

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS À SELEÇÃO
RECORRENTE RECÍPROCA DE FAMÍLIAS DE IRMÃOS
COMPLETOS EM MILHO (*Zea mays* L.)

KEILA SILVA DA CUNHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2010

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS À SELEÇÃO
RECORRENTE RECÍPROCA DE FAMÍLIAS DE IRMÃOS
COMPLETOS EM MILHO (*Zea mays* L.)

KEILA SILVA DA CUNHA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Genética e Melhoramento de
Plantas.”

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2010

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS À SELEÇÃO
RECORRENTE RECÍPROCA DE FAMÍLIAS DE IRMÃOS
COMPLETOS EM MILHO (*Zea mays* L.)

KEILA SILVA DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Genética e Melhoramento de
Plantas.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2010.

Comissão examinadora:

Flávio Dessaune Tardin (D.Sc. em Produção Vegetal) – Embrapa Milho e Sorgo

Profa. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D. em Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof. Rogério Figueiredo Daher (D.Sc. em Produção Vegetal) – UENF

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D. em Melhoramento de Plantas) – UENF –
Orientador.

Aos meus queridos pais, Adolfo e Soely,
A minhas irmãs, Sheila e Patrícia,
A minha avó querida, Soemes,
Ao meu namorado, Paulo Vinícius.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador, e a Nossa Senhora, por toda proteção e graças concedidas;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por ter tornado possível a realização de mais um sonho;

À FAPERJ, pela concessão da bolsa;

Ao professor Messias, pela excelente orientação, pelos ensinamentos e pela visão dinâmica do melhoramento de plantas moderno, integrando técnicas clássicas com as modernas da biotecnologia;

Aos professores, Rogério Figueiredo Daher e Telma Nair Santana Pereira, e o pesquisador, Flávio Dessaune Tardin, por fazerem parte da banca de defesa da minha dissertação;

À professora e coordenadora da Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Telma Nair Santana Pereira, pela amizade, dedicação e paciência aos alunos;

Aos professores do Curso Genética e Melhoramento de Plantas, pela contribuição na minha formação profissional;

Aos colegas de trabalho, Ana Paula, Silvério Jr. e Leandro, pelo suporte nas análises estatísticas dos dados experimentais;

Aos técnicos agrícolas, Geraldo de Carvalho e Paulo Rogério, por toda a paciência e dedicação aos experimentos, e pelos ensinamentos de campo;

À técnica e amiga Vitória, por todo o ensinamento e ajuda, pela amizade e paciência;

Ao secretário da GMP, Daniel por toda a paciência e dedicação;

À Ana Paula, obrigada pela amizade, paciência e ensinamentos durante esses anos de convivência;

A todos aqueles que, em algum momento, contribuíram para a minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

RESUMO.....	Vii
ABSTRACT.....	iX
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3.1. Classificação Botânica e Origem do Milho.....	05
3.2. Importância Econômica.....	06
3.3. Genética e Melhoramento do Milho.....	08
3.4. Diversidade Genética.....	09
3.5. Heterose.....	11
3.6. Seleção Recorrente.....	13
3.7. Parâmetros Genéticos.....	16
3.8. Índice de Seleção.....	16
3.9. Marcadores Moleculares.....	19
3.10. Análise de Agrupamento.....	22
3.10.1. Métodos Hierárquicos.....	23
3.10.2. Consistência do Agrupamento.....	23
3.10.3. Dispersão Gráfica (Análise das Coordenadas Principais – PcoA).....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Material Genético.....	25

4.2. Obtenção do 12º Ciclo de Seleção Recorrente Recíproca.....	25
4.2.1. Geração das Famílias de Irmãos Completos e de Sementes S ₁	26
4.2.2. Avaliação das Progênes de Irmãos Completos.....	27
4.2.2.1 Local e Delineamento Experimental.....	27
4.2.2.2. Seleção das Progênes Superiores – Análise Estatística.....	28
4.2.2.2.1. Análise de Variância.....	28
4.2.2.2.2. Estimação dos Parâmetros Genéticos.....	29
4.2.2.2.3. Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978).....	31
4.3. Avaliação da Diversidade Genética por Marcador Molecular.....	31
4.3.1. Extração do DNA.....	32
4.3.2. Quantificação do DNA.....	32
4.3.3. Amplificação do DNA Via Marcador <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> (ISSR).....	32
4.3.4. Eletroforese.....	33
4.3.5 Análise dos Dados Moleculares.....	33
4.3.6. Análise de Agrupamento.....	34
4.4. Recombinação das Famílias Superiores.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Avaliação das Progênes de Irmãos Completos e Análise de Variância.....	36
5.2. Estimação dos Parâmetros Genéticos.....	41
5.3. Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978).....	44
5.4. Análise dos Marcadores Moleculares na Seleção dos Genótipos.....	46
5.5. Análise de Agrupamento.....	47
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICES.....	70
Apêndice A.....	71

Apêndice B.....	72
Apêndice C.....	73

RESUMO

CUNHA, Keila Silva; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2010; Marcadores moleculares aplicados à seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.). Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira. Conselheiros: Profa. Telma Nair Santana Pereira e Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior.

O presente trabalho visou a dar continuidade ao programa de seleção recorrente, apresentando resultados relativos ao 12º ciclo, acrescentando, na fase de seleção, os marcadores de DNA como ferramentas auxiliares para maximização da diversidade genética entre e dentro das populações. Para tanto, 138 famílias de irmãos completos foram avaliadas em dois ambientes: Campos dos Goytacazes e Itaocara. Dado o grande número de tratamentos, as mesmas foram agrupadas em "sets" com duas repetições. Foram estimados os parâmetros genéticos de diversas características morfoagronômicas das populações CIMMYT e Piranão. A análise de variância demonstrou resultados significativos em relação à variabilidade genética nas populações. O coeficiente de herdabilidade, $h^2_{X_f}$, variou de 21,40% a 76,00%, evidenciando a característica produção com $h^2_{X_f}$ um de 48,00%, indicando uma boa alternativa de ganhos para esta característica. A seleção dos genótipos superiores a serem recombinados foi realizada em duas etapas: a primeira realizada pelo ensaio de competição e a segunda, pela etapa adicional dos marcadores de DNA do tipo ISSR. A seleção com base no ensaio de competição foi potencializada com a utilização do índice de Mulamba e Mock (1978), utilizando como critério, pesos arbitrários às 12 características

morfoagronômicas. Com base na média das 40 melhores progênies eleitas pelo índice de Mulamba e Mock (1978), estimou-se um ganho genético para a característica produção de 11%. Os marcadores ISSR foram efetivos em agrupar os genótipos em seus respectivos grupos heteróticos. Dentro dos 40 genótipos selecionados como superiores, os marcadores ISSR identificaram 22 indivíduos S1, da população Piranão, e 20 indivíduos S1, da população CIMMYT, de forma a maximizar a diversidade genética intrapopulacional e a distância genética interpopulacional. Os indivíduos selecionados tanto no teste, fenotipicamente, quanto no laboratório, genotipicamente, permitirão não somente dar sequência aos ciclos seguintes, como também, incrementar a heterose nos procedimentos de hibridação.

ABSTRACT

CUNHA, Keila Silva; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2010; Molecular markers applied to reciprocal recurrent selection of full-sib families in corn (*Zea mays* L.). Adviser: Messias Gonzaga Pereira. Committee Members: Telma Nair Santana Pereira and Antônio Teixeira do Amaral Júnior.

This work aimed to continue the recurrent selection program and to present the results related to the 12th cycle using as additional, during the selection phase, the DNA markers as auxiliary tools in order to maximize the genetic diversity between and within the populations. Thus, 138 full-sib families were evaluated at two locations: Campos dos Goytacazes and Itaocara. Because of the great number of treatments, the full-sib families were gathered in sets with two repetitions. Genetic parameters were estimated based on several morphoagronomic characteristics of both populations CIMMYT and Piranão. The variance analysis showed significant results in relation to genetic variability in the populations. The coefficient of heritability, $h_{X_f}^2$, varied from 21.40 % to 76.00% and showed that the production had a $h_{X_f}^2$ of 48,00%, what indicates a good alternative of gains for such characteristic. The selection of the superior genotypes in order to be recombined was done in two steps: the first one was the field evaluation test and the second one was the application of ISSR DNA markers. The Mulamba & Mock's index (1978) was used for selection based on the field evaluation, considering the 12 morphoagronomic characteristics having as a criterion, arbitrary weight. According to the mean of the best 40 progenies selected by Mulamba & Mock's index (1978),

it was estimated a genetic gain of 11% for grain yield. The ISSR markers were efficient in order to gather the genotypes in their respective heterotic groups. Among the 40 genotypes selected as superiors, the ISSR markers identified 22 S1 individuals from Piranão population and 20 S1 individuals from CIMMYT population, thus, the intrapopulation genetic diversity and interpopulation genetic distance were maximized. The individuals selected by both phenotypic and genotypic (at the laboratory) essays will permit to continue the next cycles and they will also increase the heterosis in the hybridization procedures.

1. INTRODUÇÃO

O centro de origem e diversidade do milho, uma das culturas mais antigas do continente americano, é o México. (Mangelsdorf, 1974) Esta é uma cultura extremamente rica em conhecimentos técnico-científicos, possuindo um alto valor econômico e um bom potencial para geração de renda, visto que viabiliza o sistema produtivo pela agregação de valores ao produto e sua importante função na alimentação humana e animal. (Miranda, 2003)

Cultivado de Norte a Sul do país, bem como em todo mundo, nas mais variadas formas de cultivo, o milho apresenta-se como uma cultura de grande importância econômica e social, além de constituir um enorme potencial para o crescimento do setor agrícola, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias que permitem ampliar a produção e garantem uma qualidade expressiva do produto. (Santos *et al.*, 2002)

O Brasil é o terceiro produtor mundial da cultura, sendo que a maior parte da área plantada está na região Sul do país, com cerca de 95 % da produção. (CONAB, 2009)

Desta forma, a produção de sementes híbridas de milho é um dos avanços tecnológicos desenvolvidos para esta cultura. A escolha certa sobre qual híbrido plantar é fundamental, para que o produtor obtenha altas produtividades e lucros satisfatórios, no desenvolvimento da atividade agrícola. Por isso, é importante verificar periodicamente o desempenho agrônomo dos principais materiais recomendados para regiões específicas de cultivo desta cultura, o que poderá

trazer, ao produtor, informações valiosas sobre qual ou quais híbridos ele deverá utilizar em sua propriedade. (Santos *et al.*, 2002)

A genética e o melhoramento de plantas vêm sendo trabalhados e, conseqüentemente, aperfeiçoados com sucesso desde os primórdios da civilização. O avanço genético pode ser alcançado desde que exista a variabilidade genética, isto é, desde que o efeito ambiental não mascare por completo esta variabilidade, e que a seleção e a recombinação de genótipos superiores possam ser realizadas com o fim de se estabelecer a próxima geração. (Hallauer e Miranda Filho, 1987)

O melhoramento genético tem sido responsável por incrementos de rendimento, principalmente pela exploração da heterose, fator expressivo em parte nas plantas alógamas, nas quais as populações melhoradas podem ser lançadas como variedades comerciais ou ser utilizadas como fonte de linhagens para a utilização em formação de híbridos. (Paterniani *et al.*, 2003)

Para obter ganhos genéticos em diversas características, de forma eficiente, há algumas metodologias de seleção simultânea (Smith, 1936; Hazel, 1943; Willians, 1962; Pesek e Baker, 1969; Mulamba e Mock, 1978, citados por Cruz e Carneiro, 2003). Estes índices associam as informações referentes às diversas características de interesse agrônômico, fazendo uso de pesos econômicos, previamente estabelecidos, bem como de variâncias genotípicas e fenotípicas de cada característica, e as respectivas covariâncias entre cada par de características, permitindo, num mesmo programa de seleção, ganhos para diversas características.

Dentre os muitos métodos de melhoramento, merece destaque a Seleção Recorrente Recíproca, uma vez que este método foi desenvolvido para aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis, por meio de repetidos ciclos de seleção, sem reduzir a variabilidade genética da população. Sendo assim, permite ganhos a curto, médio e longo prazos. Todavia, esta metodologia é trabalhosa e exige mão-de-obra especializada e recursos consideráveis, demandando, principalmente, tempo para a condução dos ciclos. (Pinto, 1995; Borém e Miranda, 2009)

A elevação das frequências gênicas favoráveis como efeito da seleção depende de muitos fatores, entre os quais, podem-se mencionar: a variabilidade

genética, o método de seleção empregado, o tamanho da população, a influência do ambiente, entre outros. (Paterniani, 1980)

Para ampliar a eficiência dos métodos de seleção, os programas de melhoramento genético tendem a associar técnicas clássicas com técnicas mais modernas da biotecnologia, como a utilização de marcadores de DNA, como ferramenta auxiliar. Assim, os marcadores moleculares podem contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado e ainda para a obtenção de espécies melhoradas. (Ferreira e Gratapaglia, 1998) Por meio de técnicas moleculares, é possível acessar e selecionar a variabilidade em nível de DNA, aumentando sua importância nos programas de melhoramento genético.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro vem conduzindo um programa de melhoramento genético de milho desde o ano de 1996, visando à eficiência no melhoramento populacional a longo prazo, programa este que já disponibilizou, à região Norte/Noroeste Fluminense, dois cultivares de milho híbrido, o 'UENF 506-6' e o 'UENF 506-8'.

O presente trabalho tendeu a dar continuidade a este importante programa, tendo já alcançado o 11º ciclo de seleção recorrente, melhorando as populações de milho CIMMYT e Pirão, utilizadas para a obtenção do híbrido intervarietal.

Portanto, a proposta visou obter o 12º ciclo com expectativas de ganho de produção e melhoria do material genético, manter a variabilidade genética entre e dentro das populações, aumentar a distância genética entre as populações e possibilitar a obtenção de linhagens superiores para serem utilizadas na obtenção de híbridos nos próximos programas.

2. OBJETIVOS

- a) Obter o 12º ciclo de seleção recorrente recíproca (SRR) entre famílias de irmãos completos;
- b) Utilizar marcadores ISSR para selecionar indivíduos para constituírem o próximo ciclo;
- c) Melhorar simultaneamente as populações de milho CIMMYT e Piranão;
- d) Desenvolver novos cultivares de milho híbridos interpopulacionais; e
- e) Estimar os parâmetros genéticos da população do 12º ciclo de SRR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Classificação Botânica e Origem do Milho

O milho é uma gramínea da família Poaceae, da tribo Maydeae, do gênero *Zea* e da espécie *mays* (*Zea mays* L.) É uma planta monoica, alógama, anual, robusta e ereta com $2n=2x=20$ cromossomos. (Paterniani, 1980)

No entanto, atualmente existem evidências de que o milho possui uma origem alotetraploide ($2n=4x=20$), resultante de eventos de poliploidização. (Gaut *et al.*, 2000) Baseando-se na sequência de DNA, estes eventos teriam ocorrido após a divergência entre as culturas de milho e sorgo, nas quais, após rearranjos cromossômicos, ocorreram a poliploidização e a diploidização, até a fixação.

