.1 Descrição geral do equipamento

Para a realização deste trabalho utilizamos um "kit" de RMN de onda contínua, acoplável aos espectrômetros convencionais de EPR da Varian.

Os eletroímãs E-12 e E-15 com homogeneidade de campo de 20 a 15 mG por polegada respectivamente, atingem campos máximos de 15KG e 18KG. Os intervalos que esses campos podem percorrer vão de 200mG a 10KG, em tempos desde 0,5 minutos até 16 horas. A amplitude de modulação pode variar de 50mG a 40Gpp e a frequência de modulação do campo magnético indicada para experimentos de RMN é de 35 Hz.

O módulo de rádio frequência WL-210 da Varian, possui um intervalo de frequência de operação de 3 a 35 MHz, com uma sensibilidade de 5:1 (para uma amostra de deutério natural) e uma estabilidade de  $1/10^4$  MHz. A potência máxima de saída é da ordem de 100 mW.

Maiores detalhes e informações podem ser encontrados nos respectivos manuais de operação do equipamento.

##### 2.1.2 Módulo de Rádio Frequência

No módulo de RF, representado na figura 5, temos inicialmente um oscilador responsável pela geração da onda de RF, que

Câmara Térmica

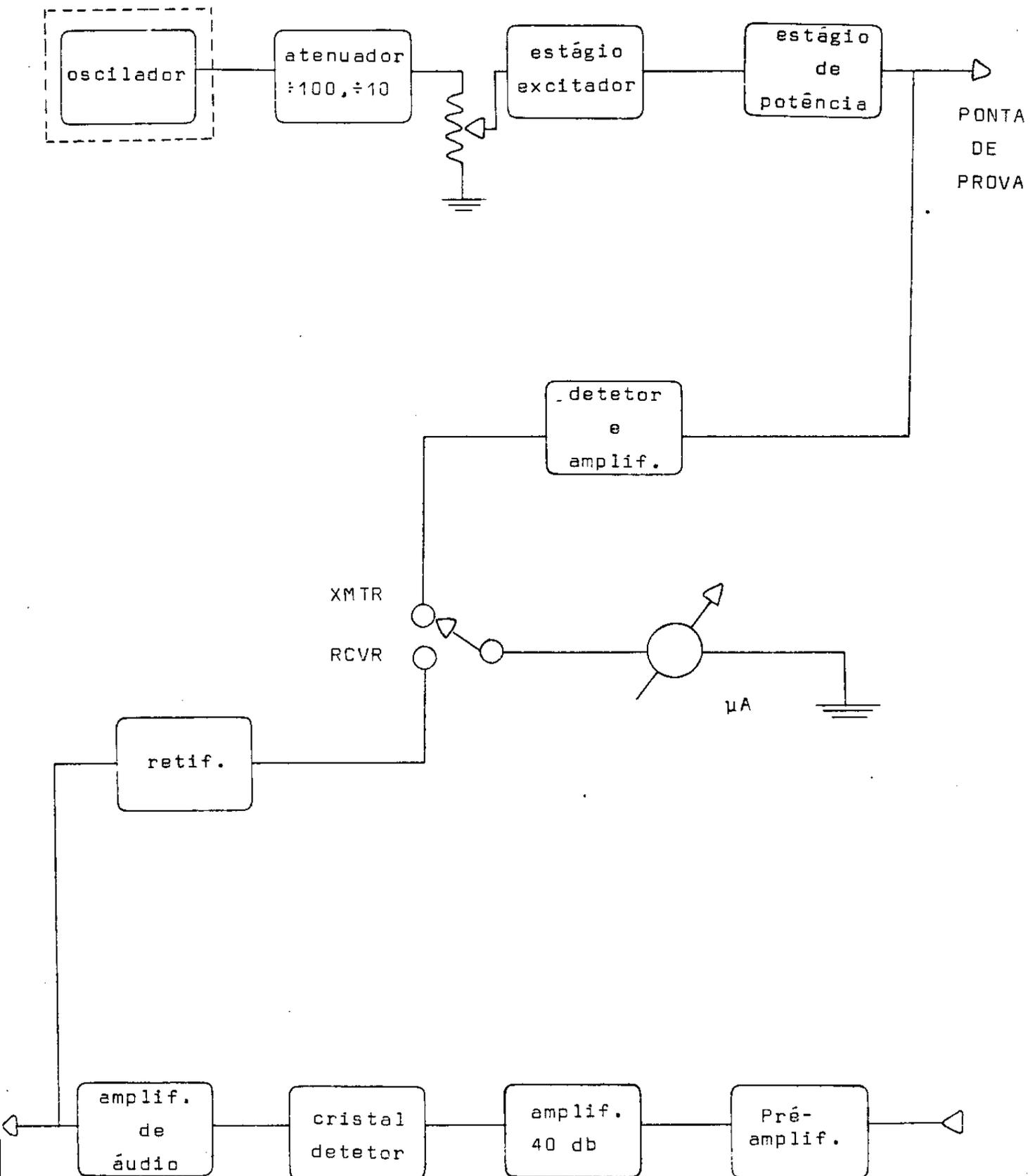


FIGURA 5 - DIAGRAMA DE BLOCOS DA UNIDADE WL - 210

É montado num compartimento de temperatura controlada para uma maior estabilidade de frequência. Três chaves LC, possibilitam a escolha dos intervalos de frequência de operação do aparelho, e em comum com essas chaves, tem-se um capacitor variável para o ajuste da frequência desejada. Esse oscilador permite a aplicação de uma fonte externa de RF, assim como possui uma saída de baixa impedância para a monitoragem da frequência.

Uma atenuação em três níveis e um ajuste fino segue essa primeira unidade e em seguida o sinal passa por um excitador que o amplifica e o injeta num estágio de potência. Esse último estágio é constituído de dois transistores em regime de alta potência, um circuito de acoplamento e uma saída para a ponta de prova.

O sinal que volta da amostra é recebido e amplificado num amplificador de ganho de 40 db e aplicado ao diodo detetor. O sinal AC de 35 Hz assim obtido, é demodulado e injetado num amplificado convencional de áudio.

Tanto do estágio de potência, quanto do estágio de recepção, é retirada uma amostra do sinal de RF, que é retificada e aplicada a um microamperímetro. Estando a chave do medidor em RCVR, teremos uma indicação de quando haverá um maior casamento de impedâncias e portanto uma maior transferência de energia de RF para a ponta de prova. Caso a chave esteja em XMTR, teremos uma medida qualitativa da potência incidente na amostra, em unidades de  $\mu A$ .

### 2.1.3 Funcionamento Básico do Equipamento

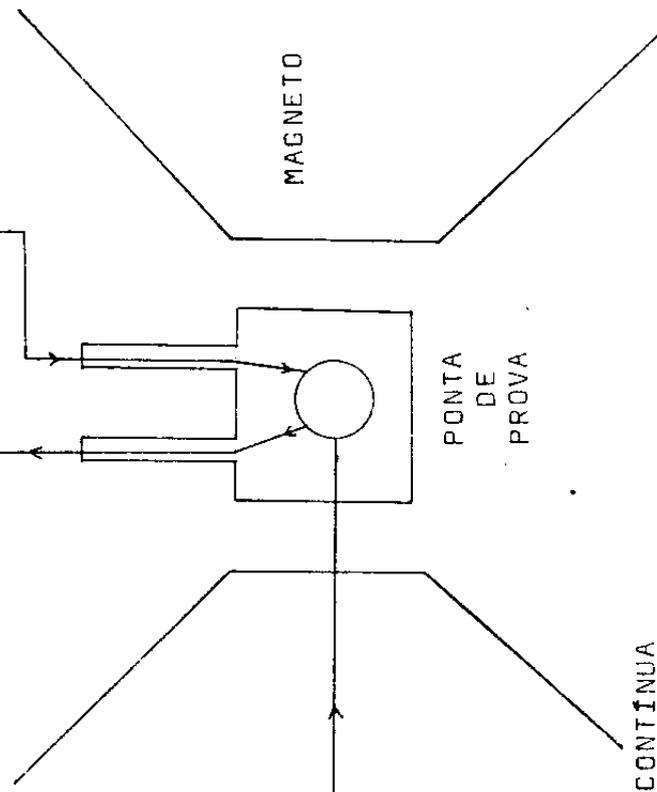
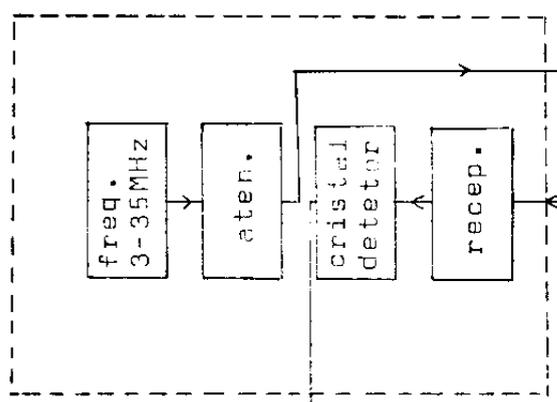
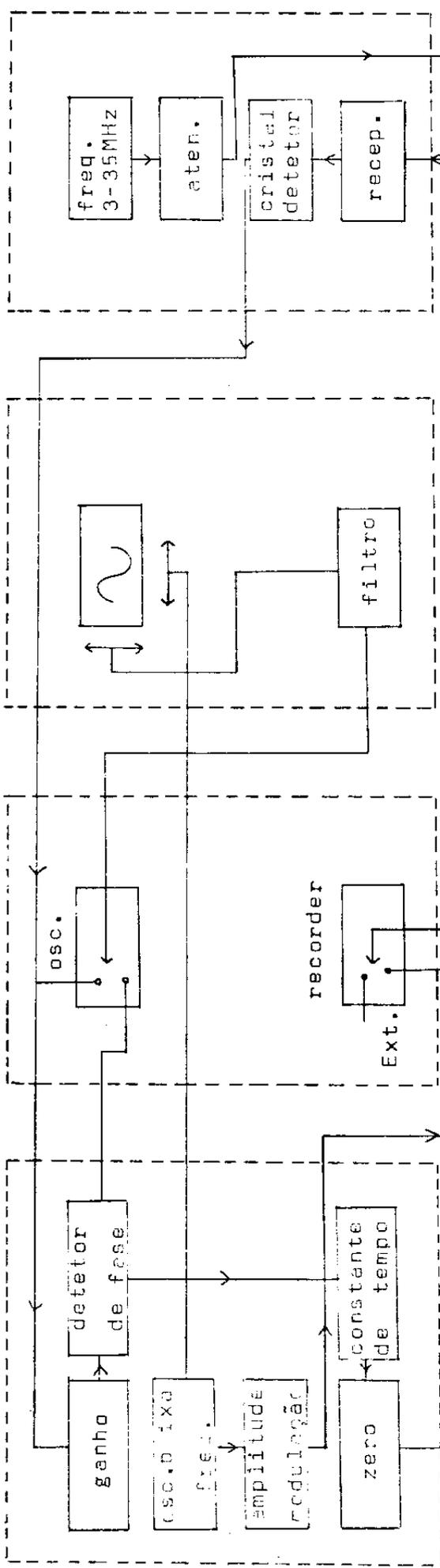
Basicamente nosso sistema de RMN de onda contínua é constituído de um console de operação, um módulo de rádio frequência e um magneto, com sua respectiva fonte de alimentação. Seu diagrama de blocos está ilustrado na figura 6.

