

TAMANHO EFETIVO POPULACIONAL NA COLETA E PRESERVAÇÃO DE GERMOPLASMAS DE ESPÉCIES ALÓGAMAS

ROLAND VENCOVSKY

ESALQ-USP, Departamento de Genética
13400 - Piracicaba - SP

ABSTRACT - The measure of the variance effective population size, N_e , was adapted to specific aspects of collecting and preserving germoplasms of panmitic species. Appropriate expressions of N were derived for these steps and examples given for illustration. The following main conclusion could be drawn. It is evident that, in compounding a sample, in any circumstance, one should collect seeds from the largest possible number of parental plants, taken at random. The control on the number of female gametes which consists in taking an equal number of seeds per plant was emphasized. In field collections, it could be shown that through this technique, the highest effective number attainable is $4F$, F being the number of parental plants. in the process of maintaining samples of germplasm banks, in isolated plots and open pollination, on the other and, the highest effective number attainable through female gametic control is $1.33n$, n being the number of seeds of the sample. This technique, therefore, reduces the possibility of eventual losses of alleles due to drift. The effect of partial reduction of the viability of seeds in samples, during preservation, was also investigated. It was shown how this reduction can affect the initial genetic representativeness of a sample and that the consequent genetic erosion can, in many circumstances, be irreversible. Considerations were made about the ideal effective size of a sample, necessary to permit, with high confidence, the maintenance of alleles with frequency as low as 0.01, in the original population.

RESUMO - O conceito do tamanho efetivo populacional, como medida da representatividade genética, foi adaptado às atividades de coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas. Foram deduzidas as expressões do tamanho (N_e), próprias para essas etapas e apresentados exemplos de sua aplicação. Ficou evidenciado que, ao se compor uma amostra de sementes, em quaisquer das etapas, deve-se procurar colhê-las de um maior número possível de plantas genitoras, tomadas ao acaso. Enfatizou-se a técnica do controle gamético feminino, que consiste em se colher número igual, ou aproximadamente igual, de sementes de cada planta. Mostrou-se que, com tal técnica em coletas a campo, o tamanho efetivo máximo atingível é de $4F$, sendo F o número de plantas genitoras. Na manutenção de amostras, de bancos de germoplasma, em lotes isolados com polinização manual, a referida técnica permite atingir tamanho efetivo de $1,33n$, em que n é o número de sementes da amostra. A perda de alelos, por deriva genética, será pois, diminuída por meio desse procedimento de controle gamético. Investigou-se o efeito da perda parcial da viabilidade em amostras, na fase de sua preservação. Mostrou-se o modo como tais perdas podem comprometer a representatividade da amostra inicial, propiciando erosão genética, muitas vezes irreversível. Discorreu-se sobre o tamanho efetivo ideal de amostras, para permitir, com alta margem de confiança, a retenção de alelos cuja frequência é de até 0,01, na população original.

INTRODUÇÃO

O fenômeno da erosão das reservas de genes vem recebendo a atenção de especialistas já há algumas décadas. Segundo HAWKES (1981) foi a partir da década de 50, no entanto, que se começou a reconhecer a rápida deterioração de muitas dessas reservas. Vários autores como FRANKEL (1977), FRANKEL & BENNETT (1970), HARLAN (1970), BENNETT (1970), FRANKEL (1970) e BLIXT (1970), entre outros, expressam o mesmo ponto de vista. É verdade que essa perda de genes está ocorrendo com diferentes intensidades, conforme a espécie. Em vários casos, todavia, a situação atual parece ser já bastante crítica.

As diversas causas da gradual delapidação da variabilidade genética são apresentadas pelos autores, havendo consenso ser a própria atividade humana, o crescente desenvolvimento tecnológico ou a exploração agropecuária irracional, os principais responsáveis por esse fenômeno. Menciona-se mesmo a perda de genes que, em maior ou menor grau, vem ocorrendo ao nível dos próprios bancos de germoplasma. Reconhece-se, igualmente com unanimidade, a grande necessidade de se envidar todos os esforços para preservar a variabilidade ainda disponível, através de coletas constantes e da adequada preservação das amostras assim colhidas. Trata-se, conforme enfatizado por FRANKEL (1977), de preservar não apenas alelos, para uso imediato ou futuro, mas também de manter complexos gênicos na sua integridade. Esses, é sabido, podem ter grande importância em programas de melhoramento em que o objetivo é desenvolver genótipos com capacidade de adaptação a condições extremas ou atípicas, para a espécie.