O milho é um cereal essencialmente americano, uma vez que é, no continente americano, que se encontram os seus parentes selvagens mais próximos: teosinte e *Tripsacum*, bem como seu centro de origem e diversidade, o México. (Hallauer, 1985) Fora das Américas, não existem fósseis e nem evidências sobre o milho.

É uma planta pouco tolerante à seca, por possuir sistema radicular fasciculado e superficial. Suas folhas são alternadas, presas à bainha superpostas que envolvem o colmo e inflorescências. (Goodman e Smith, 1987)

O milho (*Zea mays mays*), o teosinte (*Zea diploperenni*, *Zea perennis*, *Zea luxuriantes*, *Zea mays mexicana*, *Zea mays parviglumis*, *Zea mays huehuetenangensis*) e o *Tripsacum* (*Tripsacum* spp.) são os três membros da tribo Maydeae. (Freitas, 2001) Três hipóteses podem ser consideradas para

explicar a origem do milho: a primeira proposta é a da origem comum, sugerida por Weatherwax, em 1954, em que o milho, o teosinte e o *Tripsacum* spp. originam-se de um ancestral comum. A segunda hipótese, descendência do teosinte, é defendida por Beadle (1978) e Galinat (1974,1977), que sugerem que o milho teria se originado de forma direta e unicamente do teosinte, por seleção praticada pelo homem. E a última, do milho como antepassado do teosinte, sugerida por Mangelsdorf, em 1974, em que o teosinte tenha-se originado do milho.

O milho e o teosinte exibem extremas diferenças na sua morfologia adulta, tanto é que os taxonomistas, inicialmente, consideraram o teosinte mais fortemente relacionado com o arroz do que com o milho, ainda que áreas do genoma do teosinte e do milho sejam muito similares, pois apresentam o mesmo número de cromossomo (com exceção do teosinte tetraploide) ou a morfologia idêntica do cromossomo, e que podem ser facilmente cruzados, visto que os híbridos F₁, entre estes acessos, exibem meiose completamente normal e completa fertilidade. (Doebley, 2004)

Conforme estudado por Doebley e Stec (1993), comparando a diferença morfológica entre o milho e o teosinte, baseando-se em mapeamento por QTL (“quantitative trait loci”), foram encontradas cinco regiões do genoma que controlam a maior parte das principais diferenças morfológicas. Tais análises puderam confirmar as observações iniciais, segundo as quais, as heranças das diferenças entre milho e teosinte eram governadas por alguns genes importantes ou alguns blocos de múltipla ligação gênica, e ainda um maior número de efeitos de loco. (Doebley, 2004)

Quanto à ancestralidade, Goloubinoff *et al.* (1993) sugeriram que o milho moderno é o resultado da domesticação de diversos genomas do teosinte. Segundo estes autores, isto pode ter ocorrido, em virtude de alguns eventos de domesticação, ou por um único evento de domesticação, seguido por repetidas introgressões com as espécies do teosinte, ou pela domesticação a partir de uma população de teosinte bem diversificada.

3.2. Importância Econômica

O milho tem sido o alimento de sustentação do crescimento mundial da população como um todo, sendo considerado juntamente com o arroz e o trigo as três principais culturas de cereais do mundo. (Von Pinho, 2003) A cultura do milho

é considerada de extrema importância, pois pode ser utilizada de diversas formas, como: ração ou silagem para a alimentação de animais, alimentação humana na forma "in natura" ou na forma de subprodutos como pães, farinha e massas, sem mencionar a indústria, na qual o milho é empregado como matéria-prima de diversos produtos. (Bull, 1993)

A cultura do milho vem crescendo no Brasil aos poucos. O recorde da safra de 2007/08 foi obtido devido ao uso de sementes mais produtivas, ao melhor nível de adubação e à aplicação de defensivos. Relatos indicam que o clima contribuiu significativamente, porém, a tecnologia teve uma participação considerada na colheita, apresentando 14 % acima da safra de 2006/07. (Agrianual, 2009)

O milho é cultivado em amplo território brasileiro, sendo que 90 % da produção concentram-se na região Sul (43 %), Sudeste (25 %) e Centro-Oeste (22 %). (Garcia *et al.*, 2005) A safra de grãos do Brasil foi estimada em 6,1 % menor que a do ciclo anterior, segundo levantamento da safra 2008/09, que previu a colheita de 135,32 milhões de toneladas. No Rio Grande do Sul, a previsão foi de um total de 22,5 milhões de toneladas, com queda de 0,6 % em relação à última safra. (CONAB, 2009)

Segundo o IBGE (2009), a área plantada de milho no ano de 2009 deveria atingir 47,4 milhões de hectares, 0,3 % maior que a de 2008 (47,2 milhões de hectares). Regionalmente, a produção e as variações esperadas para 2009, em relação à safra 2008, foram: região Sul, 54,7 milhões de toneladas (-10,8 %); Centro-Oeste, 47,1 milhões de toneladas (-7,1 %); Sudeste, 16,8 milhões de toneladas (-4,1 %); Nordeste, 12,9 milhões de toneladas (3,4 %) e Norte, 3,8 milhões de toneladas (-1,8 %). Esta redução na produção na maior parte dos estados é resultado do atraso do plantio em algumas regiões e do clima adverso durante o desenvolvimento das culturas. A estimativa para o período atual é 50,30 milhões de toneladas de grãos para o milho total (cerca de 45 % da produção colhidos na primeira safra).

Na safra de 2008/09, os custos de produção aumentaram consideravelmente, sobretudo em decorrência do aumento dos preços dos fertilizantes. Contudo, reduzir a tecnologia não foi recomendado, indicando ser melhor manter um bom nível de produtividade para reduzir o custo por saca. Nesta safra, destacaram-se os produtores que tiveram a capacidade de

armazenar a colheita, aproveitando o melhor momento para efetivar a venda (Agriannual, 2009).

Um dos fatores que encarece o milho brasileiro, em comparação com os demais países produtores, é a questão do frete, como informado pela Agriannual (2009). Dessa forma, as estimativas de exportação de 10 milhões de toneladas em 2008 não se confirmaram. O produtor brasileiro teve que continuar planejando o negócio frente à demanda interna, tendo em mente que a safra 2008/09 iniciou com elevados estoques no Brasil, resultado das exportações que não foram efetivadas.

3.3. Genética e Melhoramento do Milho

A genética e o melhoramento de plantas vêm sendo trabalhados e, conseqüentemente, aperfeiçoados com sucesso desde os primórdios da civilização. O avanço genético pode ser alcançado desde que exista a variabilidade genética, que o efeito ambiental não mascare por completo esta variabilidade, e que a seleção e a recombinação de genótipos superiores possam ser realizadas com o propósito de se estabelecer a próxima geração. (Hallauer e Miranda Filho, 1987)

O objetivo principal do melhoramento de populações de milho é aumentar a frequência dos alelos desejáveis e criar condições para a obtenção de linhagens superiores. Existem várias modalidades de seleção, sendo que as principais diferenças entre elas se referem ao grau de controle dos progenitores selecionados. O melhoramento intrapopulacional é utilizado principalmente para aperfeiçoar o comportamento *per se* de uma população, enquanto o melhoramento interpopulacional constitui um método para melhorar a resposta heterótica entre duas populações.

O melhorista tenta identificar mediante a seleção, os indivíduos geneticamente superiores ou mais adaptados para obter novos cultivares. A seleção, por sua vez, é mais efetiva quando age sobre caracteres de alta herdabilidade e que tenham alguma associação com a produção ou outro caráter de importância econômica. Por isso, é necessário realizar trabalhos no sentido de estimar parâmetros genéticos como herdabilidade, dentre outros. (Pereira, 1985)

O primeiro híbrido comercial foi esquematizado em 1934, em Minnesota, resultante do cruzamento entre duas linhas puras do grupo heterótico *Japanese Hulled*. (Santacruz-Varela *et al.*, 2004) Em 1945, a Agrocerec foi pioneira no

lançamento de milho híbrido duplo no Brasil. A introdução do milho híbrido na década de 1920 constitui-se em um dos maiores impulsos à agricultura moderna. O progresso do milho híbrido aliado à melhoria das práticas culturais contribui cada vez mais para o aumento não só da produtividade, mas também da qualidade da cultura, tais como, o teor de proteínas, minerais, etc.

Pode-se conduzir um programa de melhoramento genético de plantas de duas formas: a primeira é pela geração de híbridos, visando à obtenção de linhagens endogâmicas que, por conseguinte, produzirão indivíduos superiores às populações originais dessas linhagens; e a segunda, pela obtenção de populações melhoradas pelo uso adequado de métodos de seleção, possibilitando o aumento gradativo da frequência de alelos favoráveis. (Paterniani e Miranda Filho, 1978; Hallauer e Miranda Filho, 1988; Cruz *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008)

Pinto (1995) descreve metodologias de seleção utilizadas em diversas culturas alógamas, inclusive em milho, podendo-se citar: seleção massal (estratificada e estratificada geneticamente); seleção com teste de progênies; seleção recorrente (simples, para capacidade geral de combinação, para capacidade específica de combinação, recíproca, recíproca com famílias de meios irmãos, obtidas de plantas prolíficas, com famílias de irmãos completos).

No caso do milho, a produção de sementes está sob o controle, principalmente, das empresas de iniciativa privada, como a Pioneer Hi-Bred e Monsanto, que investem na contratação e formação de melhoristas. A Embrapa, empresa pública, também atua no desenvolvimento de cultivares e tem lançado diversas variedades de milho comum. Como exemplo, cita-se o cultivar BR 106, uma variedade obtida a partir de milhos tropicais da raça Tuxpeño. (Borém e Miranda, 2009)

Com o passar dos ciclos seletivos, são esperadas modificações no valor de alguns parâmetros populacionais dos caracteres de interesse, tais como, médias, variabilidade genética e correlações genéticas. Espera-se que essas alterações sejam proporcionais à intensidade de seleção aplicada. Portanto, é preciso monitorar a variação desses parâmetros, pois a redução da variabilidade genética pode reduzir a eficiência da seleção e comprometer o programa de melhoramento. (Bosco, 2002)

3.4. Diversidade Genética

A divergência genética pode ser definida como a amplitude de variação genética existente para uma determinada espécie. Portanto, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e diversidade genética das espécies para uma obtenção eficiente do material genético a ser utilizado em programas de melhoramento, visto que, sem o conhecimento da variabilidade e da sua interação com o ambiente, torna-se difícil a obtenção de genótipos superiores. Segundo Milach (1998), a obtenção de genótipos superiores pode ser baseada em caracteres agronômicos ou moleculares, permitindo, desta forma, um estudo da divergência genética.

A diversidade genética pode ser estudada de forma quantitativa ou preditiva. Entre os métodos quantitativos, citam-se as análises dialélicas, em que é necessária a avaliação dos genitores e de suas combinações híbridas, o que é de difícil execução, devido ao trabalho ser conduzido manualmente e com pouca probabilidade de obtenção de semente híbrida, dificultando assim o emprego da técnica. E quanto aos métodos preditivos da diversidade, relatam-se aqueles que se baseiam nas diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares, quantificando os genitores por medidas de dissimilaridade que expressam o grau de divergência genética entre os mesmos. (Cruz e Carneiro, 2003)

A grande importância dos estudos de divergência genética está no conhecimento do grau de variabilidade genética das populações, em função da preocupação que ocorre com a erosão genética, que diminui a variabilidade genética das populações, decorrente da substituição das antigas variedades por formas genotípicas uniformes. (Amaral e Thiébaud, 1999) O conhecimento das distâncias genéticas em programas de melhoramento, envolvendo hibridações, também tem sido importante, porque fornece parâmetros para a identificação de genitores que possibilitem grande efeito heterótico na progênie e maior probabilidade de recuperação de genótipos superiores. Os métodos preditivos da distância genética podem ser aplicados com base na avaliação morfológica da planta (Cruz e Regazzi, 1997) ou por meio de dados moleculares. (Oliveira, 1998; Diniz Filho, 2000)

Os programas de melhoramento genético têm nos grupos heteróticos, um dos seus pilares, por possibilitar opções de estratégias para a obtenção de populações e híbridos superiores. Assim, tem sido avaliada a diversidade genética, com o objetivo de identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose, de forma que, nas gerações segregantes, haja

maior possibilidade de recuperação de genótipos superiores. (Cruz, 2005) Desde o primeiro trabalho desenvolvido por Shull em 1909, vários estudos apresentaram evidências que o cruzamento entre linhas geneticamente divergentes, frequentemente, produzem progênies superiores. (Paterniani, 2001)

Diversos estudos, com diferentes ferramentas, têm sido desenvolvidos para verificação da divergência genética, por exemplo: marcador SSR (Liu *et al.*, 2005; Vigouroux *et al.*, 2005; Balestre *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2008), marcador RFLP (Benchimol *et al.*, 2000; Gabriel, 2006), marcador RAPD (Carvalho *et al.*, 2004; Bruel *et al.*, 2007; Tardin *et al.*, 2007), marcador ISSR (Carvalho *et al.*, 2002), caracteres morfológicos (Fuzatto *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008), entre outros.

O conhecimento da variabilidade genética entre os materiais do programa de melhoramento proporciona, com maior segurança, o trabalho com grupos heteróticos, definidos aqui como: germoplasmas que, quando avaliados em combinações híbridas, exibem superioridade consistente, geralmente resultante da heterose, que depende diretamente da variabilidade genética. (Hallauer e Miranda, 1988)

As medidas de dissimilaridade são importantes em estudos de diversidade genética, nos quais se procura identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação. Espera-se que genitores, com bom desempenho e divergentes, apresentem genes complementares que proporcionem na F₁ maior heterose e indivíduos transgressivos nas gerações segregantes. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Cruz e Carneiro, 2003; Mingoti, 2007; Borém e Miranda, 2009)

Bruel *et al.* (2007) utilizaram marcador molecular RAPD, para analisar a divergência genética entre 16 linhagens de milho. Por meio do agrupamento por UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method With na Arithmetic Mean*) e PCoA (Análise das Coordenadas Principais), obteve-se a formação de cinco grupos. Entretanto, o marcador RAPD mostrou-se eficiente, podendo a divergência genética ser utilizada para estabelecer grupos heteróticos consistentes entre linhagens de milho.