Unid. WL-210

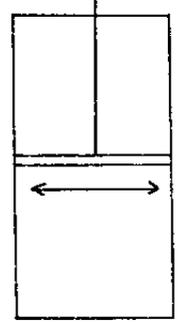
Osciloscópio

Seleção de Função

Unid. Baixa Freq.



Modulação



Unidade Recorder

FIGURA 6 - DIAGRAMA DE BLOCOS DO ESPECTRÔMETRO DE RMN DE ONDA CONTÍNUA

Por tratar-se de ressonância dos núcleos de hidrogênio, o campo magnético para uma frequência de 30 MHz, é da ordem de 7,04 KG.

A amostra a ser analisada é posicionada na ponta de prova e é irradiada com uma potência de RF proveniente da unidade transmissora do módulo de RF. O sinal é transmitido à ponta de prova através de um cabo coaxial, alimentando na mesma, uma bobina excitadora. O sinal detetado é modulado à mesma frequência do campo magnético e é amplificado no estágio de recepção da unidade WL-210. Em seguida, esse sinal é aplicado ao cristal detetor, que fornecerá a informação de RMN sob a forma de um sinal AC modulado. Esse sinal é transmitido à unidade de baixa frequência e passará por um amplificador e um detetor de fase.

O sinal DC resultante, que é proporcional à derivada de curva de absorção de potência, e à amplitude de modulação desde que esta seja pequena em relação à largura de linha do espectro, passa finalmente por um filtro para ruído e é aplicado ao eixo Y do registrador.

Uma segunda saída do detetor de fase vai para um osciloscópio a fim de auxiliar o ajuste da unidade de rádio-frequência.

A variação do campo magnético é feita pelo comando do eixo X do registrador em torno do campo de ressonância, sob o controle de um sensor Hall.

## 2.2 Orientação da Amostra

Observamos que o sinal de RMN de um grão de milho, tem uma grande dependência em relação à posição da amostra com respeito à bobina de RF. Este fato também observado por Tiwari<sup>6</sup>, nos

levou a um cuidado especial para localizar o grão onde obtivéssemos maior intensidade no sinal.

Essa dependência angular se deve principalmente à distribuição não uniforme do óleo no grão de milho, assim como à inhomogeneidade do campo de RF devido às grandes dimensões da amostra.

Verificou-se que esses efeitos podem ser minimizados, quando localizamos o germen ao longo do eixo da bobina. Desta forma, pequenas mudanças na orientação em torno dessa posição, acarretam em diferenças da ordem de 10% do sinal.

### 2.3 Coleta, Armazenamento e Processamento dos Dados

Acoplado ao espectrômetro de RMN, temos um computador Varian, modelo 620-L, com 16k de memória, responsável pela coleta, armazenamento e processamento dos dados da linha de ressonância.

A linguagem utilizada é Extended-Basic e usamos basicamente dois programas: MSAV, inerente ao sistema, e o denominado AREA, por nós elaborado.

O primeiro deles, através de uma série de subrotinas em linguagem Assembler, transforma o sinal analógico do registrador em sinais digitais, e o armazena na forma de um vetor que pode ter desde 500 a 10.000 pontos. Tanto sua listagem, quanto sua manipulação encontram-se no manual de programas para EPR.

O segundo programa é responsável pelo cálculo da área limitada pela curva de Ressonância. Para o processamento desse cálculo, utiliza o método numérico dos trapézios, o que resulta num número que é proporcional ao número de spins ressonantes na amostra.<sup>12</sup> Tanto seu diagrama de blocos quanto sua listagem, encon-

tram-se no Anexo 1 deste trabalho.

#### 2.4 Cálculo da porcentagem de óleo da amostra

A concentração de óleo da semente, é obtida pela comparação direta da área da ressonância nuclear da semente, com a detetada de uma amostra padrão de óleo comercial de milho.

Se temos um volume X em ml de óleo padrão, a área correspondente ao espectro de RMN obtido pela mesma, será  $A_o$ . Da mesma forma, se temos Y em ml de óleo na semente, por correspondência teremos outra área  $A_s$ . Portanto,

$$\begin{aligned} Y(\text{ml}) &= A_s \\ X(\text{ml}) &= A_o \end{aligned} \quad Y(\text{ml}) = \frac{X(\text{ml})A_s}{A_o} \quad (30)$$

Como queremos medidas comparativas com o peso do grão, substituiremos Y(ml) por m/p, onde m representa a massa de óleo na semente e  $\rho$  a densidade volumétrica do óleo. Voltando em (30), ficamos com:

$$m = \frac{X(\text{ml})\rho A_s}{A_o} \quad (31)$$

Em termos da porcentagem da massa do grão M,

$$C(\%) = \frac{\rho X(\text{ml}) A_s}{M A_o} 100\% \quad (32)$$

#### 2.5 Métodos de Seleção

Em estudos de genética quantitativa envolvendo linhas de milho, constatou-se que a ação gênica aditiva predomina

no efeito dos genes que condicionam a composição total do óleo deste vegetal<sup>2,25</sup>, principalmente nos ácidos oleico e linoleico<sup>1,26</sup>.

Desses trabalhos pode-se concluir que diferenças entre grãos individuais de uma mesma espiga em populações segregantes apresentam uma componente genética importante que pode ser identificada e capitalizada em programas de seleção.<sup>3</sup>

Assim programas de melhoramento, tais como a seleção de linhagens puras e seleção recorrente, que utilizam com grande eficiência a vantagem da alta herdabilidade da característica, podem modificar com relativa facilidade a quantidade de óleo nas sementes de milho no material selecionado.

Esse aumento na porcentagem de óleo, não deve atingir níveis superiores a 8%, para que não haja uma redução na produção de sementes/hectare, visto que estudos comprovam a existência de uma correlação negativa entre produção de grãos e quantidade de óleo nos mesmos.<sup>2,23,27</sup>

#### 2.5.1 Seleção de linhagens puras

O milho por ser um vegetal de polinização cruzada, apresenta plantas bastante heterozigotas para diversos fatores genéticos. Assim para a produção de material uniforme, isto é, que não segregue na descendência, há necessidade de se efetuar cruzamentos artificiais para a obtenção de linhagens puras.

A seleção de linhagens puras inicia-se com a seleção de progênies de indivíduos com caracteres econômicos desejáveis na população segregante inicial. Em seguida as melhores plantas das melhores progênies são autofecundadas, isto é, são cruzadas com elas mesmas. Isso é facilmente obtido através de processos de proteção dos estigmas e polinização com pólen da própria planta. A

primeira geração de plantas autofecundadas é denominada  $S_1$ .

Nas gerações  $S_3$  e  $S_4$ , produtos de três e quatro autofecundações, muitos loci ficam homozigotos<sup>28</sup>, e características familiares começam a surgir. Muita heterozigose ainda persiste nessas gerações, de maneira que plantas dentro da mesma família ainda diferem geneticamente umas das outras. Seleciona-se então as melhores plantas nas melhores famílias e repete-se a operação de autofecundação. Na geração  $S_6$  espera-se que a maioria das famílias sejam homozigotas para quase todos os loci. Desta forma originam-se as linhas puras para vários caracteres da planta.<sup>29</sup>

Essas linhas puras, apresentam-se sempre menos vigorosas que a variedade que lhes deu origem. Isto se deve à combinação de fatores recessivos para a redução do vigor e produtividade. Além disso não é possível se obter linhagens que reunam somente características favoráveis, dado o efeito de ligação que ocorre entre genes favoráveis e desfavoráveis localizados no mesmo cromossomo.

Desta forma essas linhagens obtidas precisam ser cruzadas artificialmente para se verificar a melhor combinação desejada, dando então origem aos híbridos, cuja característica principal é o alto vigor e produtividade. No híbrido temos pois a oportunidade de combinação, num só genótipo, de genes favoráveis que são encontrados nos dois genótipos parentais.

### 2.5.2 Seleção recorrente

Esse tipo de seleção, aplicado normalmente em espécies de plantas de polinização cruzada, visa a produção de variedades mais produtivas denominadas sintéticos. O processo utilizado envolve inicialmente a escolha de plantas com caracteres desejáveis de

populações heterozigotas. Essas plantas selecionadas, com homozigose variada, são então cruzadas entre si, para a síntese de uma nova população com maior frequência de combinações genéticas favoráveis.

Assim, as plantas das fontes heterozigotas são autofecundadas por uma ou mais gerações e ao mesmo tempo selecionadas para um ou mais caracteres desejáveis. Plantas com performance inferior são descartadas. Em seguida as plantas superiores são propagadas através das sementes resultantes da autofecundação. Todos os inter cruzamentos dessas progênies superiores são então feitos, e a população inter cruzada resultante, servirá novamente de fonte para novos ciclos adicionais de seleção-autofecundação-inter cruzamento.

A grande vantagem desse tipo de seleção é a possibilidade de se elevar continuamente a frequência de genes favoráveis até a fixação das várias características de interesse.<sup>30</sup> Com isso possibilita-se a concentração de genes favoráveis em um certo grupo de plantas, mantendo ainda uma alta variabilidade genética, que assegura novos ganhos de seleção em gerações futuras.

## 2.6 Método Químico para Determinação da Porcentagem de Óleo de Sementes

O método químico utilizado para a determinação da quantidade de óleo nas sementes de milho, foi o Gold-Fisher. O equipamento foi utilizado em cooperação com a Faculdade de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP.

Inicialmente deve-se moer as sementes e homogeneizar a amostra. Para se efetuar as análises em condições ideais, deve-se utilizar cerca de 4 gramas de material, ou seja, aproximadamente 20

grãos de milho.

Em seguida essa massa é pesada e lavada continuamente por um solvente, no caso éter de petróleo, durante o intervalo de tempo de 4 horas. O óleo e o solvente são coletados num becker previamente pesado, e através da evaporação do solvente temos pela diferença de peso, a porcentagem de óleo da amostra analisada.. O tempo total para uma medida, é de cerca de 6 horas.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Basicamente iremos apresentar e discutir os resultados experimentais obtidos, sob dois aspectos: O primeiro deles será o do estabelecimento do método alternativo de seleção de sementes pela técnica de RMN e o segundo a discussão dos resultados dos programas de seleção efetuados para a elevação e diminuição da quantidade de óleo dos grãos de milho.

#### 3.1 Método de avaliação do teor de óleo nas sementes por RMN

A figura 8 mostra os espectros típicos de RMN do próton a diferentes potências da rádio frequência, de um grão de milho natural. Na parte a desta figura, nota-se a presença de três ressonâncias com diferentes larguras de linha, enquanto que em b e c, o espectro apresenta somente duas e uma linha respectivamente, indicando um possível efeito de saturação. Essas ressonâncias, sugerem que os núcleos de hidrogênio observados, devam estar na presença de diferentes "ambientes" físico-químicos que causam diferentes "chemical shifts"<sup>7</sup> e diferentes tempos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$ <sup>12</sup>. Como consequência, teríamos distintos campos de ressonância, assim como larguras de linha  $(\gamma T_2)^{-1}$  e fatores de saturação  $\gamma H_1^2 T_1 T_2$  distintos também, como é observado.