Nesse contexto, o Brasil, evidentemente, não é exceção; os mesmos riscos existem. O que resta inquirir, é se as atividades de coleta e preservação estão conseguindo compensar a velocidade das perdas de genes em condições naturais.

Do ponto de vista da Genética de Populações, a erosão genética e as medidas de combate para minimizar seus efeitos, podem ser enfocados sob a ótica do tamanho efetivo populacional. Esse conceito, introduzido por Sewall Wright, há mais de 50 anos, relaciona-se intimamente com a questão da representatividade genética de amostras de plantas de sementes. Neste trabalho, portanto, são expostos resultados de derivações feitas para adaptar o conceito de tamanho efetivo às etapas básicas da preservação de germoplasma, quais sejam, a coleta de amostras e sua preservação. Discorre-se, também, sobre as técnicas que podem ser adotadas para incrementar a representatividade genética das amostras e para minimizar as eventuais perdas de alelos no processo de sua conservação.

MÉTODOS

Neste trabalho aplicou-se a expressão básica do tamanho efetivo populacional, N_e , desenvolvida por CROW & KIMURA (1970) para espécies monóicas ou hermafroditas e que é própria para mensurar os efeitos do tamanho finito das amostras sobre a oscilação ou deriva genética, ou seja:

$$N_e = \frac{2n}{\frac{s_k^2}{k}(1 + \alpha) + (1 - \alpha)}$$

em que:

n é o número de zigotos ou indivíduos amostrados, como sementes, por exemplo.

é uma medida do desvio da condição de panmixia, predominante nas plantas genitoras dos indivíduos amostrados. Em populações amplas, conforme mostram CROW e KIMURA (1970), tem-se que $\alpha = 0$, para espécies alógamas.

k é o número médio de gametas contribuídos pelas plantas genitoras, para gerar os n indivíduos descendentes. Sendo N o conjunto de todas as plantas genitoras, tem-se que $k = (2n)/N$. Em condições naturais ou de coleta de campo N é desconhecido e certamente muito grande. Tal fato implica em certas considerações e restrições, conforme será visto a seguir. Em se tratando de conservação de sementes, em bancos de germoplasma, por sua vez, o número de indivíduos é conhecido. No caso particular de se manter, por exemplo, um número constante de sementes, de uma geração para outra, tem-se que $N = n$ e $k = 2$, já que N é o número de plantas genitoras, da geração imediatamente anterior.

s_k^2 é a variância do número de gametas contribuídos pelas plantas genitoras. A composição dessa variância é mostrada, com detalhes por VENCOVSKY (1978). Dentre os parâmetros que a compõem é preciso destacar os seguintes:

F: o número de plantas genitoras amostradas ou tomadas de modo aleatório, das quais são coletados os n descendentes. No caso de coleta de sementes F é, portanto, o número de plantas mãe das quais as sementes são colhidas;

M: o número de plantas polinizadoras, cujos gametas masculinos participaram na geração dos n indivíduos. Em condições de campo, sendo a espécie alógama M é desconhecida. Nestas condições, considerou-se que tal número é suficientemente grande para se desprezar expressões do tipo $1/M$ e afins. Na regeneração de sementes de plantas alogamas, em lotes isolados, por outro lado, considerou-se que $M = F$.

Como componentes dessa variância é necessário considerar, também, as quantidades $u = F/N$ e $v = M/N$. Pelas razões expostas, estas foram consideradas semelhantes a zero em condições de coleta a campo. Em outras palavras, considerou-se que as plantas responsáveis pela geração das n sementes, por exemplo, constituem uma fração muito pequena do conjunto todo de plantas da espécie.

Em se tratando, no entanto, da regeneração de sementes de amostras, para a preservação do germoplasma em bancos, a situação é diversa pois, nesta situação o número de plantas é conhecido, conforme já enfatizado. Pode-se ter, por exemplo, o caso em que as n sementes da amostra são semeadas e, após reprodução sexuada, uma nova amostra de n sementes é tomada. Nesta circunstância $N = n$ é também $M = F = n$, resultando $u = v = 1$. Alternativamente, pode-se supor a situação de queda do poder germinativo de modo que só uma fração da amostra é viável. Se essa fração for f , apenas nf plantas estarão disponíveis para reproduzir a nova amostra de n sementes. Agora, resulta que $F = M = nf$ e $u = v = f$, já que a amostra original tinha $N = n$ indivíduos viáveis.