3.5. Heterose

Em linhas gerais, a heterose, segundo Paterniani (2001), é a diferente expressão genética desenvolvida entre híbridos e seus parentais. Hallauer e Miranda Filho (1988) descrevem que a heterose é uma função direta do somatório

do produto do quadrado da distância genética com os respectivos desvios de dominância. Em suma, é necessário que se tenha divergência genética entre duas populações e algum nível de dominância nos locos que controlam uma determinada característica, para que a heterose se expresse. (Falconer, 1987)

O uso do vigor híbrido ou heterose é um exemplo marcante e favorável na genética aplicada, que foi primeiramente desenvolvida com o milho e, depois, estendida a outras culturas. (Borém e Miranda, 2009)

A heterose tem sido utilizada no melhoramento do milho desde o conceito inicial apresentado por Shull (1909), envolvendo híbridos simples. Assim, o desenvolvimento de novos híbridos depende da capacidade de combinação das linhagens que vão integrar a produção destes híbridos. Desse modo, é indispensável o conhecimento das combinações híbridas superiores. (Delboni *et al.*, 1989)

Na cultura do milho, o uso da heterose na hibridação foi recomendado como uma valiosa estratégia no melhoramento. Os híbridos podem ser sintetizados de várias formas, porém, a mais comum é mediante o cruzamento entre linhas puras. A teoria da heterose foi proposta para explicar as causas, uma vez que o fenômeno do vigor híbrido é bem estabelecido. (Paterniani, 2001)

Vários estudos têm revelado que quanto maiores os contrastes genéticos entre os genitores escolhidos para as hibridações, maiores são as chances de aparecerem efeitos heteróticos nos descendentes. (Ronzelli Júnior, 1996) Atualmente, os programas de seleção recorrente e de obtenção de híbridos de linhagens têm utilizado, como ferramenta, os marcadores moleculares, com o objetivo de identificar materiais contrastantes que potencializam a heterose. (Gabriel, 2006; Benchimol *et al.*, 2000; Vigouroux *et al.*, 2005; Aguiar *et al.*, 2008; Balestre *et al.*, 2008) Hallauer e Miranda (1988) relacionaram alguns trabalhos com seleção inter e intrapopulacional e suas respectivas alterações na heterose, via seleção. Em alguns trabalhos de seleção recorrente recíproca, a seleção resultou na diminuição da heterose (Gevers, 1974; Hallauer, 1977) e, em outros trabalhos, um aumento. (Eberhart *et al.*, 1973; Gevers, 1974; Paterniani e Vencovsky, 1977).

Portanto, estabelecer e melhorar novos grupos heteróticos pode ser de grande ajuda para melhorar o comportamento agrônomico e sua adaptação a novas regiões de produção, já que o sucesso destes híbridos de milho é resultado do efeito heterótico alcançado pelo cruzamento de linhagens que possuem boa

capacidade combinatória (Gomes, 1999). Assim, a escolha adequada de genitores pode ser baseada em informações de relacionamento genético estimado por marcadores de DNA, os quais permitem um estudo sem ou pouca interferência ambiental na divergência genética, como ocorre com os marcadores morfoagrômicos. (Milach, 1998)

3.6. Seleção Recorrente

A seleção recorrente foi primeiramente empregada por Hull em 1945, como sendo uma re-seleção, geração após geração, com intercruzamento entre os tipos selecionados, para obter a recombinação gênica, de modo a elevar a frequência de alelos favoráveis e manter a endogamia em baixo nível, a ponto de assegurar um alto grau de variabilidade genética. (Pinto, 1995) Com este método, a cada ciclo de seleção recorrente, ocorre uma maior concentração de alelos favoráveis nas populações trabalhadas, com o conseqüente aumento da média populacional. As populações melhoradas, por meio da seleção recorrente, podem ser utilizadas diretamente como variedades de polinização aberta ou então para obtenção de linhagens endogâmicas, utilizadas na produção de híbridos.

Na aplicação da seleção recorrente, são imprescindíveis que se escolham populações divergentes e de preferência de grupos heteróticos distintos. Na cultura do milho, a maioria dos híbridos pertence aos grupos heteróticos, denominados milho dentado e duro.

Um ciclo de seleção recorrente envolve, basicamente, três etapas: a) obtenção de progênies: irmãos completos e progênies, parcialmente, endogâmicas S1; b) avaliação de progênies: realizada em ensaios envolvendo repetições e locais, por meio de delineamento experimental apropriado; e c) recombinação das progênies selecionadas: com a finalidade de gerar variabilidade para o próximo ciclo de seleção. Para a recombinação, utiliza-se a semente remanescente das progênies selecionadas. Parte das sementes é destinada aos ensaios de competição e a outra parte (semente remanescente) deve ser armazenada cuidadosamente para ser utilizada no campo de recombinação na próxima safra, caso essa progênie seja selecionada. (Hallauer e Miranda Filho, 1988)

A seleção recorrente recíproca, proposta por Comstock e Robinson (1948), visa à melhoria simultânea de duas populações. Estas populações, por sua vez, devem ser geneticamente distantes e de elevado potencial agrônomo. Com a

Seleção Recorrente Recíproca, têm-se vantagens, devido aos efeitos aditivos por meio de concentração de alelos favoráveis, em ambas as populações, bem como devido aos desvios de dominância. Isso porque uma vez que as distâncias genéticas se mantêm entre as populações, permitem, dessa forma, explorar o fenômeno da heterose, por meio de cruzamento entre populações e/ou linhagens oriundas das mesmas. (Hallauer e Miranda Filho, 1987; Silva, 2003)

Um dos métodos de seleção recorrente que merece destaque é a denominada seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos, proposto por Hallauer e Ebehart (1970). Esta metodologia permite, ao mesmo tempo, assegurar ganhos genéticos diretos (nas populações *per se*) e indiretos (nas populações em cruzamento). Tal método consiste em cruzamentos de plantas S_0 aos pares (plantas da população A com plantas da população B), autofecundando, simultaneamente, os indivíduos selecionados, com a exigência de que as plantas selecionadas sejam prolíficas.

Na cultura do milho, no método de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos, procede-se à autofecundação da segunda espiga de cada uma das plantas prolíficas. A primeira espiga (superior) de cada planta é fecundada com pólen de outra planta. (Paterniani e Campos, 1999) As sementes dessas espigas correspondem às progênies de irmãos completos (A x B), avaliadas em ensaios de produção, os quais permitem identificar as combinações (progênies) mais promissoras. Cada ciclo se completa quando as progênies S_1 de cada população, correspondentes aos melhores cruzamentos, são recombinadas em lote isolado, produzindo, assim, as populações melhoradas A_1 e B_1 . Desse modo, depois de avaliadas as progênies de irmãos completos, as sementes S_1 correspondentes às melhores progênies são plantadas, efetuando-se a autofecundação das plantas envolvidas nos cruzamentos, gerando, após algumas gerações de autofecundação, linhagens potenciais para híbridos de alta produção.

Tardin *et al.* (2007) fizeram uma modificação no método de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos, incorporando, antes da etapa de recombinação propriamente dita, uma etapa de avaliação da diversidade genética dos genitores selecionados como superiores. Tal etapa tem como objetivos: 1) eliminar contaminantes, ou seja, genótipos pertencentes a uma população, mas com distâncias genéticas mais próximas dos genótipos da outra

população; 2) preservar a variabilidade genética dentro de cada população; e 3) preservar ou até mesmo ampliar a distância entre as populações.

Existem diversas variações do esquema de seleção recorrente recíproca. O método de Seleção Recorrente Recíproca de Famílias de Irmãos Completos é obtido do cruzamento entre pares de plantas selecionadas na população, autofecundando-se, simultaneamente, os indivíduos selecionados. Para tanto há a necessidade das plantas serem prolíficas. No caso de populações com plantas não prolíficas, em geral, não se realiza a autofecundação. No milho, normalmente, a autofecundação é feita na segunda espiga de cada uma das plantas, e a primeira espiga de cada planta é fecundada com o pólen de outra planta. As progênes de irmãos completos são avaliadas com testes comparativos para a identificação dos genótipos superiores. A recombinação e a formação da população, a ser submetida a novo ciclo de seleção, são realizadas, fazendo-se uso das sementes da autofecundação, que correspondem aos genitores dos irmãos completos selecionados. (Paterniani e Campos, 1999; Borém e Miranda, 2009)

Existem inúmeros trabalhos baseados em melhoramento conduzido por Seleção Recorrente de Famílias de Irmãos Completos. Tardin *et al.* (2007), estudando o milho comum, aplicaram o índice de seleção de Smith e Hazel, e introduziram, para os genótipos selecionados, uma etapa baseada em marcador RAPD, objetivando-se preservar a variabilidade genética e identificar contaminantes antes da recombinação. Gabriel (2006) conduziu o 10º Ciclo de Seleção Recorrente entre Famílias de Irmãos Completos em Milho, incorporando uma etapa com marcador molecular RFLP, na identificação de genótipos superiores, para a condução dos próximos ciclos do programa. Ribeiro Júnior *et al.* (2000) observaram, no milho comum, a eficiência da Seleção Recorrente de Famílias de Irmãos Completos, por meio de metodologia baseada em alguns parâmetros genéticos, em produzir populações e híbridos superiores quanto ao incremento das frequências dos alelos favoráveis e da heterose com o avanço das gerações de seleção. Daros *et al.* (2004) verificaram, em milho pipoca, a correlação entre caracteres agrônômicos em dois ciclos de seleção recorrente (Famílias de Irmãos Completos e Famílias S₁). Embora não significativa, para ambos os ciclos, houve correlação genotípica negativa entre capacidade de expansão e o rendimento de grãos, porém houve acréscimo da correlação genotípica entre rendimentos de grãos e capacidade de expansão do primeiro

para o segundo ciclo, evidenciando aumento na concentração de alelos favoráveis na população.

3.7. Parâmetros Genéticos

A estimação dos parâmetros genéticos é importante para identificar a natureza da ação dos genes envolvidos no controle das características de interesse (caracteres quantitativos). Portanto, a estimação avalia a eficiência de diferentes estratégias de melhoramento para que sempre haja possibilidade de ganhos e que a variabilidade genética seja mantida. (Cruz e Carneiro, 2003)

O termo parâmetro é utilizado para designar as constantes características de uma população, particularmente, a média e a variância. No caso de populações utilizadas em programas de melhoramento, os parâmetros de interesse são de duas naturezas: genética e não-genética. A estimação dos parâmetros genéticos é necessária para: a) obter informações sobre a natureza da ação dos genes envolvidos na herança dos caracteres sob investigação; e b) estabelecer a base para a escolha dos métodos de melhoramento aplicáveis à população. Ao discutir a estimação de parâmetros genéticos, é preciso, contudo, considerar que as estimativas obtidas só são válidas para a população da qual o material experimental constitui algum tipo de amostra, e para as condições de ambiente em que o estudo foi conduzido. Assim, quando se pretende estimar, experimentalmente, as variâncias genéticas, tanto os genótipos quanto os ambientes de experimentação devem constituir amostras apropriadas da população e da área geográfica de interesse, respectivamente. (Cockerham, 1956; Robinson & Cockerham, 1965) É necessário ainda considerar que não se consegue estimar o componente da variação genética, quando um ensaio é conduzido, independentemente, do componente, devido à interação genótipo x ambiente. (Gardner, 1963)

Além do cálculo de variâncias genéticas e de médias, a obtenção de estimativas de outros parâmetros genéticos, como coeficiente de herdabilidade e de variação genética, índice de variação e correlações genéticas, é considerada necessária para se predizer ganhos, avaliar a viabilidade de determinado programa de melhoramento e orientar na adoção da estratégia mais eficiente de seleção. (Vencovsky, 1969)

3.8. Índice de Seleção

Os índices de seleção permitem gerar um agregado genotípico sobre o qual se exerce a seleção, funcionando como caráter adicional, resultante da combinação de determinadas características escolhidas pelo melhorista, nas quais se deseja exercer seleção simultânea, permitindo separar genótipos superiores, independentemente da existência ou não de correlações entre as características. (Smith, 1936; Hazel, 1943; Willians, 1962; Castoldi, 1997; Cruz e Regazzi, 2001; Gabriel *et al.*, 2008)

Os materiais genéticos realmente superiores são aqueles que reúnem, simultaneamente, uma série de atributos favoráveis satisfazendo as exigências do consumidor. Para tanto, o Índice de Seleção surge como um “super-caráter”, estabelecido pela combinação ótima de vários caracteres. Desse modo, a utilização do índice de seleção torna-se uma ferramenta eficiente.

Para se obter materiais genéticos realmente superiores, é necessário que o material selecionado reúna uma série de atributos favoráveis que lhe confirmem rendimento, comparativamente, mais elevado que satisfaça as exigências do consumidor. Cruz *et al.* (2004) afirmam que a seleção, com base em uma ou poucas características, tem-se mostrado inadequada, por conduzir a um produto final superior em relação às características selecionadas, mas com desempenho não favorável em relação às várias outras características consideradas.

Os índices de seleção são uma ferramenta bastante utilizada no melhoramento de culturas, como por exemplo, do milho. De acordo com Cruz *et al.* (2004), tais índices constituem uma técnica multivariada que associa informações relativas a vários caracteres de interesse agrônômico com propriedades genéticas da população avaliada. Com os índices de seleção, cria-se um valor numérico, que funciona como caráter adicional, teórico, resultante da combinação de determinados caracteres selecionados pelo melhorista, sobre os quais se deseja proceder à seleção simultânea.

A estimação do índice de seleção depende da disponibilidade de matrizes de variância e covariância genéticas, bem como as fenotípicas bem estimadas e de pesos econômicos. Uma vez estabelecido o índice, objetiva-se quantificar o ganho de seleção em cada caráter avaliado ou de forma conjunta. (Cruz e Carneiro, 2003).

Os índices de seleção têm sido utilizados pelo Programa de Melhoramento de Milho da UENF. Tardin *et al.* (2003) utilizaram o índice de Smith (1936) e Hazel (1943), quando, após várias tentativas de atribuição de pesos econômicos a oito

características avaliadas em um programa de seleção recorrente de famílias de irmãos completos de milho, conseguiram obter tais pesos fornecendo estimativas de ganhos satisfatórios na maioria das características, de acordo com o interesse do programa de melhoramento em questão. Gabriel (2006) também utilizou o índice clássico de Smith (1936) e Hazel (1943) na seleção das famílias superiores no 10º ciclo, obtendo ganhos satisfatórios para as várias características avaliadas pelo programa.

Smith (1936) propôs o uso de índice de seleção nos programas de melhoramento de plantas, como critério de seleção simultânea de duas ou mais características correlacionadas. Este procedimento foi adaptado ao melhoramento genético animal por Hazel (1943). De acordo com ambos os autores, para se utilizarem os índices de seleção, são necessários o valor econômico relativo a cada característica, e as covariâncias genóticas e fenotípicas entre cada par de características. Tal índice passou a ser reconhecido como Índice Clássico. Cruz (2005) propôs que os pesos econômicos fossem estimados a partir de estatísticas dos próprios dados experimentais, devido às dificuldades em se estabelecer tais pesos.

Williams (1962) propôs o índice-base, que dispensa as estimativas de variâncias e covariâncias fenotípicas e genóticas. Assim, este índice é estabelecido pela combinação linear dos valores fenotípicos médios dos caracteres ponderados pelos seus respectivos pesos econômicos.