Na tentativa de identificação das matrizes dessas ressonâncias, dissecou-se um grão de milho até cerca de 5 a 6% de umidade. A dissecação foi feita numa estufa a 40°C num intervalo de 7 dias consecutivos. Essas condições foram escolhidas de maneira a não alterar o poder germinativo da semente, como mostra o teste de

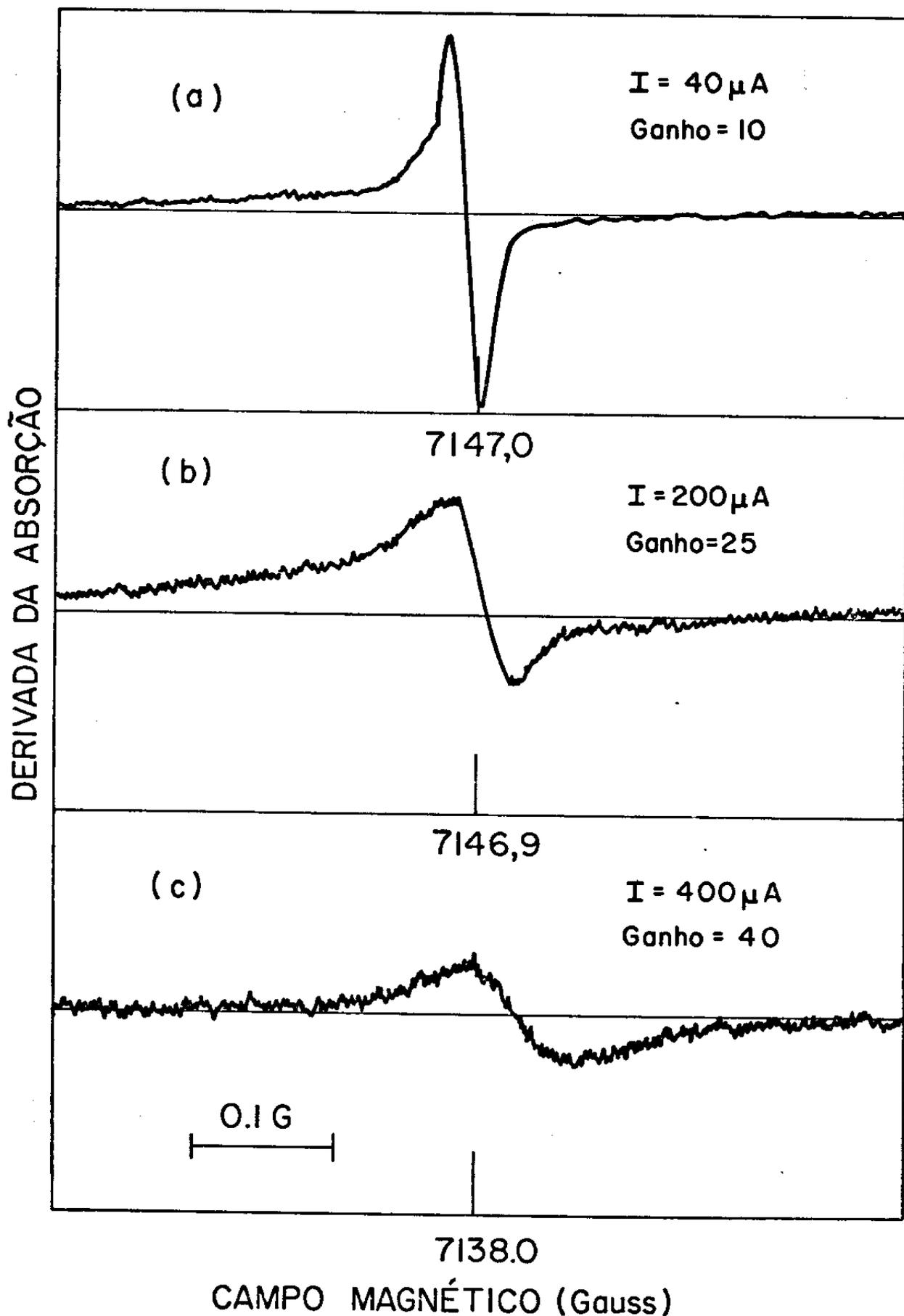


FIGURA 8 - ESPECTROS DE RMN DE UM GRÃO DE MILHO NATURAL, À DIFERENTES POTÊNCIAS DE RF

germinação realizado no Instituto de Biologia da UNICAMP. Este teste encontra-se no anexo 2 deste trabalho.

A ressonância do milho dissecado está representada na figura 9, onde nota-se a ausência da linha mais larga em qualquer nível de potência de RF. Podemos portanto, atribuí-la aos núcleos de hidrogênio das moléculas de água, que por sua vez devem estar ligados ao seu envoltório, visto que a ressonância dos protons da água "livre", é bem mais estreita.

Como vimos no capítulo 1-2, uma semente de milho contém proteínas e carboidratos. Estando contudo os hidrogênios desses compostos na fase sólida, teremos para os mesmos, ressonâncias muito largas para serem detetadas, devido à baixa mobilidade dos spins e pequeno tempo de relaxação  $T_2$ .<sup>3</sup>

Concluiu-se assim, que as duas ressonâncias do espectro de RMN do milho dissecado, devam vir de diferentes grupos de núcleos de hidrogênio das moléculas de óleo no milho.

Para a confirmação desta hipótese foi feita a ressonância nos principais componentes do grão, como mostra a figura 10. Notamos que as duas linhas mais estreitas concentram-se quase que totalmente no germen, o que era esperado, por termos, nessa parte da semente a maior concentração de óleo. Ainda mais, separando-se o germen em escutelo e embrião, constatou-se que a linha mais estreita encontra-se em maior proporção no embrião, que concorda com o trabalho de cromatografia gasosa<sup>24</sup> das diferentes distribuições dos ácidos graxos nessas partes do germen.

A figura 11, mostra o espectro de RMN obtido de uma amostra de óleo comercial de milho. Podemos notar que as mesmas características do espectro são observadas para a figura 10b, confirmando que as linhas mais estreitas são provenientes dos núcleos de hidrogênio das moléculas de óleo.