Como o tamanho efetivo, na sua definição básica, mede a representatividade genética contida numa amostra em relação à geração imediatamente anterior, utilizou-se também o conceito mais amplo do tamanho efetivo médio, N_e , para abranger uma sequência de gerações. Esse valor, conforme CROW & KIMURA (1970), vem a ser a média harmônica dos tamanhos efetivos das diferentes gerações. O parâmetro foi aqui considerado para avaliar e esclarecer as conseqüências genéticas de eventuais perdas parciais de amostras, nos bancos de germoplasma. Assim, supôs-se uma seqüência de g

gerações, em que uma amostra é sempre regenerada, por via sexuada. Considerou-se, também, que um tamanho efetivo N_e é mantido constante durante $g-c$ gerações que em C gerações houve perda involuntária de material, resultando um tamanho menor e igual a fN_e , com $0 < f < 1$.

As expressões do tamanho efetivo populacional, desenvolvidas neste trabalho, referem-se, pois, as duas situações, a saber: a) às pertinentes à coleta de material em condições de campo e b) às relativas à preservação de amostras em bancos de germoplasma, com regeneração por via sexuada. Para o primeiro caso (a) as expressões dizem respeito à representatividade de populações locais, ou demes, segundo conceito exposto por METTLER & GREGG (1969). Algebricamente, as expressões adequadas para o item (b) são casos particulares das obtidas para o item (a).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, com a respectiva discussão, estão subdivididos em dois itens gerais, conforme segue.

1. Coleta de amostras de germoplasma

a. Sem controle gamético

Neste caso,

$$N_e = \frac{n}{\frac{1}{4} \left[\frac{n(1-u)-1}{F} + \frac{3n(1-v)-1}{M} \right] + 1} \quad (1)$$

Com $u = v = 0$ e M suficientemente grande,

$$N_e = \frac{n}{\frac{n-1}{4F} + 1} \quad (2)$$

Considera-se aqui, não ter havido controle sobre o número de gametas contribuído pelas genitoras. Isso significa que os n descendentes ou sementes foram tomados, ao acaso, das F plantas. Para exemplificar, considere-se que $n = 100$ sementes foram colhidas de $F = 20$ plantas. Resulta, assim, que $N_e = 45$, pela expressão (2). Desse modo, as 100 sementes correspondem à 45 plantas da população original, em termos de representatividade genética.

b. Com controle dos gametas femininos.

Agora,

$$N_e = \frac{n}{\frac{1}{4} \left[\frac{n(1-u)}{F} + \frac{3n(1-v)}{M} \right] + \frac{3}{4}} \quad (3)$$

Novamente, considerando-se $u = v = 0$ e M suficientemente grande,

$$N_e = \frac{n}{\frac{n}{4F} + \frac{3}{4}} \quad (4)$$

Nesta situação, com controle gamético, supõe-se que um número igual de sementes é colhido de cada uma das F plantas. Tomando-se, outra vez, $n=100$ e $F=20$ e, portanto, 5 sementes por planta, tem-se $N_e=50$. Resulta, pois, um tamanho efetivo maior, para o mesmo número de sementes, já que todas as plantas contribuíram com número igual de gametas femininos. Não houve o risco de umas contribuírem com mais ou menos sementes, como ocorre quando estas são tomadas ao acaso, conforme suposto no item anterior. Essa técnica, em resumo, reduz o efeito da deriva genética ou, em termos quantitativos, reduz a variância sk^2 da expressão básica de N_e , aumentando assim o tamanho efetivo.

Convém ressaltar, portanto, que na coleta de amostras o que se deve tomar ao acaso são as F plantas da população e não as sementes colhidas dessas.

A Tabela 1 apresenta os tamanhos efetivos correspondentes a uma amostra de 100 sementes, de espécies alógamas, colhida de diferentes maneiras.

Tabela 1 - Tamanhos efetivos (N_e) inerentes a amostras de $n=100$ sementes colhidas de F plantas, em espécie alógama, sem (S) ou com (C) controle gamético feminino.