Segundo Cruz e Carneiro (2003), este índice tem apresentado boa aceitação entre os melhoristas, por dispensar as estimativas de variâncias e covariâncias genóticas e fenotípicas, e ter relevado resultados satisfatórios, quando utilizado como critério de seleção em vários trabalhos científicos. Cruz *et al.* (1993) verificaram ganhos simultâneos nas características, teor de óleo e rendimento de espigas, em progênies de irmãos completos de milho comum, usando índices de seleção, o que não foi possível quando usaram a seleção direta e indireta.

Pesek e Baker (1969) sugeriram o uso de “ganhos genéticos desejados” de características individuais, num programa de seleção, para substituir os pesos econômicos relativos no cálculo dos índices de seleção. Para se usar a modificação proposta, necessitam-se da média dos genótipos e das matrizes de variância e covariância genotípica e fenotípica. Assim, é possível calcular os coeficientes dos índices, sem designar pesos econômicos, que resultarão em um

ganho máximo para cada característica, de acordo com a importância relativa assumida pelo melhorista na especificação do ganho desejado, sujeito às restrições impostas pela constituição fenotípica e genotípica da população.

O índice de Mulamba e Mock (1978) baseia-se em soma de “ranks” e consiste em classificar os materiais genotípicos em relação a cada um dos caracteres, em ordem favorável ao melhoramento. Uma vez classificados, são somadas as ordens de cada material genético referente a cada caráter, resultando em uma medida adicional tomada como índice de seleção. (Cruz *et al.*, 2004)

Existem vários outros métodos, para a obtenção desses Índices, que representam diferentes alternativas de seleção e, conseqüentemente, ganhos. (Cruz e Regazzi, 2001) Como atualmente já se dispõe de recursos computacionais e aplicativos adequados à estimação desses índices, a obtenção operacional é simples e indicada para a utilização. Alguns dos programas disponíveis para cálculos do índice são: Genes, SAS, entre outros.

Desse modo, o que se pode notar é que se tem a necessidade de testar diferentes índices para os caracteres disponíveis e, assim, selecionar o índice que mais atribui ganhos para que este possa ser utilizado na seleção das progênes superiores.

3.9. Marcadores Moleculares

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). (Borém e Caixeta, 2009)

Na seleção assistida por marcadores moleculares, pode-se ter uma economia de tempo e recurso. Este método pode também ser de grande valia na seleção de indivíduos que apresentam dois ou mais genes, cuja expressão produz fenótipos semelhantes. Com a seleção assistida por marcadores, indivíduos podem ser analisados quanto à presença de um, dois ou mais genes de resistência, por exemplo, sem a necessidade de teste de progênie. (Borém e Miranda, 2009)

A primeira ideia de se utilizar um marcador genético, com o objetivo de auxiliar na seleção de um caráter quantitativo, ocorreu em 1923 com o feijão, quando se constatou que o alelo responsável pela ausência de pigmentação

escura, no tegumento da semente, está ligado a alelos de alguns genes responsáveis pelo maior tamanho de sementes. Com isso, propôs-se selecionar linhagens de feijão com grãos grandes de uma forma indireta, ou seja, selecionando aqueles de coloração clara, já que a expressão da cor é mais facilmente detectável. Os marcadores genéticos podem ser morfológicos ou moleculares. O marcador morfológico é baseado no fenótipo determinado por um único alelo ou mais, sendo este ligado intimamente ao alelo de interesse. O marcador molecular de DNA são os próprios genes ou sequências de DNA situadas próximas aos genes que se deseja marcar. (Ramalho *et al.*, 2004)

Os marcadores de DNA são ferramentas moleculares poderosas por atuarem diretamente no nível de DNA. Sendo isentos da influência ambiental, são potencialmente ilimitados, independem da idade da planta e são passíveis de utilização em uma série de procedimentos relacionados ao melhoramento de plantas. (Ferreira e Grattapaglia, 1998) Os mesmos podem ser utilizados para estudos de diversidade genética, para *fingerprinting* de genótipos, para mapeamento e análise de genes, dentre outros. (Milach, 1998)

Após o surgimento dos marcadores de DNA, alguns resultados mostraram a associação da produtividade de grãos de híbridos de milho com a diversidade genética, no entanto, o valor preditivo dos marcadores não foi considerado suficiente. Assim, pode-se inferir que a associação da diversidade genética com a variabilidade morfo-agronômica pode ser útil na avaliação de genótipos, mas não é suficiente para a escolha de genitores. (Padilha, 2002)

A dissimilaridade genética, estimada por meio de marcadores moleculares, quando acompanhada de informações fenotípicas, é importante para a seleção de genótipos para o melhoramento e o mapeamento genético, permitindo, assim, a seleção de genitores para a formação de populações de melhoramento. Isso porque uma população originária do cruzamento de indivíduos superiores, para o caráter de interesse, e dissimilares geneticamente tem grande probabilidade de dar origem a uma população com ampla variabilidade genética e com maior possibilidade de seleção de transgressivos para o caráter de interesse. Tal expectativa decorre do fato de a heterose e a capacidade específica de combinação entre dois genitores dependerem da existência de dominância no controle do caráter e da esperança de dissimilaridade entre os genótipos. (Falconer & Mackay, 1996)

A escolha de uma técnica de marcador molecular depende de sua reprodutibilidade e simplicidade. Existem diferentes classes de marcadores moleculares disponíveis para serem aplicados no melhoramento genético vegetal. De acordo com Reddy *et al.* (2002), os marcadores moleculares mais comumente utilizados são os baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR), tais como, o RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e, mais recentemente, os microssatélites (*Simple Sequence Repeat*) e os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). No entanto, as maiores limitações desses métodos são a baixa reprodutibilidade do RAPD, o alto custo do AFLP e a necessidade do conhecimento prévio do genoma para o desenvolvimento de iniciadores específicos, para a possibilidade de detectar tais polimorfismos.

Desde 1994, uma técnica de marcador molecular nova, chamada ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), está disponível (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Os ISSRs são marcadores semiarbitrários, ampliados por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar para um microssatélite designado. A técnica do ISSR é um tipo de marcador molecular, usado pela comunidade científica, com diferentes aplicações no melhoramento de plantas (estudos de diversidade genética, filogenia, mapeamento genético, *fingerprints*, entre outras) em várias culturas. (Kantety *et al.*, 1995; Bornet *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2005; Ajibade *et al.*, 2000).

Os ISSRs comportam-se como marcadores dominantes e seguem o padrão de herança mendeliana simples. (Gupta *et al.*, 1994) A técnica do ISSR é um método baseado em PCR, envolvendo a amplificação de segmentos de DNA presentes a uma distância amplificável entre dois microssatélites idênticos, orientados em direções opostas (Reddy *et al.*, 2002). Para tanto, são usados microssatélites, usualmente de 16 a 25 pb, como iniciadores capazes de, em uma única reação de PCR, reconhecer os *loci* múltiplos no genoma, para amplificar principalmente as sequências inter e microssatélites de diferentes tamanhos. (Zietkiewicz *et al.*, 1994) Estes podem ser *di*, *tri*, *tetra* ou pentanucleotídeos, sendo ou não ancorados (Gupta *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994), ou mais usualmente ancorados nas extremidades 3' ou 5' com 1 a 4 bases degeneradas. De acordo com Kantety *et al.* (1995), as vantagens desta técnica são: sua capacidade "multiplex", sua alta frequência de polimorfismo, rapidez, simplicidade e baixo custo.

Além da cultura do milho, esta técnica tem sido usada com sucesso para estimar a existência de diversidade genética no nível intra e interespecífico em outras diferentes culturas, tais quais, arroz (Joshi *et al.*, 2000), trigo (Nagaoka & Ogiwara, 1997), feijão (Ajibade *et al.*, 2000), batata-doce (Huang & Sun, 2000), dentre outras (Kantety *et al.*, 1995).

Contudo, a utilização dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas, teoricamente, é viável em muitas das aplicações. O custo da tecnologia dos marcadores moleculares, o tempo consumido nas análises laboratoriais, o custo da avaliação das características, entre outros, determinam a viabilidade do seu uso em cada caso. (Borém e Miranda, 2009)

3.10. Análise de Agrupamento

As estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista, por quantificarem e informarem sobre o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre dois quaisquer genótipos. Entretanto, o número de estimativas obtidas é relativamente grande (igual a $n(n-1)/2$, em que n é o número de acessos considerados no estudo), o que torna impraticável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual daquelas estimativas. Assim, para realizar esta tarefa, faz-se uso de métodos de agrupamento ou de projeções de distâncias em gráficos bidimensionais, em que cada coordenada é obtida a partir da medida de dissimilaridade escolhida. (Cruz e Carneiro, 2006)

Para que estes métodos sejam realizados, é necessária a escolha de uma medida que quantificará o grau de semelhança entre dois vizinhos. Essas medidas, denominadas coeficientes de similaridade, podem ser divididas em: medidas de similaridade (quanto maior os valores observados, mais parecidos serão os indivíduos) e medidas de dissimilaridade (quanto maior os valores observados, menos parecidos serão os indivíduos).

Inúmeros são os métodos de agrupamento, sendo distintos pelo tipo de resultado a ser fornecido e pelas diferentes formas de definir a proximidade entre um indivíduo e um grupo já formado ou entre dois grupos quaisquer. Em todos os casos, não se conhece, *a priori*, o número de grupos a serem estabelecidos, e diferentes métodos proporcionam diferentes resultados. Os métodos mais utilizados são os de otimização e os hierárquicos.

No estudo da diversidade genética, dentre os métodos multivariados que podem ser aplicados, os mais comuns são os métodos de otimização de Ward e

os métodos hierárquicos de UPGMA. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Crossa e Franco, 2004; Cruz *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2008) O método UPGMA fundamenta-se na composição de grupos com base na média de distância entre os genótipos, enquanto o Ward utiliza a soma de quadrados das distâncias entre pares de genótipos. (Asensio, 1989; Martins, 2000; Cruz *et al.*, 2004)

Como o presente trabalho utilizou apenas um dos métodos de agrupamento, ou seja, o método hierárquico UPGMA, apenas este será contemplado nesta revisão.

3.10.1. Métodos Hierárquicos

Nos métodos hierárquicos, o objetivo final é a obtenção de um dendograma ou diagrama de árvore, em que os agrupamentos podem ser obtidos, subjetivamente, tomando-se por base as diferenças abruptas de mudança de nível no dendograma. (Asensio, 1989; Cruz e Regazzi, 1993)

Dentre os métodos comumente utilizados, destaca-se o UPGMA (*Unweigthed Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*). É um método não-ponderado de agrupamento aos pares, utilizando médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos (máximo ou mínimo) entre os genótipos considerados. Neste método, o dendograma é estabelecido pelos genótipos com maior similaridade. (Cruz e Carneiro, 2006)

3.10.2. Consistência do Agrupamento

A consistência do agrupamento é realizada após a obtenção do dendograma, quando se tem uma nova leitura da dissimilaridade ou similaridade entre os genótipos avaliados. Os novos coeficientes de semelhança indicados nos eixos são estabelecidos, de acordo com o método de agrupamento escolhido, e podem ser utilizados no estabelecimento de uma nova matriz de dissimilaridade, denominada matriz de coeficientes, de semelhança cofenética.

Segundo Sokal e Rohlf (1962), a adequação deste método se faz por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC). Este coeficiente é uma medida de concordância entre os valores originais de dissimilaridade e aqueles apresentados no dendograma. Quanto maior o valor de CCC, menor será a distorção provocada, ao agruparem-se os genótipos. Estes autores também relatam que,

dos métodos hierárquicos, o UPGMA é o que apresenta os dendogramas com CCC máximo.

3.10.3. Dispersão Gráfica (Análise das Coordenadas Principais - PCoA)

Uma maneira alternativa aos métodos de agrupamento, para a avaliação da diversidade dentro de um conjunto de genótipos, é a análise da dispersão gráfica, normalmente utilizando-se o espaço bidimensional. Uma desvantagem é a dificuldade do estabelecimento de grupos de similaridade de forma menos subjetiva, com base na simples inspeção visual da dispersão. Mesmo assim, esta tem sido a alternativa mais adequada em estudos de diversidade genética. (Cruz e Carneiro, 2006)

Existem várias técnicas que possibilitam a análise por meio de dispersão gráfica, como, por exemplo, Análise das Coordenadas Principais - PCoA. Estas técnicas são recomendadas quando se quer empregar a análise gráfica e quando se puder estimar variáveis a serem utilizadas em eixos cartesianos, que envolvem o máximo da variação disponível nos dados originais.

Inúmeros trabalhos que utilizaram a análise das coordenadas principais mostraram o quanto de variação ocorre entre os genótipos numa análise de RAPD. (Colombo *et al.*, 2000; Sera *et al.*, 2003)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Genético

Para iniciar um programa de seleção recorrente, é necessário escolher qual tipo de população deverá ser trabalhada, e estas populações, necessariamente, devem possuir um elevado potencial agrônomo. Neste sentido, por se tratar de melhoramento interpopulacional, foram definidas duas populações pertencentes a grupos heteróticos distintos: CIMMYT e Piranão.

A população CIMMYT é oriunda da Universidade Federal de Viçosa (UFV) - MG, pertencente ao grupo heterótico tipo “duro” e possui, como principal característica, um gene braquítico (porte mais baixo). A outra população, oriunda da mesma universidade, também possui um gene braquítico, porém pertence ao grupo heterótico do tipo “dentado”.

As populações mencionadas foram trabalhadas em Viçosa, pela UFV, até o 5º ciclo de seleção recorrente e, atualmente, é trabalhada em Campos dos Goytacazes, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Sendo este atual trabalho uma sequência no avanço de ciclos, pelo programa de seleção recorrente recíproca entre as famílias de irmãos completos, conduzido pela universidade.

4.2. Obtenção do 12º Ciclo de Seleção Recorrente Recíproca

Na Seleção Recorrente Recíproca, cada ciclo envolve três etapas básicas a serem seguidas: a) a geração de progênies ou famílias de irmãos completos; b)

a avaliação das famílias para a identificação das superiores; e c) a recombinação das sementes remanescentes correspondentes às famílias superiores, para a obtenção das populações em um ciclo mais avançado.

A metodologia utilizada foi, conforme descrito por Hallauer e Miranda Filho (1987), com algumas modificações, conforme consta resumidamente a seguir.

4.2.1. Geração das Famílias de Irmãos Completos e de Sementes S_1

O plantio, para a obtenção das famílias de irmãos completos e dos S_1 , foi realizado em março de 2008 no Campo Experimental da UENF, anexo ao Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Para tanto, uma amostra das duas populações CIMMYT e Piranão, do ciclo de seleção recorrente anterior, foi semeada em fileiras alternadas de 6,00 m de comprimento, no espaçamento de 1,00 m entre fileiras e 0,40 m entre plantas, a uma profundidade de 0,05 m no sulco, semeando-se três sementes por cova. Após 30 dias da emergência das plântulas, foi realizado o desbaste, mantendo-se 15 plantas por fileira.