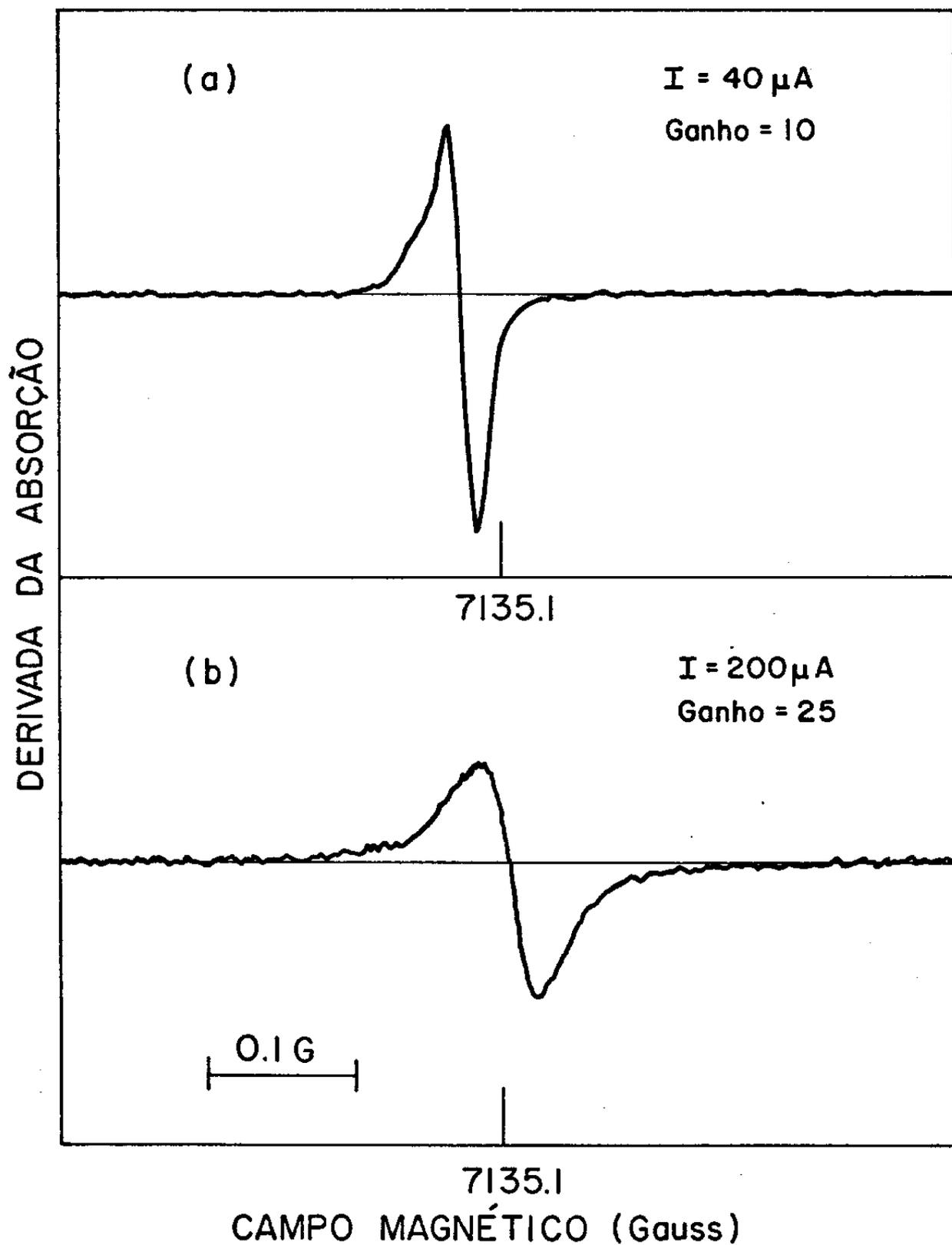


FIGURA 9 - ESPECTROS DE RMN DE UM GRÃO DE MILHO DISSECADO,  
À DIFERENTES POTÊNCIAS DE RF

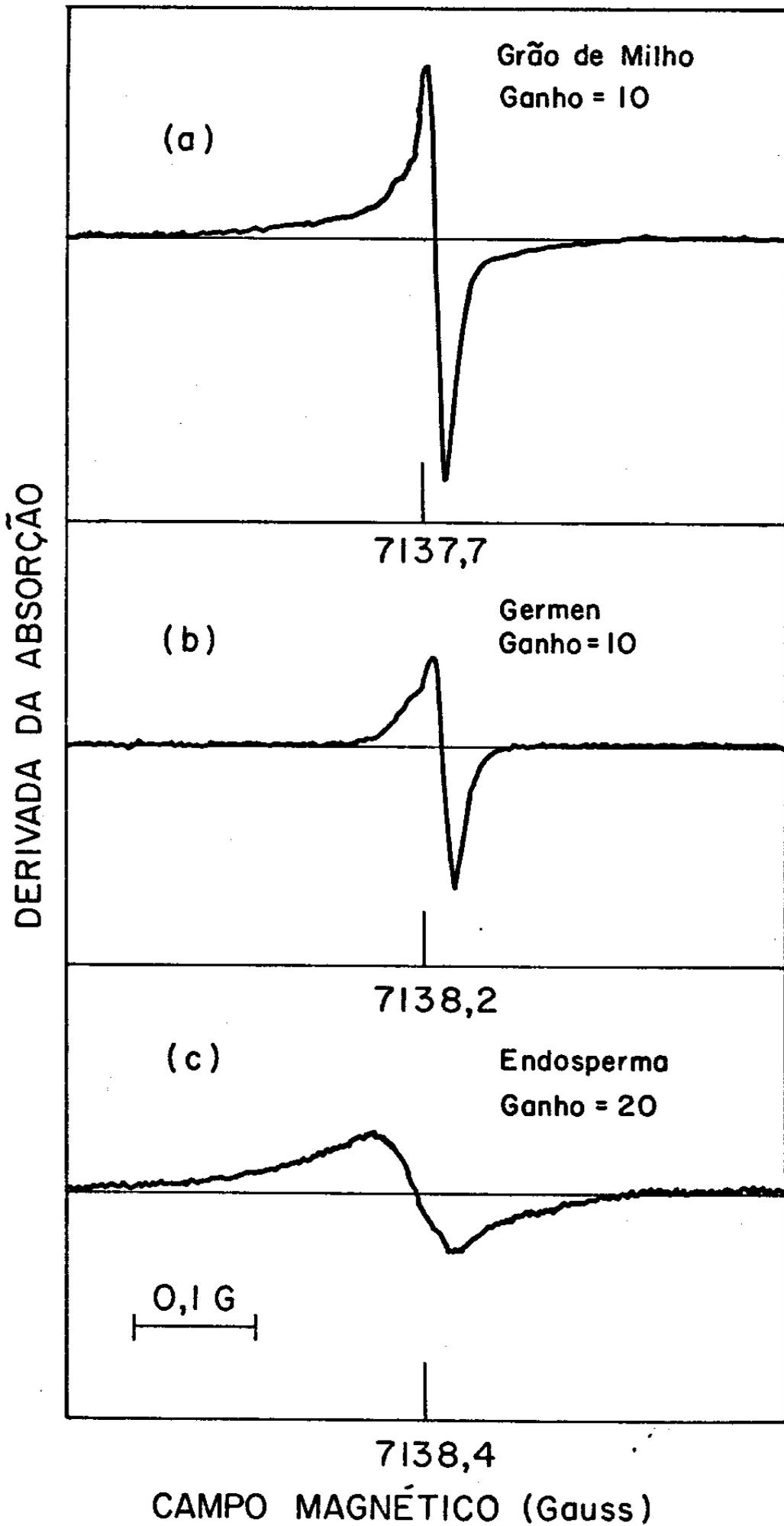


FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN DAS PRINCIPAIS PARTES DO GRÃO DE MILHO

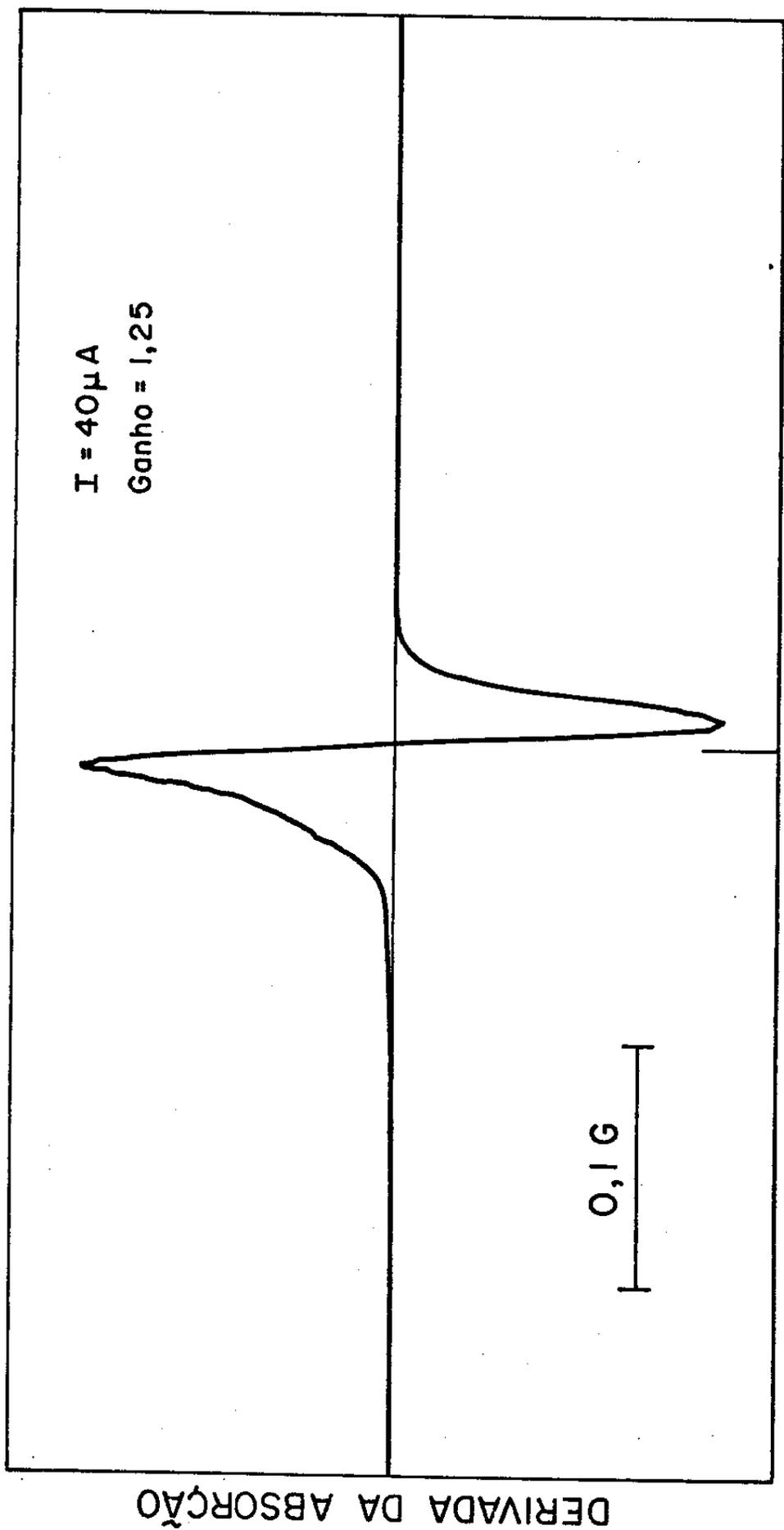


FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE UMA AMOSTRA DE ÓLEO COMERCIAL DE MILHO

Para avaliarmos a contribuição individual para a intensidade total da ressonância, integramos o espectro das sementes naturais e dissecadas, à vários níveis de potência de RF. A figura 12 mostra a curva de saturação experimental correspondente à superposição das três ressonâncias. A baixos níveis de potência (30  $\mu$ A), a intensidade total do sinal de absorção é dada principalmente pelas componentes do óleo, enquanto que para altas (300  $\mu$ A) pela da água.<sup>31</sup> Isto é confirmado na figura 13, onde temos a curva de saturação de potência para as ressonâncias das partes do grão.

Poderíamos determinar as concentrações de óleo e água em uma semente de milho natural, medindo-se a intensidade total da ressonância em diferentes níveis de potência de RF. Contudo, no nosso caso particular, a razão sinal-ruído não é suficientemente alta para que possamos ter medidas precisas em potências mais elevadas.

Desta forma, fixamos nossa região de trabalho numa faixa de baixa potência (100  $\mu$ A), onde a ressonância dos protons de uma semente natural de milho provém de duas componentes, óleo e água, forçando-nos desta maneira à dissecagem da amostra a níveis de 5% de umidade.

Do cálculo da área limitada pelo espectro da ressonância do milho dissecado, à um nível baixo de potência, temos um valor proporcional ao número de spins ressonantes ou seja à quantidade de óleo da semente.

A concentração dos ácidos graxos é obtida pela comparação direta das áreas dos espectros da semente e da amostra padrão, como já foi visto no capítulo 2-4.

Para testarmos a correlação do método de RMN com o método químico Gold-Fisher, fizemos uma análise sistemática em 80 grãos de milho. Esses grãos foram discriminados a cada grupo de 10,