F	5	10	20	40	50	60	80	100	200	500	N_e
(S)	17	29	45	62	67	71	76	80	89	95	$\frac{n}{\frac{n-1}{4F} + 1}$
(C)	17	31	50	..	80	100	$\frac{n}{\frac{n}{4F} + \frac{3}{4}}$

Observando-se a Tabela 1, entende-se, de início, ser fundamental tomar as sementes de um maior número possível de plantas e, de preferência, em quantidade igual, de cada uma.

Certas situações na literatura, parecem ser um tanto vagas, no que tange a coleta de amostras. HAWKES (1981), por exemplo, menciona que o ideal seria amostrar de 50 a 100 plantas de uma população local, coletando-se por volta de 50 sementes, por planta. Considerando-se o número inferior ou seja $F=50$ e $n=2.500$, obtém-se $N_e=185$, supondo-se espécie alógama, sem controle gamético. No outro extremo, ou seja, com 5.000 sementes colhidas de 100 plantas, chega-se a $N_e=370$. No entanto, mantendo-se a amostra menor de $n=2.500$ sementes, mas colhidas de $F=100$ plantas, resulta $N_e=345$. Se essas mesmas 2.500 sementes forem colhidas de $F=150$ plantas, obtém-se $N_e=484$. Portanto, pelos exemplos mostrados, 2.500 sementes colhidas de 150 plantas tem representatividade genética consideravelmente maior do que 5.000 sementes colhidas de 100 plantas. Para expor um caso mais extremo, basta dizer que, em alógamas, um grande número de sementes, centenas que sejam, tomadas de uma única planta, não valem mais do que quatro sementes colhidas de quatro plantas.

Em resumo, o exposto tem por finalidade realçar que certas estratégias de amostragem podem resultar num ganho de representatividade. Cabe ao técnico decidir, no momento da coleta, se elas são factíveis, em função do tempo que tem disponível, da magnitude de sua tarefa e do rigor que ele pode adotar na amostragem.

2. Preservação de amostras em bancos de germoplasma

Na preservação de amostras de germoplasmas, a questão de se manter a representatividade genética, ou de se cuidar do tamanho efetivo, é igualmente importante. Algumas situações podem ser imaginadas, como segue.

Num primeiro caso, suponha-se não ter havido perda de viabilidade, ou perda de poder germinativo, no conjunto de n indivíduos da amostra. Em se tratando de sementes, suponha-se ademais que, após sua semeadura, resultem n plantas, das quais uma nova amostra de n sementes é tomada.

Em tal situação o tamanho efetivo dependerá, novamente, do processo de amostragem. Assim, com cruzamentos ao acaso das n plantas e subsequente amostragem aleatória das novas n sementes, o tamanho efetivo será $N_e=n$. Se, por outro lado, um número igual de sementes for colhido de cada planta, no lote isolado, as mesmas n sementes terão representatividade maior. De fato, o tamanho efetivo a elas inerente será $N_e=1,33n$. Trata-se, pois, de uma técnica tal que 100 sementes, por exemplo, tomadas desse modo, realmente representam tanto quanto 133 sementes tomadas ao acaso.

Vale enfatizar que as expressões aplicáveis para medir o tamanho efetivo, no processo de preservação, são casos particulares das expressões (1) e (3), do item anterior. Não havendo perda de viabilidade $u=v=1$, e considerando-se desprezíveis quantidades do tipo $1/F$ e $1/M$, obtêm-se os valores de N_e iguais a n e $1,33n$, mencionados.

Admita-se, agora, ter havido perda de viabilidade e que, por exemplo, somente $1/3$ das sementes, do conjunto n , germinaram. Nestas condições $u=v=1/3$, $F=M=(1/3)n$. Pela expressão (1) uma nova amostra de n sementes colhida terá tamanho efetivo suficientemente grande. Assim, mesmo mantendo-se o tamanho n da nova amostra, houve redução no tamanho efetivo, em consequência da perda de viabilidade ocorrida na amostra anterior.

$$N_e = \frac{n}{3 - \frac{3}{2n}} = \frac{n}{3}, \text{ para } n$$

3. Estrangulamento na preservação de germoplasmas

Esse fenômeno já é bastante conhecido, significando a perda irreversível de genes, quando ocorre uma redução na viabilidade dos indivíduos na amostra, por má conservação por exemplo, com conseqüente morte de uma parte deles.