A adubação foi realizada de acordo com a análise de solo, aplicando-se 800 Kg.ha⁻¹ de N-P-K na formulação 04-14-08. Foram realizadas duas adubações de cobertura: uma após os 30 dias de plantio, com 300 Kg.ha⁻¹ de sulfato de amônio na formulação 20-00-20, e a segunda, aos 15 dias após a primeira adubação de cobertura, utilizando-se 260 Kg.ha⁻¹ de sulfato de amônio na formulação 20-00-20. Os tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para esta cultura. (Fancelli e Dourado Neto, 2000)

Foram semeadas 300 linhas, constituídas da mistura balanceada das sementes recombinadas do último ciclo de seleção recorrente intrapopulacional. Na etapa de obtenção de progênies de irmãos completos, as fileiras de plantio foram enumeradas, bem como suas respectivas plantas (1 a 15), de modo a facilitar a identificação dos cruzamentos, preferencialmente, realizados entre os pares de fileiras. As polinizações foram realizadas manualmente. As espigas foram, antecipadamente, cobertas, antes da liberação do estilo-estigmas, utilizando sacolas de plástico transparente, especial para tal finalidade. Ao mesmo tempo, os pendões eram cobertos com sacos de papel tipo "Kraft", cuidado necessário, uma vez que o pólen perde sua viabilidade polínica após oito horas.

Assim, qualquer pólen viável no saco de papel no dia seguinte só poderá ter sido proveniente do pendão coberto.

Os cruzamentos foram feitos em plantas prolíficas selecionadas dentro de cada par de fileiras, de maneira que as espigas superiores foram cruzadas e as espigas inferiores (segunda espiga) foram autofecundadas, na parte da manhã, quando os pares de fileiras eram percorridos e as plantas que se apresentavam aptas a serem cruzadas eram identificadas: aquelas que, ao mesmo tempo, estavam liberando pólen e apresentavam espigas receptivas. No outro dia, foram realizados os cruzamentos, colocando-se a sacola de papel “Kraft”, contendo o pólen do pendão, sobre a espiga e identificando-se o número da fileira e o número de cada planta no saco de papel, com caneta de tinta resistente para não apagar.

No total, foram obtidas 138 famílias de irmãos completos e 276 progênies autofecundadas (S_1). As sementes S_1 foram armazenadas em câmara fria, e as famílias de irmãos completos, utilizadas para ensaio de competição.

4.2.2. Avaliação das Progênies de Irmãos Completos

4.2.2.1. Local e Delineamento Experimental

As 138 famílias de irmãos completos, obtidas na etapa anterior, foram avaliadas em outubro de 2008, em delineamento em blocos ao acaso, em dois ambientes (Campos dos Goytacazes - Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo e Itaocara - Estação Experimental da PESAGRO - RIO), com repetições dentro de “sets”. Dado o grande número de tratamentos (138 famílias), estas foram agrupadas em seis “sets”, contendo cada um 23 famílias e quatro testemunhas ($C_5 \times P_5$; $C_8 \times P_8$; $C_{11} \times P_{11}$; BR 106) (Apêndice A), totalizando 27 tratamentos. Cada unidade experimental foi constituída de uma fileira de 5,00 m de comprimento, espaçadas de 1,00 m entre fileiras, e 0,2 m entre plantas. No plantio, foram semeadas três sementes por cova a uma profundidade de 0,05 m e, após 30 dias após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando uma planta por cova.

A adubação foi realizada, de acordo com a análise de solo, aplicando-se $800 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N-P-K na formulação 04-14-08. Foram realizadas duas adubações de cobertura: uma após os 30 dias de plantio, com $300 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de sulfato de amônio na formulação 20-00-20, e a segunda, aos 15 dias após a primeira adubação de cobertura, utilizando $260 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de sulfato de amônio na formulação 20-00-20. Os tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para esta cultura. (Fancelli e Dourado Neto, 2000)

Após o florescimento das plantas, foram avaliadas as seguintes características, em cada unidade experimental:

- a) Número de Dias para o Florescimento (FLO): número de dias decorridos desde o plantio até a exteriorização do estilo-estigma da espiga (flor feminina) de 50 % das plantas da unidade experimental;
- b) Altura de Planta (ALP): altura média de seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da folha-bandeira, em metros;
- c) Altura de Espiga (ALE): altura média das mesmas seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da espiga superior no colmo, em metros;
- d) Número de Plantas (NPL): número total de plantas no momento da colheita;
- e) Número de Plantas Quebradas (NPQ): número de plantas que se apresentaram quebradas, abaixo da espiga superior, no momento da colheita;
- f) Número de Plantas Acamadas (NPAC): número de plantas que apresentaram ângulo de inclinação superior a 45° com a vertical, no momento da colheita; e
- g) Empalhamento (EMP): número de espigas mal empalhadas (que deixam grãos expostos), no momento da colheita.

Após a colheita, foram obtidos os dados das seguintes características:

- h) Número de Espigas (NESP): número total de espigas colhidas;
- i) Número de Espigas Doentes (NED): número de espigas manifestando sintomas de doença;
- j) Número de Espigas Atacadas por Pragas (NEAP): número de espigas brocadas;
- k) Peso de Espigas (PES): peso, em gramas por parcela, das espigas despalhadas, com precisão de centésimos de quilograma;
- l) Produção (PROD): produtividade estimada com base no peso dos grãos debulhados, em quilogramas por metro de fileira; e
- m) Peso de 100 grãos (P100): peso, em gramas, de uma amostra de 100 grãos sadios, com precisão de centésimos de grama.

A colheita foi realizada após quatro meses do plantio, ou seja, fevereiro de 2009.

4.2.2.2. Seleção das Progênes Superiores - Análise Estatística

4.2.2.2.1. Análise de variância

Os dados das características foram submetidos à análise de variância, conforme o delineamento ao acaso em blocos, de acordo com o modelo genético estatístico proposto por Hallauer e Miranda Filho (1987):

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + S_j + ES_{ij} + R/ES_{ijk} + G/S_{jl} + EG/S_{ijl} + e_{ijkl},$$

onde:

μ = média experimental;

E_i = efeito fixo do i-ésimo ambiente;

S_j = efeito do j-ésimo “set”;

ES_{ij} = efeito da interação de ambientes e “sets”;

R/ES_{ijk} = efeito da k-ésima repetição dentro da interação entre o i-ésimo ambiente e o j-ésimo “set”;

G/S_{jl} = efeito do l-ésimo genótipo dentro do j-ésimo “set”;

EG/S_{ijl} = efeito da interação de ambientes e genótipos dentro do j-ésimo “set”;

e_{ijkl} = erro experimental.

A análise de variância dos dados foi realizada empregando-se os recursos computacionais do Programa SAS. (SAS,1985)

Na Tabela 1, é apresentado o esquema da análise de variância conjunta, com as respectivas esperanças de quadrados médios, sendo que, com exceção de ambientes, as demais fontes de variação foram consideradas aleatórias.

Tabela 1: Análise de variância e esperança de quadrados médios.

FV	GL	QM	E (QM)	F
Ambientes(E)	$e - 1$	QME	$\sigma^2 + rg\sigma_{ES}^2 + g\sigma_{R/ES}^2 + r\sigma_{EG/S}^2 + grs\theta_E^2$	QME/QMES
Sets (S)	$s - 1$	QMS	$\sigma^2 + er\sigma_{G/S}^2 + egr\sigma_S^2$	QMS/QMG
ExS	$(e - 1)(s - 1)$	QMES	$\sigma^2 + r\sigma_{EG/S}^2 + g\sigma_{R/ES}^2 + gr\sigma_{ES}^2$	QMES+QMR/ QMB+QMEG
Repetições (R) / ExS	$es (r - 1)$	QMB	$\sigma^2 + g\sigma_{R/ES}^2$	QMB/QMR
Genótipos (G) / S	$s (g - 1)$	QMG	$\sigma^2 + er\sigma_{G/S}^2$	QMG/QMR
ExG / S	$s (g - 1)(e - 1)$	QMEG	$\sigma^2 + r\sigma_{EG/S}^2$	QMEG/ QMR
Resíduo	$es (g - 1)(r - 1)$	QMR	σ^2	-
Total	$egrs - 1$			

4.2.2.2.2. Estimacão dos Parâmetros Genéticos

Depois de obtidas as esperanças do quadrado médio apresentados na Tabela 1, foram obtidas as estimativas dos componentes de variância.

O estimador da variância genotípica entre famílias foi expresso por:

$$\sigma_g^2 = (\text{QMG}-\text{QMR})/er$$

em que:

QMG = quadrado médio dos genótipos;

QMR = quadrado médio do resíduo;

e = ambiente; e

r = repetição.

O estimador da variância fenotípica entre famílias foi expresso por:

$$\sigma_f^2 = \text{QMG}/er$$

em que:

QMG = quadrado médio dos genótipos;

e = ambiente; e

r = repetição.

A herdabilidade, com base na média de famílias, foi estimada pela expressão:

$$h_{\bar{x}_f}^2 = \sigma_g^2 / \sigma_f^2$$

Coeficiente de variação genético: $CV_g (\%) = \left[100 \sqrt{\sigma_g^2 / \bar{x}} \right]$

Índice de variação: $I_v (\%) = 100 (CV_g / CV_e)$

Os cálculos das estimativas dos parâmetros genéticos foram realizados para serem estimados os ganhos por seleção (GS), o ganho no avanço do 11º ciclo para o 12º ciclo, pela expressão:

$$GS = (\bar{X}_s - \bar{X}_0) \cdot h_{\bar{x}_f}^2$$

Em que: \overline{X}_s = média das famílias de irmãos completos selecionados com base no índice de seleção;

\overline{X}_0 = média de todas as famílias avaliadas; e

$h_{X_f}^2$ = herdabilidade com base na média das famílias

4.2.2.2.3. Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978)

Na etapa de selecionar das famílias superiores para a realização de ferramentas moleculares e posterior recombinação, utilizou-se a potencialidade do índice de seleção de Mulamba e Mock (1978). Este índice foi selecionado, porque ratificou os resultados obtidos pela seleção direta dos indivíduos, baseado na média de produção. Procurou-se obter, na seleção de famílias mais produtivas e com maior peso de grãos, também a redução nas médias das seguintes características: número de plantas quebradas, número de plantas acamadas, número de espigas mal empalhadas, número de espigas atacadas por pragas (característica descartada nas análises devida obtenção de valores negativos) e doenças. As estimativas de predição dos ganhos de seleção foram realizadas com base nas médias dos dois ambientes aqui apresentados.

Nas análises computacionais, foram dados pesos para cada característica analisada que demonstrou diferenças significativas entre os genótipos, pelo teste F, na análise de variância. Estes pesos foram escolhidos ao acaso, mediante tentativas, porém, atentando-se para os ganhos mais favoráveis para cada característica em questão, deu-se ênfase para peso de grãos (uma das características mais importantes do trabalho). Os pesos econômicos utilizados nos índices de seleção foram: o desvio-padrão genotípico, coeficiente de variação genotípico, índice de variação, herdabilidade e pesos atribuídos por tentativas.

Ao todo, 40 famílias avaliadas em cada população foram selecionadas para a composição do lote a ser utilizado para o estudo da divergência genética, via marcadores moleculares ISSR. O programa computacional GENES (Cruz, 2006) foi utilizado para a realização das análises.

4.3. Avaliação da Diversidade Genética por Marcador Molecular

Nesta etapa de análise da diversidade via marcadores de DNA, parte das sementes S_1 , armazenada da primeira etapa, foi plantada na Unidade de Apoio à Pesquisa - UENF em vasos com terra, para coletar o material vegetativo para a

próxima etapa do vigente trabalho. A parte aérea de 10 plântulas foi coletada, em “Bulk”, dos 40 genótipos superiores de cada população, para a extração do DNA. Este material foi envolvido por papel alumínio, devidamente identificado com o número do genótipo coletado, acondicionado no isopor contendo nitrogênio líquido e levados para o ultrafreezer (-86 °C) e tubos fechados com capacidade de 15 ml. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF), em Campos dos Goytacazes - RJ.

4.3.1. Extração do DNA

As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido, e parte do material macerado, cerca de 100 mg, foi transferido para um tubo *ependorf*, com capacidade de 1,5 ml, para posterior extração.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit comercial: *Genomic DNA Extraction kit* (YGP 100 RBC).

4.3.2. Quantificação do DNA

Para avaliação da concentração e da qualidade de DNA, as amostras foram avaliadas em gel de agarose a 1,0 % e coradas com a mistura de “Blue Juice” 6X com “Gel Red”, na proporção de 1:1. Como padrão, foi utilizada a amostra de DNA, com a concentração conhecida de DNA de fago λ (10, 20, 30, 50 e 100ng). As imagens foram reveladas pelo sistema “MiniBis Pro”.

Posteriormente, as amostras de trabalho foram padronizadas na concentração de $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ e mantidas a -20 °C.

4.3.3. Amplificação do DNA Via Marcador ISSR

Foram utilizados 23 iniciadores, sendo 16 dinucleotídeos, cinco trinucleotídeos e dois tetranucleotídeo. Destes iniciadores, sete foram sintetizados pela *RW Genes* – (AC)₉; (GA)₉T; (GA)₈CA; (GA)₈GC; (CAGA)₄; (CTC)₅RC; (GA)₈YC– e dezesseis pela *Invitrogen* – (AC)₈T; (ATG)₆; (GT)₈YC; (CT)₈RG; (AG)₈YA; (AC)₈CT; (AG)₈YT; (CT)₈G; (GTG)₃GC; (AC)₈CG; (GT)₆CC; (CAC)₃GC; (GGAT)₃GA; (AC)₈YG; (GAA)₆AA; (AG)₈C.

O teste para o marcador ISSR foi conduzido com dez genótipos de milho, sendo: cinco da população CIMMYT e cinco da população Pirão. Após

estabelecidas as condições adequadas das reações, estas foram distribuídas para toda população.

As reações de amplificação, via PCR, foram realizadas de acordo com a metodologia sugerida por Zietkiewicz *et al.* (1994), com modificações. No entanto, as concentrações adotadas para um volume final de 13 μL contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 1,3 μL de Tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl a pH 8,4, 1 % de Triton X-100); 0,78 μL de 25 mM MgCl_2 ; 1,04 μL de 2 mM dNTPs; 1 μL (5 %) de DMSO (Dimethyl Sulfoxide); 0,78 μL de 0,5 mM de iniciador (*RW Genes e Invitrogen*); 0,12 μL de 5U de Taq DNA polimerase “Fermentas” e 2 μL de DNA genômico (5ng/ μL), completando o volume final com água ultrapura.

As amplificações para otimização da temperatura ótima de anelamento, foram realizadas no termociclador de gradiente da marca Eppendorf, de acordo com o seguinte programa: 3 min de desnaturação a 94 °C; seguido de 35 ciclos de amplificação a 94 °C a 1 min; 1 min com T_m – “temperature of melting” – e 72 °C por 3 min. Após os 35 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C.