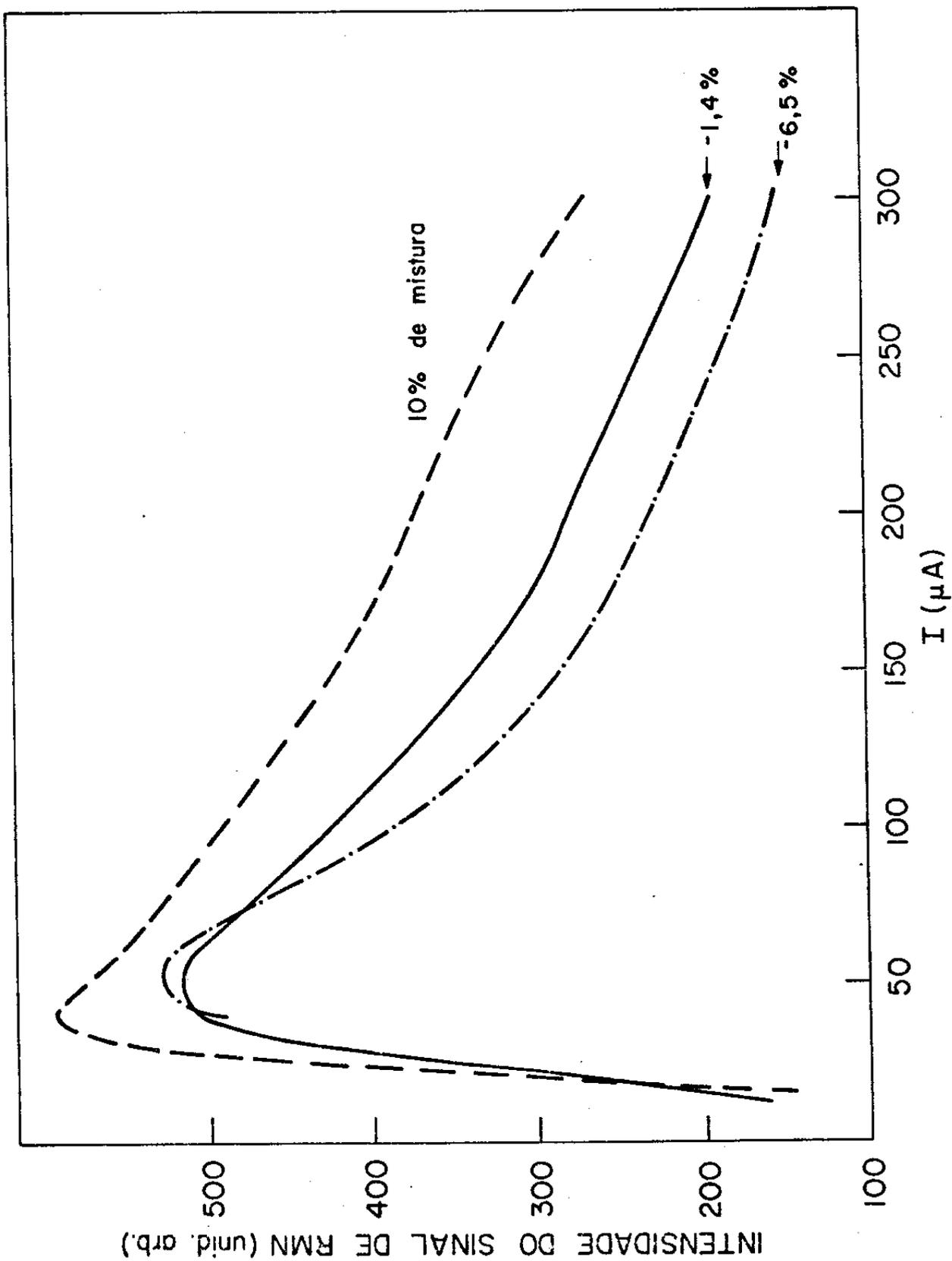


FIGURA 12 - CURVA DE SATURAÇÃO DE POTÊNCIA DE UM GRÃO DE MILHO

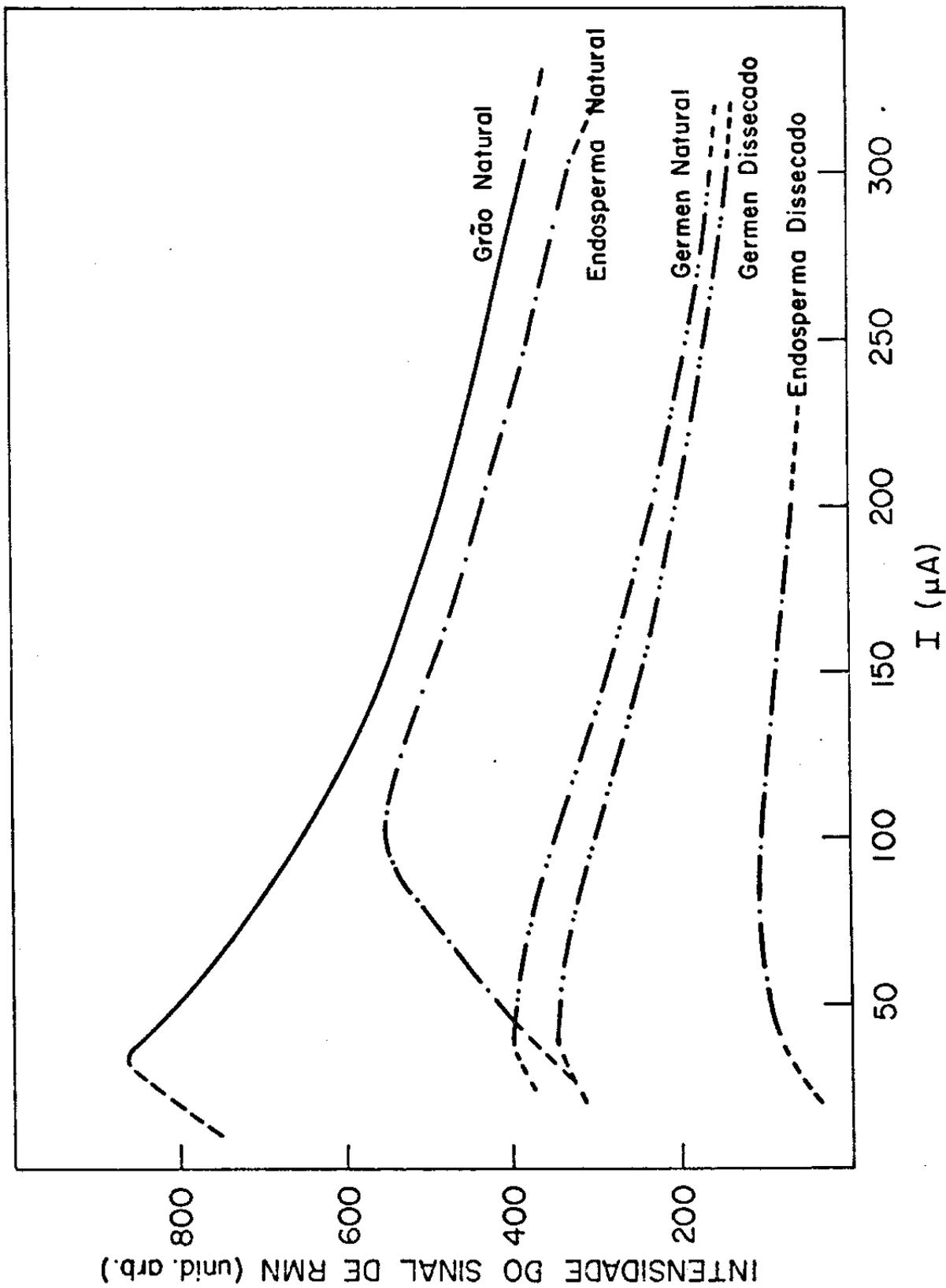


FIGURA 13 - CURVA DE SATURAÇÃO DE POTENCIA DAS PRINCIPAIS PARTES DO GRÃO

pela proveniência de diferentes famílias, cada uma delas com a mesma base genética.

O coeficiente de correlação  $r$ , dado por:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

com  $x$  os valores fornecidos pelo método físico e  $y$  os do método químico, foi estimado de  $r=0.997$ . Este dado nos indica que há uma correlação direta quase perfeita dos dois métodos e podemos representar essa correlação por um modelo de reta de regressão linear, dada por  $y = ax + bx$  onde  $b$  é o coeficiente de regressão, dado por:

$$b = \frac{\sum_i x_i y_i - (\sum_i x_i \sum_i y_i) / n}{\sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2 / n}$$

e

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

A figura 14 mostra essa reta, com o coeficiente  $b$  igual a 1,03 e  $a = -0.18$ .

### 3.1.1 Precisão do Método de Seleção por RMN

Correlacionados os métodos químico e físico, é necessário caracterizar sua precisão, através de uma estimativa do erro de cada medida realizada.

A medida da porcentagem de óleo de um grão de milho individual pela técnica de RMN, possui basicamente 4 fontes de er

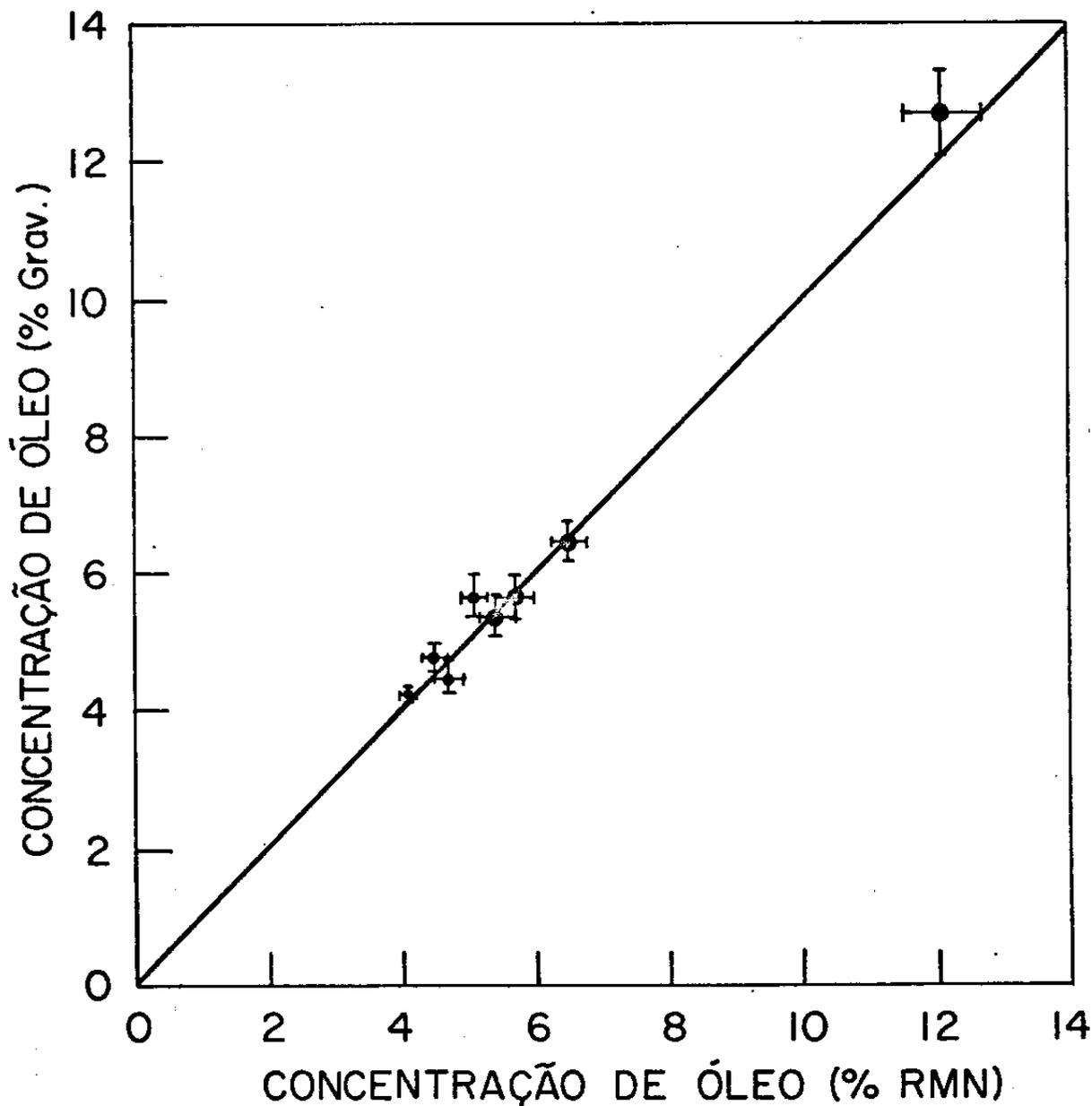


FIGURA 14 - RETA DE CORRELAÇÃO ENTRE ANÁLISE QUÍMICA E ANÁLISE DE RMN

ro de ordem experimental. A primeira fonte é proveniente da orientação do milho na ponta de prova do equipamento. Em seguida temos o erro do método de cálculo da área do sinal devido ao ruído existente e por fim a pesagem da amostra. Esses mesmos erros são incorridos na medida da quantidade de óleo da amostra padrão.

Para podermos ter uma estimativa do erro total, foi feito um experimento em sete grupos de milho com 3 amostras cada grupo. O tratamento para a análise de variância, foi o da repetição da análise de um mesmo dado, englobando assim todas as fontes de erro.