Quando, no processo de preservação, o plano é manter um tamanho amostral constante, por exemplo tal que $N_e=n$, mas por causas fortuitas, há uma perda de viabilidade tal que por c gerações apenas fn sementes permanecem viáveis, o tamanho efetivo médio, sobre g gerações, é dado por

$$N_e = \frac{ng}{g + c \left(\frac{1-f}{f} \right)} \quad (5)$$

A tabela 2 mostra valores de N_e , para diferentes valores de f e g , na suposição de que houve perda de material em uma geração apenas ($c=1$) e que o tamanho efetivo foi de $N_e = 100$ antes da perda.

Tabela 2 - Tamanhos efetivos médios, N_e , relativos à preservação de amostras com $n=100$ sementes, durante g gerações de reprodução sexuada, em que houve perda de viabilidade na proporção $1-f$, em uma única geração ($c = 1$)

g	Perda = 1-f			
	0,99	0,90	0,80	0,50
2	2,0	18,2	33,3	66,7
4	3,9	30,8	50,0	80,0
6	5,7	40,0	60,0	85,7
8	7,5	47,0	66,7	88,9
10	9,2	52,6	71,4	90,9

$$N_e = \frac{ng}{g \frac{1-f}{f}}$$

Observa-se, na Tabela 2, a impossibilidade de recuperação do tamanho efetivo inicial, planejado, quando as perdas forem de 50%, ou mais. É óbvio que o estrangulamento, ou a redução na representatividade genética da amostra, aumentou à medida que as perdas de material são maiores. Assim, se durante 5 gerações se manteve um valor $N_e=100$ e em uma única geração perdeu-se 80% do material, $N_e=40$. Isso corresponde a dizer que, no conjunto das 6 gerações, nesse caso, as 100 sementes mantidas correspondem a manter-se uma amostra constante de apenas 40 sementes, ao longo das gerações.

Uma maneira de compensar perdas desse tipo é aumentar-se o tamanho da amostra, logo após sua ocorrência. Essa estratégia, porém, tem limitações e somente em certas circunstâncias, com perdas não pronunciadas, é que se pode recuperar o tamanho efetivo inicial. HALLAUER & MIRANDA FILHO (1981), apresentam essa questão, dando exemplo de uma seqüência de tamanhos efetivos 100, 100, 60 e 300 de uma dada amostra de sementes. O tamanho efetivo médio, que é a média harmônica dos valores, no caso é $r_i=100$. A perda de 40% do material na terceira geração pode ser compensada na quarta. Se tiver uma perda de 80%, resultando tamanhos efetivos de 100, 100 e 20, por sua vez, não há aumento do tamanho amostral na quarta geração que compense tal perda. Nesse caso, pois, ocorreu estrangulamento ou perda irreversível de alelos. Esses mesmos autores demonstraram ser possível recuperar o tamanho efetivo de amostras apenas quando as perdas de viabilidade foram inferiores a 50% do material, numa única geração. Com perdas em maior número de gerações a recuperação fica ainda mais difícil.

4. Considerações Gerais

São pertinentes algumas considerações gerais sobre o assunto conforme segue.

a. Já foi mencionado que o conceito de tamanho efetivo adotado nesse trabalho é o que tradicionalmente se encontram na literatura, tendo sido feitas adaptações para os casos de coleta e preservação de amostras. As expressões obtidas referem-se à representatividade

genética de populações locais, no caso de coletas acampo. Não foi considerada, portanto, a questão da representatividade da espécie como um todo. Para se conseguir medida de representatividade assim ampla, seria necessária incluir, nas deduções, a variação das frequências alélicas existente entre as populações locais ou demes. Isso seria factível teoricamente, mas requereria um conhecimento prévio detalhado da estrutura genética da espécie em seu habitat. Tendo em vista as dificuldades práticas que tal conhecimento exigiria, procurou-se adequar esta pesquisa ao estágio em que atualmente se encontram os esforços de coleta de germoplasma em nossas condições.

b. Uma questão comumente levantada é a que diz respeito ao tamanho efetivo ideal que se deve procurar atingir e manter. Não se tem, aí, uma resposta única a dar pois tudo dependerá do rigor com que se quer, ou se pode, trabalhar.

Uma maneira de se visualizar essa questão é através do intervalo de confiança associado às frequências alélicas, no processo de amostragem. Esse intervalo é função do desvio-padrão das frequências dos alelos nas amostras e que tem o valor $\pi_p = [p(1-p)/(2N_e)]^{1/2}$, quando p é a frequência alélica na geração parental.