4.3.4. Eletroforese

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5 % e tampão TAE 1X, a 100 volts por duas horas, e posteriormente, corados com a mistura de “Blue Juice” 6X com “Gel Red”, na proporção de 1:1. O marcador *Ladder* de 250 pares de bases foi utilizado para a determinação do tamanho dos fragmentos gerados.

Os géis foram fotodocumentados no sistema de revelação, sob luz ultravioleta, no equipamento Mini Bis Pro (BioAmérica).

4.3.5 Análise dos Dados Moleculares

Foi gerada uma matriz de dados binários, a partir das bandas polimórficas do marcador molecular utilizado, ISSR. Nesta matriz, foram atribuídos 1 à presença e 0 à ausência de banda. Para calcular a distância entre os pares de genótipos, adotou-se como medida de dissimilaridade, o Complemento Aritmético do Índice de Jaccard, dado por:

$$C_{ij} = 1 - \frac{a}{a + b + c}, \text{ onde:}$$

a= 1 - 1: número de coincidência do tipo 1 e 1.

b= 1 - 0: número de discordância do tipo 1 e 0.

c= 0 - 1: número de discordância do tipo 0 e "1".

4.3.6. Análise de Agrupamento

Nas análises dos resultados, foram utilizados os recursos computacionais do programa GENES (Cruz, 2006). Já para a geração da matriz de distâncias com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard, foram utilizados, para o agrupamento dos genótipos, os métodos de UPGMA e PCoA (Análise das Coordenadas Principais), por meio dos Programa R, utilizando o pacote "cluster" (www.r-project.org) e DARwin 5 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006), respectivamente.

A consistência entre a matriz de distância e os agrupamentos foi implementada pelo uso do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), cuja estimativa é a própria correlação de Pearson entre os elementos correspondentes da matriz de distâncias genéticas e a matriz gerada pelo agrupamento. Trata-se de um coeficiente de correlação produto-momento, que quantifica a concordância entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz de dissimilaridade cofenética, expresso pelo dendrograma. (Sneath e Sokal, 1973; Cruz *et al.*, 2004)

4.4. Recombinação das Famílias Superiores

Dos 40 genótipos de cada população, identificados como superiores (etapa de avaliação de campo), foram identificados os mais divergentes (etapa via marcadores de DNA), de forma que os materiais recombinados de maneira independente, em cada população, foram superiores e divergentes. As recombinações foram conduzidas de maneira a assegurar que cada genótipo se cruzasse com todos os outros. O plantio foi realizado no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes – RJ.

No campo, foram plantadas 15 plantas em fileiras simples de 6,00 m de comprimento, com espaçamento de 1,00 m entre fileiras e 0,40 m entre plantas dentro da fileira. Os tratos culturais foram realizados conforme as necessidades da cultura e de acordo com as recomendações para a cultura (Fancelli e Dourado Neto, 2000). Esta etapa ocorreu pouco antes do encerramento das atividades laboratoriais, via marcador molecular.

No total, foram cultivados 40 genótipos de cada população em blocos diferentes. De posse das análises via marcador molecular, alguns genótipos foram eliminados do campo. Dos 40 genótipos de cada uma das populações, CIMMYT e Piranão, 20 e 18, respectivamente, foram eliminados, permanecendo 42 genótipos para compor as populações melhoradas (12º ciclo). Esta seleção teve como objetivo maximizar a variabilidade genética dessas populações, bem como manter e até mesmo ampliar a distância genética entre elas.

Na eliminação dos genótipos para a composição do lote de recombinação, alguns fatores foram considerados. Dentre eles: eliminação dos genótipos considerados contaminantes, ou seja, aqueles pertencentes a uma determinada população, mas geneticamente próximos de outra população; eliminação dos genótipos de uma das populações pelos métodos UPGMA e coordenadas principais, que foram agrupados com indivíduos pertencentes à outra população; eliminação de genótipos geneticamente próximos, mantendo aqueles cujas médias de produção de grãos foram superiores.

Iniciou-se, 75 dias após o plantio, o processo de recombinação das famílias selecionadas. As polinizações foram realizadas manualmente. Nesta etapa, como cada linha representa uma família, todas as linhas foram percorridas diariamente, de forma a serem vistas espigas e pendões aptos à polinização. As espigas foram cobertas, antes da emissão do estilo-estigmas, com sacolas plásticas e, em seguida, efetuou-se a preparação dos pendões, cobrindo-os com sacos de papel "Kraft" aqueles que estavam em fase inicial de liberação de grão de pólen. Estes pendões foram utilizados no dia seguinte, garantindo, desta forma, a viabilidade do pólen contido em todos os sacos de papel da população em questão e, assim, possibilitar a recombinação de todos os materiais. Esta amostra de grãos de pólen foi utilizada apenas para as espigas que não compuseram a referida amostra de pólen, excluindo a existência de autofecundação.

Tal procedimento foi repetido por diversos dias, em ambas as populações, até que os pendões estivessem liberando pólen e as espigas de todas ou da maioria das plantas tivessem sido fecundadas. Em cada fileira, foram polinizadas no mínimo nove espigas, que, em seguida, foram debulhadas e as sementes misturadas, formando a nova população de famílias de irmãos completos no programa de seleção recorrente de milho da UENF.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação das Progênes de Irmãos Completos e Análise de Variância

Na Tabela 2 e Tabela 3, há as estimativas dos valores e as significâncias dos quadrados médios, bem como as médias e os coeficientes de variação experimental, com base na média das 13 características avaliadas, em 138 famílias de irmãos completos, nos dois ambientes avaliados, Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ.

Verifica-se que não houve diferenças significativas pelo teste F em nível de 5 % e 1 % de probabilidade, para Ambiente (E), referentes às características número de plantas acamadas e número de espigas atacadas por pragas. Isto significa que, para as demais características em que houve significância, os ambientes foram considerados satisfatoriamente distintos para gerarem diferenças entre as características avaliadas. Admite-se também a representatividade de Campos dos Goytacazes (Norte Fluminense) e Itaocara (Noroeste Fluminense), enquanto locais distintos para a avaliação de progênes em seleção recorrente, bem como em ensaios de comparação de desempenho agrícola.

As características FLO, ALP, ALE, NPL, NPQ, NPAC, EMP, NED, NEAP, PES, PROD e P100 revelaram diferenças significativas para “sets” (Tabela 2 e Tabela 3), demonstrando que a eficiência e a necessidade do uso de delineamento em blocos com divisão em “sets”. Deduz-se que, na ausência dessa divisão, poderiam produzir variações resultando em perda de precisão dos

experimentos. Levando-se em consideração a interação Ambiente x “set” (ExS), nota-se que as características FLO, ALP, ALE, NPQ, EMP, NESP, NED, NEAP, PES e PROD revelaram diferenças significativas (Tabela 3 e Tabela 4), denotando que os genótipos, aleatoriamente distribuídos nos “sets”, mostraram modificações fenotípicas estimuladas pelas mudanças edafoclimáticas dos ambientes.

Para a fonte de variação Genótipo dentro de “set” (G/S), apenas as características NPAC e NEAP apresentaram ausência de significância. As demais apresentaram significâncias em nível de 5 % e 1 % de probabilidade pelo teste F, demonstrando haver variabilidade genética a ser explorada em ciclos futuros, possibilitando progressos com a seleção.

A presença de valor significativo para a interação Ambiente x genótipo dentro de “set” (ExG/S), para as características FLO, NPQ, PES e PROD, evidencia que as famílias não mantiveram o mesmo comportamento fenotípico para tais características nos dois ambientes, o que significa que esta interação não impede a implementação de um único programa de melhoramento para os dois ambientes, uma vez. Ferrão (1985), Santos (2005), Tardin (2006) e Gabriel (2006) também encontraram interações significativas e concluíram que o importante para a seleção é a expressão das médias fenotípicas (Apêndice A) das famílias em ambos os ambientes. A obtenção destes ganhos por seleção é possível, sobretudo com a potencialidade de índices de seleção. As demais características foram não-significativas.

A variabilidade genética, o método de seleção adotado, o tamanho da população e a influência do ambiente são fatores que interferem, na taxa de elevação das frequências gênicas favoráveis, como efeito da seleção. (Paterniani, 1980) O aumento dessas taxas equivale a uma maior concentração de alelos favoráveis na população melhorada a cada ciclo de seleção recorrente e, como consequência, o incremento da média populacional para as diversas características. (Hallauer e Miranda Filho, 1988) A obtenção do 12º ciclo de seleção recorrente entre famílias de irmãos completos de milho na UENF, conseguiu manter a variabilidade genética e incrementar de forma favorável as médias das características avaliadas.

Tabela 2: Resumo da análise de variância com os respectivos quadrados médios e graus de liberdade (GL), estimativas dos coeficientes de variação experimental (CV %) e das médias para as características avaliadas, após o florescimento, no ensaio em delineamento em blocos ao acaso agrupados em “sets”, em dois ambientes, Campos dos Goytacazes e Itaocara – RJ, no ano agrícola de 2008/2009.

FV	GL	Quadrado Médio ^{1/}						
		FLO	ALP	ALE	NPL	NPQ	NPAC	EMP
Ambientes (E)	1	336,3951 **	62,9936 **	60,1714 **	2196,1261 **	1647,5537 **	2,2909 ^{ns}	381,9195 **
Sets (S)	5	21,4046 **	0,3050 **	0,3000 **	18,4759 **	15,3931 *	15,1774 **	59,9401 **
ExS	5	23,1421 **	0,3247 **	0,1542 **	10,9603 ^{ns}	16,3294 *	7,5173 ^{ns}	6,6656 *
Repetições (R) / ExS	12	33,9541 **	0,2133 **	0,1595 **	10,7918 *	13,2471 **	8,4089 ^{ns}	3,4583 ^{ns}
Genótipos (G) / S	132	16,3818 **	0,0733 **	0,0581 **	13,5269 **	13,6061 **	6,0426 ^{ns}	9,4863 **
ExG / S	132	8,3374 *	0,0373 ^{ns}	0,0260 ^{ns}	5,7937 ^{ns}	7,2289 *	4,9110 ^{ns}	3,3323 **
Resíduo	264	5,9500	0,0321	0,0232	4,9517	5,4673	4,7494	2,2761
CV (%)	-	3,3510	8,8163	12,4014	9,6858	62,7889	127,2233	56,7174
Média Geral	-	72,7916	2,0330	1,2280	22,9744	3,7240	1,7130	2,6600
Média em Campos	-	73,5580	1,6952	0,8977	24,9783	2,0145	1,6486	1,8370
Média em Itaocara	-	72,0111	2,3769	1,5643	20,9336	5,4649	1,7786	3,4982

^{1/} FLO = número de dias para florescimento; ALP = altura de planta; ALE = altura de espiga; NPL = número de plantas; NPQ = número de plantas quebradas; NPAC = número de plantas acamadas; EMP = empalhamento.

^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade; * Significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade; ** Significativo pelo teste F a 1 % de probabilidade.

Tabela 3: Resumo da análise de variância com os respectivos quadrados médios e graus de liberdade (GL), estimativas dos coeficientes de variação experimental (CV %) e das médias para as características avaliadas, após a colheita, no ensaio em delineamento em blocos ao acaso agrupados em “sets”, em dois ambientes, Campos dos Goytacazes e Itaocara – RJ, no ano agrícola de 2008/2009.

FV	GL	Quadrado Médio ^{1/}					
		NESP	NED	NEAP	PES	PROD	P100
Ambientes(E)	1	798,2028 **	294,7418 **	0,0031 ^{ns}	99911345,6 **	251532681,1 **	1189,8583 **
Sets (S)	5	69,9720 ^{ns}	30,3097 **	2,6079 **	1437249,5 *	4669034,2 *	72,8218 **
ExS	5	83,3424 *	33,8992 **	1,0983 *	2266869,2 **	6015917,7 **	16,7337 ^{ns}
Repetições (R) / ExS	12	75,8926 *	22,0907 **	1,5894 **	2451070,8 **	7438730,6 **	14,3471 ^{ns}
Genótipos (G) / S	132	72,3213 **	9,6193 *	0,3897 ^{ns}	1231798,2 **	3621298,6 **	22,9124 **
ExG / S	132	38,1289 ^{ns}	8,8282 ^{ns}	0,4113 ^{ns}	890748,4 **	2714704,1 **	7,8620 ^{ns}
Resíduo	264	34,0880	7,0595	0,4186	614004,4	1871121	8,1869
CV (%)	-	18,9198	54,0284	287,7406	25,6628	27,3228	9,2656
Média Geral	-	30,8592	4,9177	0,2249	3053,382	5006,399	30,8806
Média em Campos	-	29,6775	5,6413	0,2283	2632,971	4340,942	29,4059
Média em Itaocara	-	32,0627	4,1808	0,2214	3481,550	5684,133	32,3825

^{1/} NESP = número de espigas; NED = número de espigas doentes; NEAP = número de espigas atacadas por pragas; PES = peso de espigas; PROD = produção (Kg/ha); P100 = peso de cem grãos.

^{ns} Não significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade; * Significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade; ** Significativo pelo teste F a 1 % de probabilidade.

A variabilidade genética é necessária para a condução de um programa de seleção recorrente. Porém, a significância para as características NPQ, EMP, NED e NEAP são consideradas indesejáveis em populações sob seleção, quando, após alguns ciclos, espera-se que a população apresente uniformidade de altura, florescimento e empalhamento.

A característica que apresentou o menor valor de coeficiente de variação (CV %) foi observada em número de dias para o florescimento (FLO), com valor de 3,35 %. Quanto à característica que apresentou maior coeficiente de variação, foi observado em número de espigas atacadas por pragas (NEAP), com o valor de 287,74 %. Quanto menor o coeficiente de variação de uma característica maior é a precisão experimental. E os coeficientes de variação altos podem ser interpretados com baixa precisão experimental, prejudicando as inferências que podem ser feitas em relação às características que possuem. (Marques, 2000) Resultados similares foram obtidos por Tardin (2006), em avanço do ciclo com seleção recorrente recíproca em família de irmãos completos, monitorada por marcadores moleculares em milho comum (CIMMYT e Piranão), observando menor valor de coeficiente de variação para FLO e maior valor para NED.

Coimbra (2000), trabalhando com milho comum, encontrou valores muito altos para CV_e (%) para as características: proporção de plantas quebradas, proporção de plantas acamadas, proporção de espigas doentes e empalhamento.

Das 12 características avaliadas pelo programa de seleção recorrente, as de maior preocupação, por parte dos melhoristas em milho comum, são a produção (PROD) e o peso de espiga (PES). Nota-se que, para todas as fontes de variação, constatou-se a significância para estas duas características, sendo que, quando considerado somente o "set", apresentaram significância em 5 % e, nas demais fontes de variação, apresentaram significância em nível de 1%. Baseando-se nestes dados, pode-se verificar que as diferenças de ambiente não foram suficientemente consideráveis para o estabelecimento de programas de melhoramento distintos para Campos dos Goytacazes e Itaocara, comprovando a condução de um único programa de melhoramento na região Norte e Noroeste Fluminense.