A tabela com os dados obtidos estão a seguir:

grupos	T <sub>1</sub>			T <sub>2</sub>		
	G1	13,6	10,1	11,3	14,2	10,8
G2	4,0	3,2	4,9	4,3	3,4	4,9
G3	4,2	4,8	4,6	4,3	4,9	4,2
G4	7,6	7,7	5,3	8,5	7,7	5,1
G5	3,7	4,6	6,4	4,0	4,0	5,8
G6	5,0	4,9	4,9	5,3	4,9	4,9
G7	4,0	4,1	3,9	4,4	4,6	3,5

Da análise de variância<sup>32</sup> temos uma estimativa do coeficiente de variação que dá uma idéia da precisão do experimento.

$$SQ_{\text{amostra}} = C = \frac{(\sum_i X_{iT1} + \sum_i X_{iT2})}{n^{\circ} \text{ de amostras}}$$

$$SQ_{\text{total}} = \sum_i X_{iT1}^2 + \sum_i X_{iT2}^2 - C$$

$$SQ_{\text{grupo}} = \frac{\sum (X_{ig})^2}{6} - C$$

$$SQ_{\text{tratamento}} = \frac{(\sum X_{iT1})^2 + (\sum X_{iT2})^2}{21} - C$$

$$SQ_{\text{resíduo}} = SQ_T - SQ_t - SQ_g$$

Obtivemos a seguinte análise de variância:

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
grupos	6	286,66	47,78	
tratamento	1	0,83	0,83	0,86
resíduo	34	32,84	0,97	
total	41	320,33	7,81	

Na tabela acima, GL corresponde aos graus de liberdade, SQ à soma dos quadrados e QM ao quadrado médio.

O valor de  $F = \frac{QM_{\text{trat.}}}{QM_{\text{res.}}}$  serve para testarmos através de tabelas de limites bilaterais de F ao nível de 1 a 5% de probabilidade, se a diferença entre os tratamentos é devido ao acaso ou se há algum efeito sistemático agindo sobre eles. Pelo valor obtido, podemos observar que a diferença dos tratamentos não é significativa, caracterizando assim, o acaso como fonte de erro.

Sendo os tratamentos equivalentes, temos uma estimativa da variância  $\sigma^2$ , através do quadrado médio do resíduo. O coeficiente de variação CV, resulta em:

$$CV = \frac{100\sigma}{\bar{x}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{0,86}{7}} = 0,37$$

$$CV = \frac{100 \cdot 0,37}{5,9} = 6,3\%$$

Portanto para cada análise realizadas pela de RMN, temos um erro que corresponde aproximadamente a 7% da medi da da concentração do óleo.

### 3.1.2. Precisão do Método de Seleção Gold Fisher

Para o método químico, temos basicamente 3 fontes de erro. O primeiro deles é caracterizado pela hipótese de considerar mos que não ocorre diferenças entre os grãos de uma mesma amostra, ao compararmos a média de um determinado número de sementes, com análises individuais de porcentagem de óleo pelo método de RMN. A segunda fonte, é proveniente das próprias condições da análise gra vimétrica, envolvendo 5 grãos ao invés de 20, que é o indicado. Fi nalmente, temos o erro da reprodução de um mesmo dado.

Dada a impossibilidade de se realizar um número maior de testes, onde pudéssemos avaliar o erro total incorrido, admitimos que as diversas fontes de erro são independentes, e desta forma, podemos considerar seus efeitos aditivos.

Para se estimar o erro devido a não igualdade do material, foi feito um ensaio de 8 grupos com 10 sementes cada, dos quais através de uma mistura homogênea, retirou-se duas amostras para serem analisadas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela abaixo, seguida da respectiva análise de variância, cuja variância foi avaliada em 0,05.

grupos	amostras	
G <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
G <sub>1</sub>	4,8	4,8
G <sub>2</sub>	5,7	5,7
G <sub>3</sub>	6,6	6,4
G <sub>4</sub>	5,6	5,1
G <sub>5</sub>	5,6	5,8
G <sub>6</sub>	12,5	12,5
G <sub>7</sub>	4,7	4,3
G <sub>8</sub>	4,1	4,6

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA

causa da variação	GL	SQ	QM
grupo	7	98,54	14,077
tratamento	1	0,01	0,01
resíduo	7	0,36	0,05
total	15	98,9	6,594

Das condições de realização da análise dos grãos, temos como principal fonte de erro, o da própria balança utilizada. Sendo sua precisão de  $1/10^4$  g, e a quantidade de óleo a ser pesada de cerca de 50 mg, estimou-se que a variância, seja da ordem de 0,02.

Através de um teste de recuperação, determinou-se que a ordem de grandeza na variação da repetição de um mesmo dado, seja de 0,02.

Portanto, através da adição das variâncias assim avaliadas, temos em cada medida realizada pelo método Gold Fisher, uma variabilidade de cerca de 9%.

### 3.2 Programas de Seleção

O primeiro programa de seleção de sementes pela técnica de RMN, utilizou como material básico, sementes de um tipo de milho sintético dentado, denominado Maya, selecionado pelo Instituto Agrônomo de Campinas. Cem sementes foram analisadas, sendo cada duas delas pertencentes à mesma família. Os resultados obtidos estão apresentados no polígono já polido de frequência da figura 15, com seu histograma da distribuição no quadro 1 do anexo 3. Nesta figura, temos uma distribuição para as progenies  $F_1$ , com uma concentração média de óleo de 5,1% e desvio padrão de 0,85. Os pontos de truncamento foram inicialmente escolhidos como sendo 4% e para o limite inferior e 6,3% para o superior, dando uma intensidade de seleção de 10% para cada grupo.

As sementes foram plantadas em caixas de celulose e transferidas posteriormente para o campo, em seus respectivos grupos. O espaçamento utilizado correspondendo a uma população de 20.000 plantas/hectare, foi escolhido para permitir o aparecimento de 2 espigas por planta, possibilitando desta forma a aplicação dos dois tipos de seleção na mesma geração.

Parte do material selecionado, foi perdido em virtude de problemas de germinação e ataques de insetos de solo. Desta

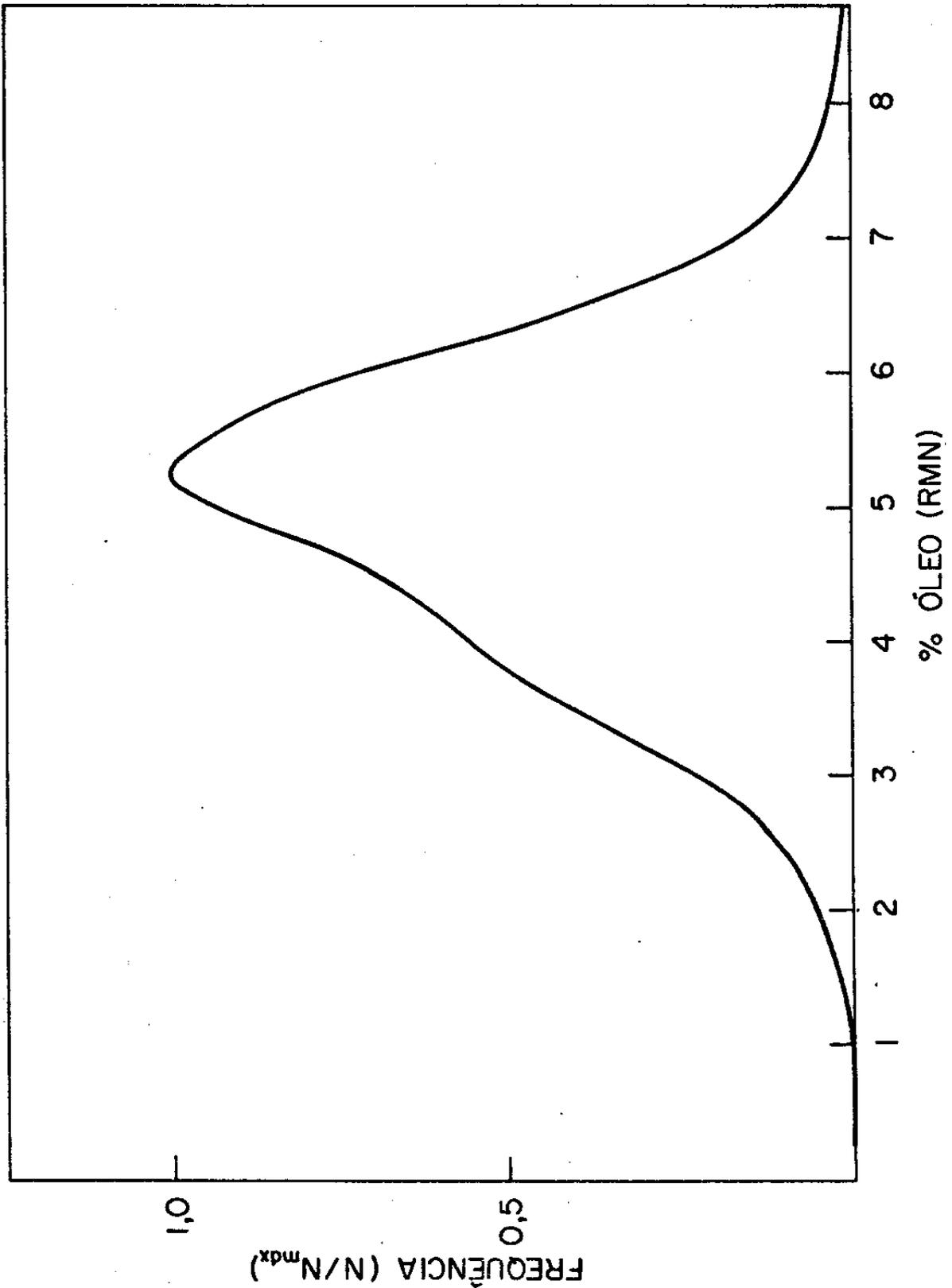


FIGURA 16 - CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, F<sub>2</sub>

forma, novas progênies foram selecionadas, as quais estão assinaladas no decorrer deste trabalho, pelas letras A e B para os grupos de Alto e Baixo teor de óleo, respectivamente.

Na espiga superior de cada planta selecionada, foi feita a autofecundação, enquanto que na inferior, o cruzamento pareado. As sementes não selecionadas foram plantadas num lote separado, deixando-as cruzarem naturalmente.

De cada espiga superior, foi retirada uma amostra de 10 sementes, totalizando cerca de 331 amostras, cujo polígono polido de frequência é mostrada na figura 16, onde o valor médio é de 5,1% e o desvio padrão  $s = 1,11$ . O histograma da distribuição, encontra-se no quadro 2 do anexo 3. Podemos notar que as médias das gerações  $F_1$  e  $F_2$  são similares enquanto que o desvio padrão de  $F_2$  é maior que o de  $F_1$ , em função da segregação genética.

Das espigas inferiores do material selecionado, foram analisados 5 grãos de cada cruzamento, como mostra a tabela 3.

Comparando-se os valores médios dos teores de óleo para  $F_1$  e  $F_2$ , tabela 4, podemos avaliar o ganho de seleção, dado por  $G = \bar{X}_{S_2} - \bar{X}_{F_1}$ , onde  $\bar{X}_{S_2}$  representa o valor médio das porcentagens de óleo das progênies  $F_2$  selecionadas e  $\bar{X}_{F_1}$  o valor médio das  $F_1$ , antes da seleção.

Para o grupo de alto teor, temos:

$$G = 5,6 - 5,1 = 0,5$$

que em termos da porcentagem da média da geração anterior, representa um ganho no aumento de 9,8%.