Pela tabela de intervalos de confiança para proporções, dada por STEEL & TORRIE (1960), nota-se que, com $P=0,05$ e $2N_e=150$, 95% das amostras terão frequências alélicas entre os limites 0,0211 e 0,0981 e 99% delas estarão entre 0,0156 e 0,1150. Esse valor de $N_e=75$, garante, pois, com boa margem de segurança, que as frequências alélicas amostrais não alcançarão o valor zero, o que significaria a perda desse alelo.

Para se obter maior rigor, pode-se pensar em alelos com frequência mais baixa, com $P=0,01$, por exemplo. Nesse caso, seria necessário alcançar $2N_e=300$ ou mesmo $2N_e=500$, para garantir a segurança mencionada. De qualquer modo, tamanhos efetivos na casa das centenas já produzem segurança razoável contra a perda de alelos por efeito da deriva genética, num dado loco.

É preciso lembrar, ainda, que a deriva tem efeito cumulativo, no sentido de que o desvio padrão das frequências alélicas vai crescendo com o decorrer das gerações (FALCONER, 1964). Porém, com $2N_e$ na casa das centenas, tem-se uma proteção segura contra tal efeito. Na preservação de variedades geneticamente heterogêneas por exemplo, manter um valor de N_e da ordem de 1.000, dá uma segurança considerável.

Além disso, a questão de coletar e preservar germosplasmas não pode ser vista apenas sob a ótica de alelos individuais. Conjuntos ou blocos gênicos também tem grande importância para o melhoramento. Por isso, manter tamanhos efetivos maiores, dentro das possibilidades, não deixa de ser estratégia saudável.

c. Tanto na coleta como na preservação de amostras, é fundamental que se procure sempre reunir descendentes, como sementes, de um maior número possível de plantas genitoras e de preferência em número igual, ou aproximadamente igual, de cada uma. O que se deve tomar aleatoriamente é o conjunto de plantas genitoras e não o das sementes dessas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BENNETT, E. Adaptation of wild and cultivated plant populations. In: FRANKEL, O.H. & BENNETT, E. **Genetic resources in plants: their exploration and conservation.** Oxford, Blackwell, 1970. p.115-29.

- BLIXT,S. Pisum. In: FRANKEL,O.H. & BENNETT,E. **Genetic resources in plants**: their exploration and conservation. Oxford, Blackwell. 1970. p.312-26.
- CROW,J.F. & KIMURA,M. **An introduction to population genetics**. New York, Harper and Row, 1970. 591p.
- FALCONER,D.S. **Quantitative genetics**. New York, Ronald Press, 1964. 365p.
- FRANKEL,O.H. Genetic conservation in perspective. In: FRANKEL,O.H. & BENNETT,E. **Genetic resources in plants**: their exploration and conservation. Oxford, Blackwell, 1970. p.469-89.
- FRANKEL,O.H. Natural variation and its conservation. In: MUHAMMEO,A.; AKSEL,R. & VON BORSTEL, R.C. **Genetic diversity in plants**. New York, Plenum Press, 1977. p.21-44.
- FRANKEL,O.H. & BENNETT,E. Genetic resources: introduction. In: FRANKEL,O.H. & BENNETT,E. **Genetic resources in plants**: their exploration and conservation. Oxford, Blackwell, 1970. p.7-17.
- HALLAUER,A.R. & MIRANDA FILHO,J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames, Iowa State University Press, 1981. 468p.
- HARLAN,J.R. Evolution in cultivated plants. In: FRANKEL , O. H. & BENNETT , E. **Genetic resources in plants**: their exploration and conservation. Oxford, Blackwell, 1970. p.19-32.
- HAWKES, J.G. Germplasm collection, preservation and use. In: FREY,K.J. **Plant breeding**. Ames, Iowa State University Press, 1981. p.57-83.
- METTLER , L.E. & GREGG, T.E. **Population genetics and evolution**. New York, Prentice Hall, 1969. 212p.
- STEEL,R.G.D. & TORRIE,J.H. **Principles and procedures of statistics**. New York, McGraw-Hill, 1960. 481p.
- VENCOVSKY,R. Effective size of monoecious populations submitted to artificial selection. **Revista brasileira de genética**, 1(3): 181-91, 1978.