Hallauer e Miranda Filho (1988), de todo modo, enfatizam que a avaliação de progênie, em mais de um local, melhora a eficiência do processo seletivo e permite a obtenção de estimativas mais consistentes dos componentes da

variância. Segundo Carvalho *et al.* (2003), quando se pretende obter materiais genéticos para ambientes mais amplos, torna-se necessário efetuar avaliações desses materiais em mais de um local, possibilitando as estimativas mais consistentes dos componentes da variância.

5.2. Estimação dos Parâmetros Genéticos

Encontram-se dispostas, na Tabela 4, as estimativas das variâncias genotípica (σ_g^2); fenotípica (σ_f^2); coeficientes de variação genética (CV_g); índice de variação I_v (%); coeficiente de herdabilidade, com base na média de famílias ($h_{X_f}^2$); as médias de cada característica e o coeficiente de variação ambiental (CV_e) para as 12 características avaliadas no 12º ciclo de seleção recorrente recíproca, em famílias de irmãos completos em milho CIMMYT e Piranão, em Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ.

O conhecimento das estimativas dos parâmetros genéticos permite, ao melhorista, gerar informações de grande utilidade em relação às diferentes características avaliadas na população com a qual se trabalha, sendo capaz de orientar qual estratégia mais apropriada de seleção, bem como o sucesso na predição em programas de melhoramento.

Observa-se também a variância genotípica com valores relativamente altos para as características FLO, NPL, NPQ, EMP, NESP, PES, PROD e P100, acompanhadas de valores de herdabilidade, com base na média de famílias acima de 40 % e índice de variação com magnitudes superiores a 0,6. O que indica a possibilidade de identificação de famílias superiores para as características mencionadas, sobretudo, quanto ao rendimento de grãos e peso de espigas.

As características, como número de plantas quebradas (NPQ), número de plantas acamadas (NPAC), empalhamento (EMP) e número de espiga doente (NED), foram as que apresentaram elevados valores de coeficiente de variação ambiental, 62,79 %, 127,22 %, 56,72 % e 54,03 % respectivamente.

Gabriel (2006), avaliando famílias de irmãos completos em milho comum, e Daros (2003), famílias de irmãos completos e S_1 em milho pipoca, também encontraram valores elevados para coeficiente de variação para estas características. Porém, de acordo com Coimbra (2000), esses valores altos de

coeficiente de variação para essas características são esperados, de acordo com informações disponíveis na literatura sobre o milho.

Tabela 4: Estimativas das variâncias genóticas (σ_g^2), fenotípica (σ_f^2), coeficientes de variação genética $CV_g(\%)$, índice de variação $I_v(\%)$, coeficiente de herdabilidade ($h_{x_f}^2$), as médias de cada característica e o coeficiente de variação ambiental $CV_e(\%)$.

Características ^{1/}	Parâmetros genéticos ^{2/}						
	σ_g^2	σ_f^2	$CV_g(\%)$	$I_v(\%)$	$h_{x_f}^2$	Média	$CV_e(\%)$
FLO	2,6080	4,0955	2,21	66,22	63,68	72,79	3,35
ALP	0,0103	0,0183	4,99	56,63	56,15	2,03	8,82
ALE	0,0087	0,0145	7,59	61,27	60,10	1,23	12,40
NPL	2,1438	3,3817	6,37	65,70	63,39	23	9,69
NPQ	2,0347	3,4015	38,55	61,40	59,82	3,70	62,79
NPAC	0,3233	1,5107	33,25	26,14	21,40	1,71	127,22
EMP	1,8026	2,3716	50,47	88,99	76,01	2,66	56,72
NESP	9,5583	18,0803	9,97	52,71	52,87	31	18,92
NED	0,6400	2,4048	16,25	30,09	26,61	4,92	54,03
PES	154448,4	307945,5	12,87	50,17	50,15	3053	25,66
PROD	437544,4	905324,6	13,21	48,37	48,33	5006	27,32
P100	3,6814	5,7281	6,21	67,03	64,27	30,88	9,27

^{1/} FLO = número de dias de florescimento; ALP = altura de plantas; ALE = altura de espiga; NPL = número de plantas; NPQ = número de plantas quebradas; NPAC = número de plantas acamadas; EMP = empalhamento; NESP = número de espigas; NED = número de espigas doentes; PES = peso de espiga (g/parcela); PROD = produção (kg/ha) e P100 = peso de 100 grãos (gramas).

Pode-se observar que, com exceção da característica número de plantas acamadas (NPA), as outras características, altura de planta (ALP) e peso de 100 grãos (P100), apresentam um $CV(\%)$ baixo, enquanto, para a característica produção (PROD), um $CV(\%)$ médio (27,32 %), o que indica um médio controle experimental.

De acordo com a classificação de Scapim *et al.* (1995), elaborada levando-se em consideração à cultura estudada, o milho e a natureza das características avaliadas, o coeficiente de variação da característica produção é considerado médio, o que demonstra uma boa precisão na condução dos experimentos.

Considerando o número de espigas mal empalhadas (EMP), uma forma de tentar reduzir o coeficiente de variação em experimentos futuros seria a alteração no método de avaliação em nível de campo. Miranda *et al.* (2003), avaliando o potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho pipoca, empregaram uma classificação sugerida pelo Centro International de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), onde é proposta uma escala de 1 a 5

para classificar as espigas, desde completamente empalhadas até a ampla exposição dos grãos e abertura da palha. Desta forma, esses autores obtiveram o CV_e de 27,9 %, comprovando a eficiência do método.

As estimativas do coeficiente de variação genético (CV_g) permitem, ao melhorista, ter uma noção da grandeza relativa das mudanças que podem ser obtidas por meio de seleção, ao longo de um programa de melhoramento. Observa-se na Tabela 4 que, de maneira geral, as características apresentaram elevados valores de CV_g , destacando-se PROD, NPQ, NPAC, EMP, NED e PES, o que indica boas chances de sucesso em programas de melhoramento que utilizem essa população, visando à seleção para essas características. Gabriel (2006), no 10º ciclo de seleção do mesmo material deste estudo, também identificou valores altos para as características PROD, NPQ, NPAC, EMP e NED, além de NPL (número de plantas), NESP (número de espiga) e NEAP (número de espigas atacada por pragas).

Os valores das estimativas dos índices de variação foram satisfatórios para as características avaliadas. Os resultados destes parâmetros indicam a presença de variabilidade genética suficiente na população em estudo e contribuem para a tomada de decisão quanto ao método de melhoramento a ser utilizado no programa em questão.

Quanto ao coeficiente de herdabilidade esta é uma estimativa que permite avaliar a possibilidade de sucesso com a seleção, contudo, esta estimativa permite inferir que há expressiva variação genética entre as progênies, condição essa muito favorável para a seleção. (Silva, 2006) No caso dos caracteres avaliados, para todos $h^2_{X_f}$ as populações, a , para a seleção na média das progênies, apresenta oscilação nos valores de 21,4 % a 76,01 %. Para a maioria das características, os valores foram superiores a 50 %, com exceção das características NPA e NED, que apresentaram valores de 21,4 % e 26,6 %, respectivamente. Gabriel (2006), que trabalhou com as mesmas populações do presente estudo no avanço do 10º ciclo, observou o $h^2_{X_f}$ para a produção (PROD), no valor de 78,79 % e peso de espiga (PES) 78,02 %. No presente trabalho, para estas características em relevância, observou-se um $h^2_{X_f}$ para PROD no valor de 48,33 % e PES no valor de 50,15 %, permitindo, ainda assim, uma boa oportunidade para a obtenção de genótipos superiores, visto que estes

valores indicaram que a característica observada em grande parte é herdável pelos descendentes de seus genitores.

5.3. Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978)

As estimativas dos ganhos percentuais, com base no diferencial de seleção, por seleção simultânea de 12 características no 12º ciclo de seleção recorrente recíproca, em famílias de irmãos completos, foram obtidas por diferentes índices de seleção (Tabela 5).

Baseando-se nas estimativas dos ganhos percentuais preditos para a seleção direta e os índices de seleção de Mulamba e Mock (1978), Smith (1936), Hazel (1943), Willians (1962) e Pesek e Backer (1969), utilizaram, como pesos econômicos, coeficiente de variação genético (CV_g), desvio-padrão genético (DP_g), índice de variação (CV_g/CV_e), herdabilidade ($h_{X_f}^2$) e pesos atribuídos por tentativas (PA) (1, 1, 1, 10, -10, -10, -10, 100, -10, 300, 300, 20), sendo a seleção praticada em 12 características (FLO, ALP, ALE, NPL, NPQ, NPAC, EMP, NESP, NED, PES, PROD, P100). Ao todo, 40 famílias, das 138 avaliadas, foram selecionadas, utilizando-se o índice proposto por Mulamba e Mock (1978). A atribuição de pesos econômicos por tentativas permite, ao melhorista, verificar a possibilidade de ganhos, partindo do princípio de que é possível atribuir maiores pesos às características de maior interesse visando a ganhos satisfatórios em populações sob seleção.

O uso de peso econômico, atribuído por tentativas, permitiu não apenas ganhos satisfatórios para peso de espiga (PES) e peso de grãos (PGRS), mas também para as demais características avaliadas. Quanto ao número de espigas mal empalhadas (EMP), a estimativa foi de -6,71 %, para o número de espiga doente (NED), a estimativa de ganho percentual foi de -1,24 % e, para florescimento (FLO), -1,18 %. A redução da quantidade de espigas mal empalhadas, bem como para o número de espigas doentes e a redução nos dias para florescimento, contribuirá para a qualidade de milho na continuidade dos ciclos, e também para a população *per se*.

Em termos de ganhos percentuais preditos para o índice de seleção de Mulamba e Mock (1978), para todos os pesos econômicos, proporcionaram-se valores simultâneos positivos para as principais características: ALP, ALE, NPL, NPQ, NPAC, NESP, PES, PGRS e P100.

Tabela 5: Média original dos indivíduos selecionados (X_0), herdabilidade ($h_{X_f}^2$), ganhos por seleção direta e os ganhos fornecidos pelos diferentes índices de seleção.

Características ^{1/}	X_0	$h_{X_f}^2$	GS(%)				
			Direta	Mul e Mock	Pesek e Baker	Smith e Hazel	Williams
FLO	72,79	63,68	-1,20	-1,18	-1,44	-1,40	-1,22
ALP	2,03	56,15	1,18	0,80	0,95	0,65	1,36
ALE	1,23	60,10	1,36	0,73	1,18	0,97	1,47
NPL	23,00	63,39	1,53	1,40	1,94	2,08	1,46
NPQ	3,70	59,82	5,72	4,94	5,72	4,94	4,94
NPAC	1,71	21,40	5,10	3,61	7,78	6,88	4,80
EMP	2,66	76,01	-8,07	-6,71	-10,79	-11,47	-8,07
NESP	31,00	52,87	5,78	5,57	5,19	5,36	5,78
NED	4,92	26,61	-2,16	-1,24	-3,20	-3,33	-2,42
PES	3053	50,15	10,09	9,59	9,45	9,43	10,22
PROD	5006	48,33	10,46	9,58	9,41	9,41	10,40
P100	30,88	64,27	1,89	1,86	1,81	1,98	1,90

^{1/} FLO = número de dias de florescimento; ALP = altura de plantas; ALE = altura de espiga; NPL = número de plantas; NPQ = número de plantas quebradas; NPAC = número de plantas acamadas; EMP = empalhamento; NESP = número de espigas; NED = número de espigas doentes; PES = peso de espiga (g/parcela); PROD = produção (kg/ha) e P100 = peso de 100 grãos (gramas).

x_0 = média inicial; $h_{X_f}^2$ = coeficiente de herdabilidade; direta = ganho por seleção direta; Mul e Moch = índice de seleção de Mulamba e Mock; Pesek e Baker = índice de seleção de Pesek e Baker; Smith e Hazel = índice de seleção de Smith e Hazel e Williams = índice de seleção de Williams.

O índice de Mulamba e Mock (1978), com base em pesos arbitrários, foi o que proporcionou os melhores resultados para a seleção de famílias de irmãos completos do 12º ciclo de seleção recorrente, com ganhos satisfatórios para peso de espiga e peso de grãos 9,59 % e 9,58 %, respectivamente.

Rangel (2009), avaliando o avanço de ciclo interpopulacional em milho pipoca, utilizou o índice de Mulamba e Mock (1978), já que resultou em elevado ganho genético para as características de maior interesse nos programas de melhoramento de milho pipoca, capacidade de expansão e rendimento de grãos, respectivamente, 6,01 % e 8,53 %.

A estimativa de ganho foi obtida por meio do ganho de seleção. O diferencial de seleção foi obtido com a média dos 40 selecionados (6092) menos a média do experimento (5006). A partir deste cálculo, obteve-se o valor de 1086. Considerando o diferencial de seleção e a herdabilidade (0,48), obteve-se o

ganho genético no valor de 10,4 % por ciclo, com a estimativa de 521 kg.ha⁻¹.ciclo⁻¹ e 261 kg.ha⁻¹.ano⁻¹.

Carvalho *et al.* (2003), estimando parâmetros genéticos na população de milho CPATC-3, em dois locais de Sergipe, obtiveram ganho estimado de seleção, entre e dentro de progênies de meios-irmãos, no valor de 7,30 % e 3,55 %, no ciclo original; 11,48 % e 8,68 %, no ciclo I; e 6,82 % e 3.04 %, no ciclo II.

5.4. Análise dos Marcadores Moleculares na Seleção dos Genótipos

Para estudar a variabilidade genética entre as 40 famílias selecionadas na etapa de índice de seleção, foi utilizada a técnica molecular ISSR. Um total de 26 iniciadores foi testado, mas apenas foram utilizados os dados daqueles que originaram um maior número de bandas polimórficas e a melhor nitidez das mesmas. Pode-se observar tal fato na Tabela 6, onde os 23 iniciadores testados geraram um total de 118 bandas, sendo 25 monomórficas e 93 polimórficas, utilizando-se, no processo de amplificação dos 80 genótipos, 40 genótipos da população CIMMYT e 40 da Piranão.

A média de bandas por iniciador foi de 5,10. O percentual médio de polimorfismo foi estimado em 77,10 % (Tabela 7). O iniciador que apresentou maior número de bandas polimórficas e fragmentos amplificados foi o (GT)₆CC, no total de nove fragmentos.

Tabela 6: Relação dos *Primers* utilizados e número de fragmentos amplificados e polimórficos de oligonucleotídeos de ISSR.