Analogamente para as sementes de baixo teor,

$$g = 3,9 - 5,1 = -1,2,$$

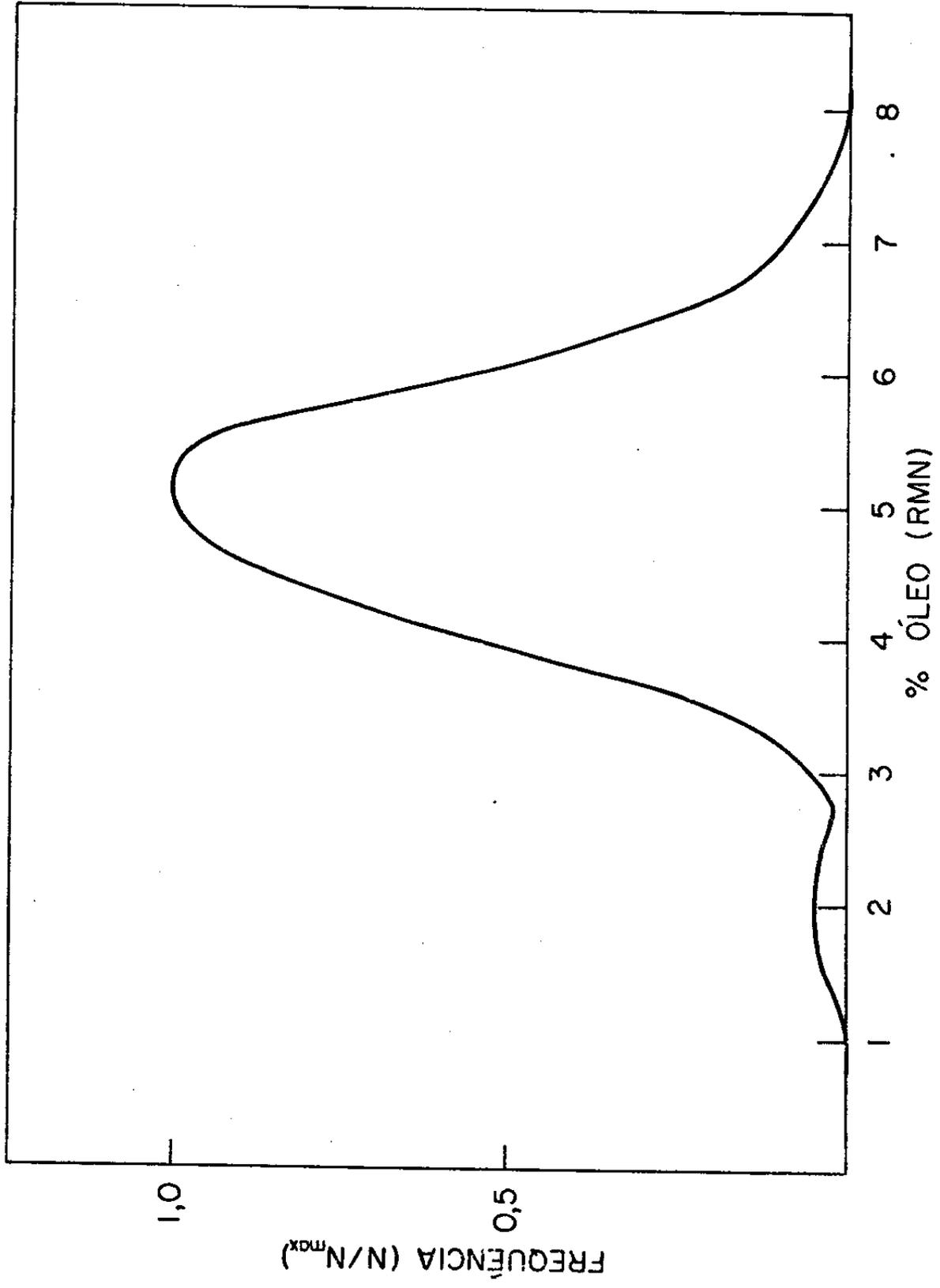


FIGURA 15 - CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUENCIA, F<sub>1</sub>

TABELA 3  
 Porcentagem de óleo de cruzamentos  $S_2$

cruzamento	% óleo pais	% óleo média descendentes
A 139a	6,1	
X		7,4
25b	5,1	
144a	5,3	
X		8,6
A 139a	6,1	
A 139a	6,1	
X		6,1
36b	5,2	
B 149a	4,8	
X		5,6
125b	4,7	
159a	5,5	
X		6,2
A 28a	5,8	
B 149a	4,8	
X		5,9
B 33a	3,3	
143a	3,7	
X		3,5
B 33b	3,6	

Estes dados já revelam uma tendência de progresso desse tipo de seleção.

Média das porcentagens de óleo de  $F_1$  e  $F_2$ 

grupos	% $F_1$	% $F_2$
A 2a	5,9	5,0
2b	5,4	5,2
8a	5,5	5,7
A 9a	5,8	4,7
11a	5,2	5,2
A 16b	5,8	6,2
21b	5,0	5,6
22a	4,8	5,8
23b	1,9	4,8
25b	6,4	5,1
27a	5,8	6,3
27b	5,5	4,8
A 28a	6,7	5,8
28b	5,2	5,8
30a	4,4	4,9
B 33a	3,3	3,3
B 33b	4,3	3,6
36b	6,1	5,2
38a	6,3	4,1
38b	5,8	7,8
40a	4,4	4,7
40b	4,6	5,8
B 43b	4,1	4,3
123a	5,9	4,3
126a	5,1	5,4
129a	4,9	3,6
129b	4,7	5,2
131a	5,6	5,9
131b	5,1	5,4
134a	5,7	3,9
136a	4,9	5,4
136b	4,5	5,0
B 137b	4,5	5,5
138b	5,4	5,8
A 139a	7,2	6,1
143a	3,7	3,7
144a	5,9	5,3
144b	5,8	5,1
A 146a	6,2	5,3
148a	5,6	6,2
148b	5,5	5,8
149a	5,7	4,8
B 149b	3,9	3,5
151a	5,5	6,1
151b	4,7	4,9
152a	5,3	5,1
152b	5,0	4,8
155b	6,0	5,4
157a	4,8	5,0
B 157b	4,4	3,1
B 158a	4,0	4,0
159a	6,8	5,5
A 159b	6,8	6,1

ou seja, um ganho na redução de 23,5%.

Outro fator importante a ser estimado, é o coeficiente de herdabilidade  $h^2$ , que nos dá uma idéia das contribuições relativas que os genes fazem à característica considerada.<sup>33</sup> O coeficiente  $h^2$ , definido pela proporção da variância genética aditiva pela variância fenotípica, nos dá uma idéia da magnitude dos efeitos genéticos em relação aos efeitos ambientais, indicando assim as possibilidades dos programas de seleção. Cumpre-se salientar que, em linhas endogâmicas, esse coeficiente de herdabilidade deva tender a zero, visto sua direta dependência na variabilidade genética.<sup>34</sup> Assim, a estimativa deste, para seleção de linhagens puras só terá certo valor, para as primeiras gerações, onde persiste ainda alguma heterozigose.

Quando temos como variáveis as médias dos fenótipos dos pais e o fenótipo dos descendentes,  $h^2$  fica dado pelo coeficiente de regressão<sup>35</sup>

$$b = \frac{\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i / n}{\sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2 / n}, \text{ onde } x \text{ são os dados obtidos}$$

em  $F_1$  e  $y$  os em  $F_2$ .

O valor encontrado para  $b$  foi 0,42, ou seja 42%, que é considerado suficiente para progressos de seleção.

Das 14 progênies selecionadas, 12 foram utilizadas para uma terceira seleção. Dez sementes de cada uma das 5 famílias dessas progênies foram analisadas, totalizando um número de 430 amostras (tabela 5), e o ganho de seleção obtido em relação a  $F_2$  foi de 16% para o grupo de alto e 20% para os de baixo teor de óleo.

TABELA 5

Média das porcentagens de óleo de S<sub>3</sub>

grupos	% óleo
A 2a	5,8
A 16b	5,8
A 28a	5,8
A 139a	5,7
A 146a	6,4
A 159b	5,5
B 33a	4,3
B 33b	3,9
B 43b	3,8
B 149b	4,0
B 157b	4,1
B 158a	4,1

## CAPÍTULO 4

### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A RMN foi utilizada neste estudo, para a determinação da concentração de ácidos graxos em sementes de milho.

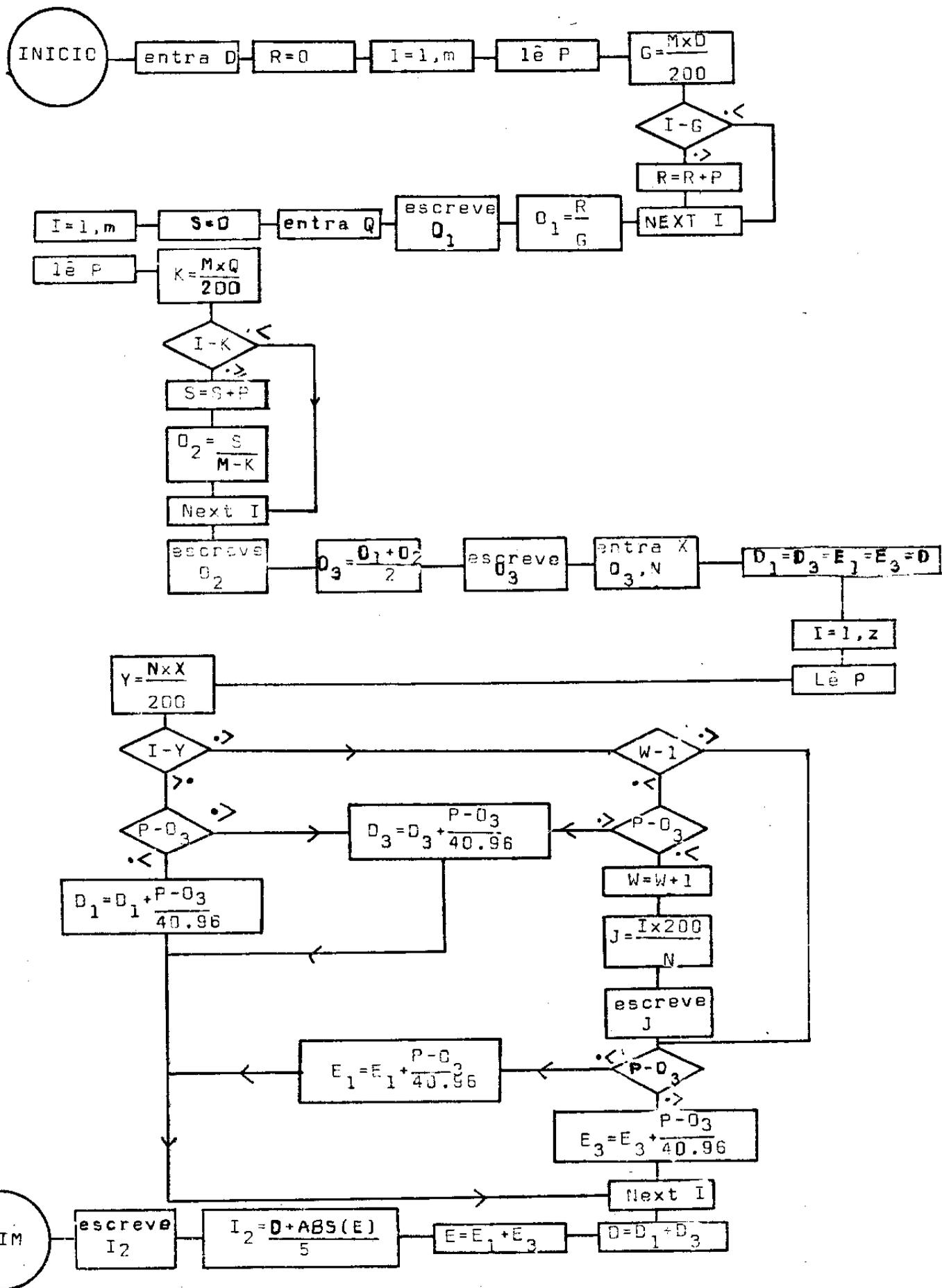
Esta técnica permite análises de caráter não destrutivo, assim como fornece medidas quantitativas individuais de relativa rapidez (15 minutos). Em contraste com o método químico tradicional, que destrói o material analisado, englobando cerca de 5 amostras em cada medida que dura em média 6 horas, temos condições de realizar seleções mais eficientes num menor espaço de tempo. Temos uma alta correlação entre os dois métodos ( $r=0,997$ ), e os mesmos possuem a mesma ordem de grandeza no erro de suas análises.

Através dos ganhos genéticos obtidos, tanto para os grupos de alto teor de óleo, como para os de baixo teor, temos uma confirmação da capacidade do método alternativo proposto neste trabalho, para a aplicação em programas de seleção e melhoramento.

Foram formadas linhagens quasi-hisogênicas para alta e baixa concentração de ácidos graxos, que poderão ser utilizadas para a síntese de híbridos. Os sintéticos obtidos para esses grupos, poderão ser usados diretamente para a produção em campos de cultura, ou para a obtenção de linhagens puras com o intuito de produzir híbridos de maior produtividade por unidade de área.

ANEXO 1

PROGRAMA AREA



D-divisões esquerda, Q-divisões direita,  $D_3$  - linha de base, X-metade do sinal, N-nº de pontos, j-metade do sinal,  $I_2$ -área

REM

LIST

```

2 LET S= 0
10 ASSIGN "DATA"=1, "PLST"=2
11 OPEN 1, 1, 2
12 OPEN 2, 0
13 PRINT "DIV. ESQ.="
14 INPUT D
15 DIM P(5)
17 FOR I= 1 TO 5
18 GET 1, P(I)
19 NEXT I
20 FOR I= 6 TO 2
21 GET 1, P
22 PUT 2, P
23 NEXT I
24 CLOSE 1
25 CLOSE 2
26 LET P= 0
27 OPEN 2, 1, 2
28 FOR I= 1 TO N
29 GET 2, P
31 LET S=(S+P)/ 200
32 IF I>0 THEN 25
33 LET P=P+P
34 NEXT I
35 LET S1=S/P
36 PRINT "BAS. ESQ.="; S1
37 CLOSE 2
38 PRINT "DIV. DIR.="
39 INPUT Q
40 OPEN 2, 1, 2
41 FOR I= 1 TO N
42 GET 2, P
44 LET K=(S+Q)/ 200
44 IF I<K THEN 40
45 LET S=S+P
46 NEXT I
47 LET S2=S/(N-K)
48 PRINT "BAS. DIREITO="; S2
49 LET S3=(S1+S2)/ 2
50 PRINT "BASELINE="; S3
51 PRINT "NUMERO DE PONTOS"
52 INPUT N
61 ASSIGN "PLST"=2
70 PRINT "METADA DO SINAL"
80 INPUT X
82 PRINT "BASELINE="
83 INPUT S0
90 LET D1= 0
110 LET D3= 0
130 LET D1= 0
150 LET D3= 0
161 OPEN 1, 1, 2
162 LET N= 0
170 FOR I= 1 TO N
180 GET 2, P
181 LET Y=(N/ 200)*K
190 IF I>Y THEN 265
200 IF (P-S3)> 0 THEN 240
210 LET D1=((P-S3)/ 40.96)+D1
230 GOTO 240

```

LIST 240

```

240 LET D3=((P-93)/ 40.96)+D3
260 GOTO 340
265 IF W>= 1 THEN 270
266 IF (P-93)> 0 THEN 240
267 LET W=W+ 1
268 LET J=(1*-200)/W
269 PRINT "MAYBE SIGNAL=";J
270 IF (P-93)> 0 THEN 320
280 LET E1=((P-93)/ 40.96)+E1
300 GOTO 340
320 LET E3=((P-93)/ 40.96)+E3
340 NEXT I
350 LET E=E1+E3
360 LET E=E1+E3
370 LET I1=(ANS(D)+ANS(E))/ 5
380 PRINT "SEGUNDA INTEGRAL =" ;I1
391 GOSUB 2
393 CALL CRT
394 END
CALL CRT

```

SAVE "AREA"

ANEXO 2TESTE DE GERMINAÇÃO

Para o teste de germinação, foram utilizadas 50 sementes por amostra. A germinação foi feita em placas de Petri com papel filtro úmido, em câmaras à temperatura de 25°C. Em cada placa foi posto um número de 25 sementes.

Foram realizados testes a 40°C, 70°C e 100°C, onde temos inicialmente uma tabela da perda da umidade em relação ao peso da amostra com o decorrer do tempo, e uma contagem de germinação após 48 horas nas placas de Petri.

40°C

tempo (horas)	0	4	8	24	48	72	96
% peso	0	2,1	3,0	4,4	5,4	5,7	5,9
tempo	0	4	8	24	48	72	96
nº inicial de sementes	50	50	50	50	50	50	50
nº sementes germinadas	50	50	50	48	49	50	49
%	100	100	100	96	98	100	98

70°C

tempo (horas)	0	1	2	4	8	24	48
% peso	0	3,4	4,3	5,9	7,3	9,3	10,6

tempo	0	1	2	4	8	24	48
n° inicial sementes	50	50	50	50	50	50	50
n° sementes germinadas	50	0	0	0	0	0	0
%	100	0	0	0	0	0	0

100°C

tempo (horas)	24
% peso	10,6

Nenhuma semente germinou.

ANEXO 3QUADRO 1S<sub>1</sub> - 99 famílias

classes	frequência	freq. modificada normalizada
0,05-0,5	0	0,0
0,5-1,0	0	0,0
1,0-1,5	0	0,01
1,5-2,0	1	0,04
2,0-1,5	1	0,04
2,5-3,0	0	0,02
3,0-3,5	1	0,11
3,5-4,0	7	0,38
4,0-4,5	17	0,73
4,5-5,0	21	0,95
5,0-5,5	22	1,00
5,5-6,0	20	0,76
6,0-6,5	5	0,39
6,5-7,0	3	0,14
7,0-7,5	1	0,06
7,5-8,0	0	0,01
8,0-8,5	0	0,0
8,5-9,0	0	0,0

Para polímero aritmético da curva de frequência: <sup>36</sup>

Freq. modificada = (freq. interior + 2 freq. + freq. anterior)/4

1<sup>a</sup> freq. modificada = (freq. posterior + 3 freq.)/4

Última freq. mod. = (freq. anterior + 3 freq.)/4

QUADRO 2S<sub>2</sub> - 331 famílias

classes	frequência	freq. modificada normalizada
0,0-0,5	0	0,0
0,5-1,0	0	0,0
1,0-1,5	0	0,004
1,5-2,0	1	0,03
2,0-2,5	5	0,07
2,5-3,0	6	0,15
3,0-3,5	20	0,32
3,5-4,0	35	0,49
4,0-4,5	32	0,59
4,5-5,0	49	0,81
5,0-5,5	73	1,00
5,5-6,0	55	0,86
6,0-6,5	33	0,54
6,5-7,0	14	0,26
7,0-7,5	4	0,10
7,5-8,0	2	0,04
8,0-8,5	1	0,02
8,5-9,0	1	0,02

REFERÊNCIAS

- 1 - W.J. Silva  
XX Reunião da SBPC - Recife
- 2 - D.E. Alexander, Dudley, Creech  
Corn: Culture, Processing, Products - cap. 2
- 3 - Zupancic et al  
Acta Chem. Scand. 21, n<sup>o</sup> 6, 1664 (1967)
- 4 - T.F. Conway e L.F. Johnson  
Science, 164, 127 (1969)
- 5 - D.E. Alexander, L. Silvela, F.I. Collins, R.C. Rodgers  
J.A.O.C.S. 44, n<sup>o</sup> 10, 555 (1967)
- 6 - P.N. Tiwari, P.N. Gambhir and T.S. Rajan  
J.A.O.C.S. 51, n<sup>o</sup> 3 (1974)
- 7 - T.F. Conway and F.R. Earle  
J.A.O.C.S. 40, 265 (1963)
- 8 - F.I. Collins, D.E. Alexander, R.C. Rodgers and L. Silvela  
J.A.O.C.S. 44, 708 (1967)
- 9 - L.O. Anderson  
J.A.O.C.S. 48, 47 (1971)
- 10 - E.M. Purcell, H.C. Torrey and R.V. Pound  
Phys. Rev. 69, 37 (1946)
- 11 - F. Bloch, W.W. Hansen and M. Packard  
Phys. Rev. 69, 127 (1946)
- 12 - A. Abragam  
The principles of Nuclear Magnetism (1973)
- 13 - Alan Carrington and Andrew D. McLachlan  
Introduction to Magnetic Resonance (1969)
- 14 - C.P. Slichter  
Principles of Magnetic Resonance (1965)

- 15 - George F. Sprague  
Corn and Corn Improvement (1955)
- 16 - E.S. Barghoorn, M.K. Wolfe, K.H. Chosky  
Bot. Museum Leaflets Harvard Univ. 16, 229 (1954)
- 17 - Mario Guimarães Ferri  
Morfologia externa das plantas (1967)
- 18 - Fundação Cargill  
Produção, melhoramento do milho no Brasil (1978)
- 19 - J.W. Purseglove  
Tropical crops monocotyledons
- 20 - Earle, F.R. Curtii, J.E. Hubbard  
Cereal Chem. 23, 504 (1946)
- 21 - W.J. da Silva  
XX Reunião da SBPC - Recife
- 22 - J.B. Beadle, D.E. Just, R.F. Morgan and R.A. Reiners  
J.A.O.C.S. 42, fev. (1965)
- 23 - D.E. Alexander  
Illinois Corn Breeders' School, march 12, (1970)
- 24 - M.D. Jellum  
Cereal Chemistry, 47, n<sup>o</sup> 5, sept (1970)
- 25 - T.F. Conway and L.F. Johnson  
Science, 164, 827 may (1969)
- 26 - C.G. Poneleit and D.E. Alexander  
Science 147, n<sup>o</sup> 3665, 1585 (1965)
- 27 - D.E. Alexander and R.J. Jambert  
Crop Science 8, 272 (1968)
- 28 - Allard  
Principles of Plant Breeding (1960)
- 29 - E.A. Graner  
Elementos de Genética (1965)

- 30 - F.H. Hull  
Journal Amer. Soc. Agron. 37, 134 (1945)
- 31 - T.F. Conway  
J.A.D.C.S. 41, 54 (1971)
- 32 - Estatística Experimental  
Frederico Pimentel Gomes
- 33 - W. Stanford  
Genética - Coleção Schaum
- 34 - Brewbaker, James L.  
Genética na Agricultura (1969)
- 35 - D.S. Falconer  
Introduction to Quantitative Genetics (1960)
- 36 - Almeida Garrett  
Estatística Elementar