Oligonucleotídeo	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Porcentagem de Polimorfismo
(AC) ₉	6	5	83,3
(GA) ₉ T	5	2	40,0
(GA) ₈ CA	4	2	50,0
(GA) ₈ GC	5	2	40,0
(CAGA) ₄	4	3	75,0
(CTC) ₅ RC*	6	4	66,6
(GA) ₈ YC*	6	5	83,3
(AC) ₈ T	9	8	88,8
(ATG) ₆	4	4	100,0
(GT) ₈ YC*	4	4	100,0
(CT) ₈ RG*	4	3	75,0
(AG) ₈ YA*	3	2	66,6
(AC) ₈ CT	5	4	80,0
(AG) ₈ YT*	4	3	75,0
(CT) ₈ G	4	4	100,0
(GTG) ₃ GC	4	2	50,0
(AC) ₈ CG	4	2	50,0
(GT) ₆ CC	10	9	90,0
(CAC) ₃ GC	5	5	100,0
(GGAT) ₃ GA	5	4	80,0
(AC) ₈ YG*	5	5	100,0
(GAA) ₆ AA	5	4	80,0
(AG) ₈ C	7	7	100,0
TOTAL	118	93	1773,6
MÉDIA	5,1	4,0	77,1

* Y = C ou T; R = A ou G

5.5. Análise de Agrupamento

Com base nas bandas reveladas, foi obtida a matriz de distâncias entre os indivíduos, utilizando o complemento aritmético do Índice de Jaccard e a análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA. Considerando o resultado obtido pelo agrupamento com os 80 genótipos, foi possível distinguir claramente os grupos CIMMYT e Piranão.

Este fato demonstra que pode ter ocorrido uma contaminação, das espigas autofecundadas dos progenitores pertencentes à população Piranão, por polens

provenientes da população CIMMYT e vice-versa, ou que os progenitores já pertenciam a esta população. Entretanto, independentemente da explicação, identificou-se uma contaminação de acessos entre os grupos e estes genótipos foram descartados antes de ser realizada a recombinação.

Ressalva-se que os genótipos com os números de 1 a 40 (com exceção dos acessos 23, 24, 26, 28, 39 e 40) são pertencentes à população Piranão e os demais acessos, entre os números 41 e 80 (com exceção dos acessos 47, 52, 53, 57, 59 e 60) são pertencentes à população CIMMYT (Apêndice B).

Observou-se que os acessos mais divergentes foram os de número 6 e 76, distantes em 0,56. Por sua vez, os acessos mais similares, apresentando uma distância de 0,20, foram o número 21 e 22. Vale destacar que, considerando a maior distância (0,56), os acessos são pertencentes a grupos distintos e, considerando a menor distância (0,20), os acessos encontram-se dispostos no mesmo grupo, neste caso, no Piranão.

A Figura 1 mostra o gráfico de dispersão por Análise das Coordenadas Principais (PCoA), que possibilita observar a formação de dois grupos, Piranão (em preto) e CIMMYT (em vermelho). A análise de agrupamento por UPGMA (Figura 2) mostra a concordância com a Análise das Coordenadas Principais, confirmando a separação dos dois grupos. O coeficiente de correlação cofenética, para esta análise, foi de 0,8. De acordo com Sokal e Rohlf (1962), valores acima de 0,8 indicam um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma.

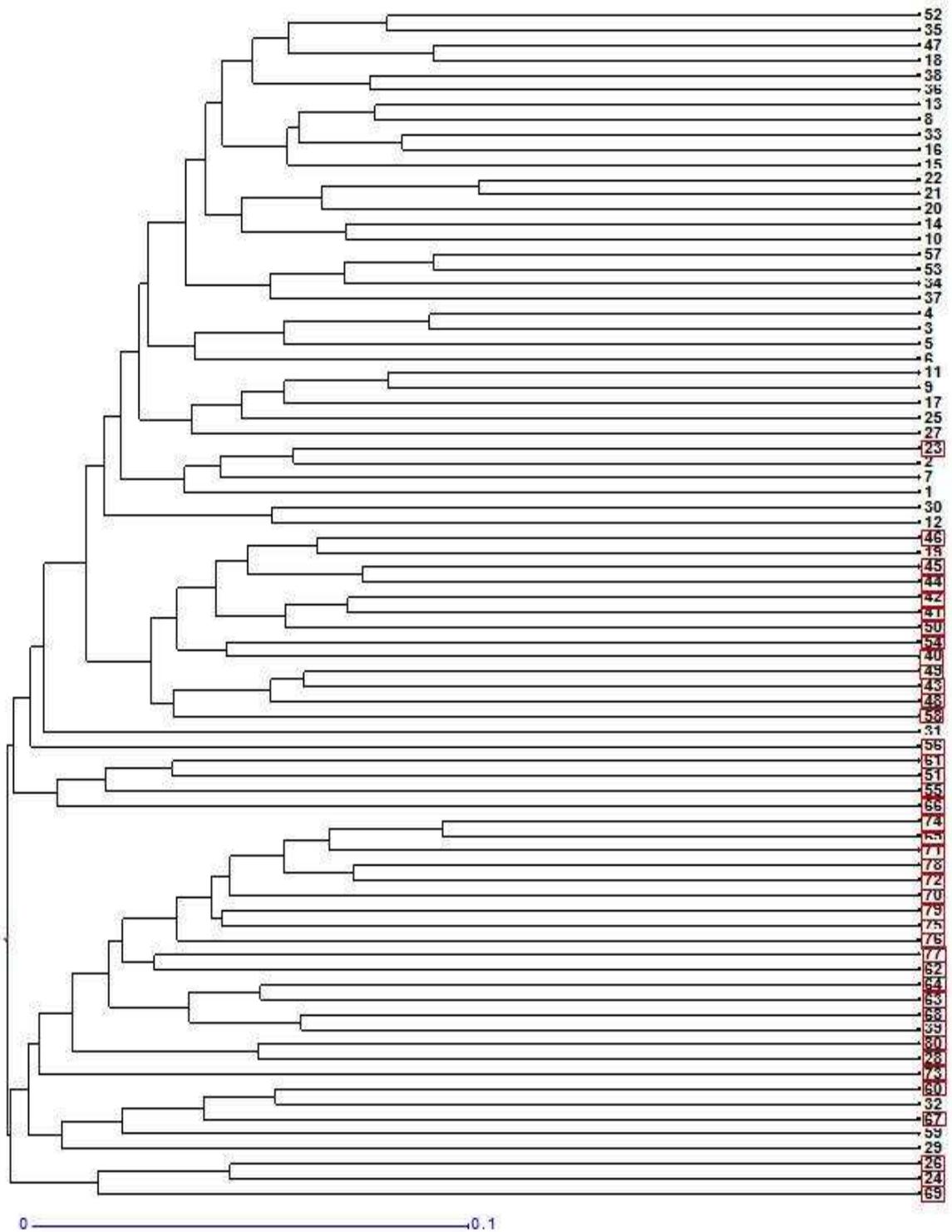


Figura 1: Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA das 40 famílias de irmãos completos, utilizando, como medida de dissimilaridade, o complemento aritmético do índice de Jaccard. Os números em preto correspondem aos 40 genótipos provenientes da população Piranão e os números circulosados em vermelho correspondem aos 40 genótipos da população CIMMYT (Apêndice B).

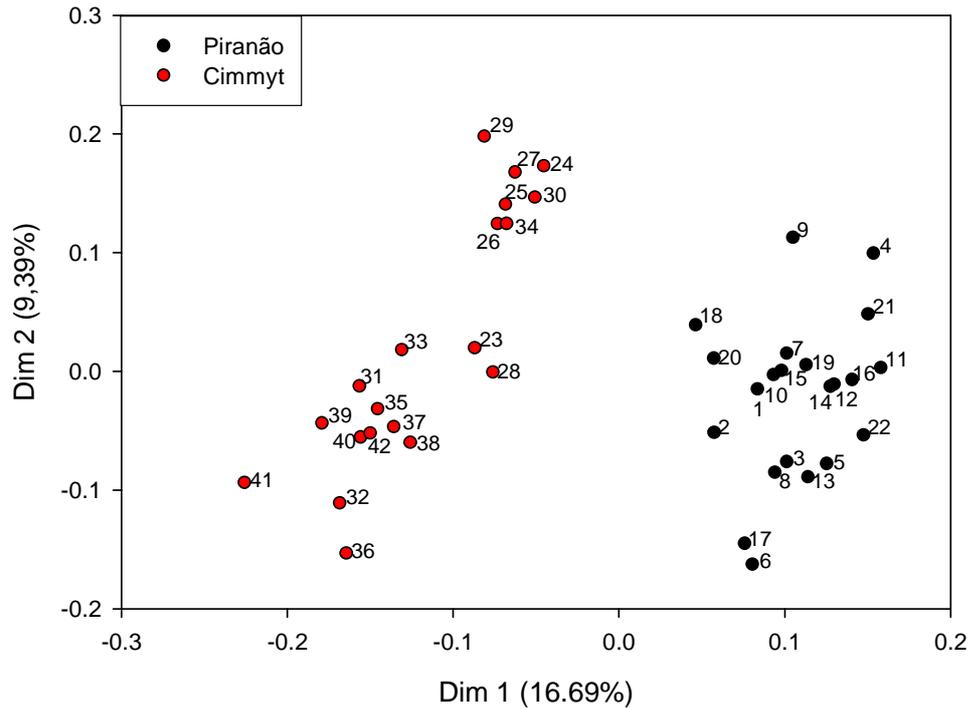


Figura 2: Gráfico das Coordenadas Principais, gerado pelo programa Darwin 5.0, das 42 famílias selecionadas para a etapa de recombinação. Os genótipos de 1 a 22 pertencem ao grupo Piranão e os genótipos de 23 a 42 pertencem ao grupo CIMMYT (Apêndice C).

No dendrograma obtido por UPGMA (Figura 3), considerando o ponto de mudança abrupta, observa-se a formação de três grupos. O grupo I englobando todos os acessos da população Piranão; o grupo II, parte dos acessos da população CIMMYT (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 34); e o grupo III (23, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42), indicando que as mesmas podem ser melhoradas *per se*. Esta formação de grupos demonstra a variabilidade entre as populações referidas acima, e que poderão ser utilizadas na obtenção de híbridos intervarietais, para a exploração da heterose.

Assim, os resultados obtidos, pelas técnicas de agrupamento, demonstram a existência de variabilidade suficiente para a continuidade do programa de seleção recorrente. A técnica ISSR foi uma ferramenta importante para a identificação de contaminantes, que devem ser eliminados antes da recombinação, garantindo, assim, a distância genética entre as populações, um fator importante para explorar a heterose interpopulacional, e preservando, para obtenção do próximo ciclo, as características de cada população trabalhada.

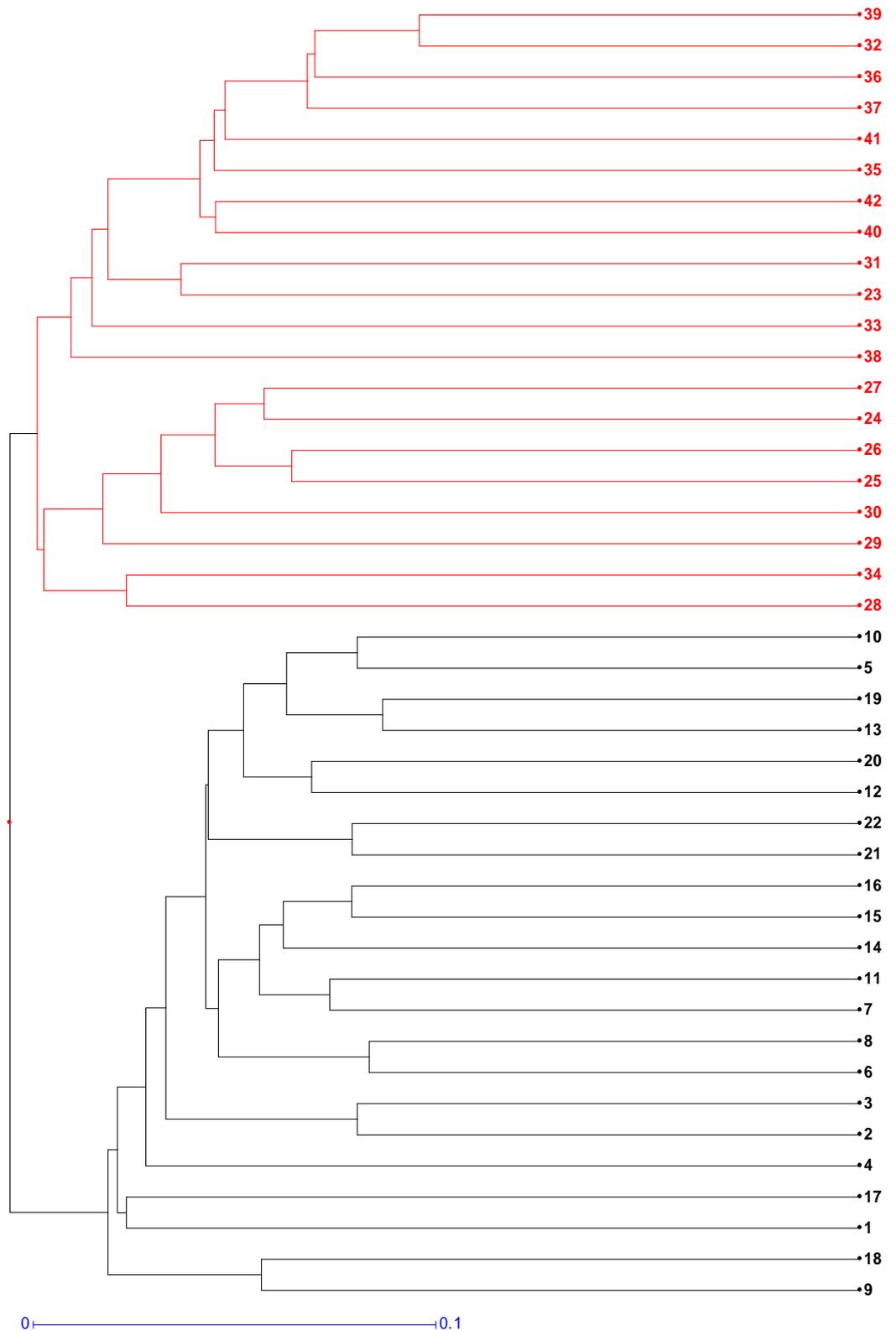


Figura 3: Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA, utilizando, como medida de dissimilaridade, o complemento aritmético do índice de Jaccard. Os números em preto correspondem aos genótipos provenientes da população Piranão e os números circulosados em vermelho, provenientes da população CIMMYT (Apêndice C).

Para a obtenção das 42 famílias superiores (Figura 3), foram eliminados, dos 40 genótipos de cada população considerados superiores na etapa de índice de seleção, 20 genótipos da população CIMMYT e 18 genótipos da população Piranão, como pode ser visto na Figura 1, devido à presença de indivíduos contaminantes. Esta seleção visou a maximizar a variabilidade genética nas populações trabalhadas, procurando manter e até mesmo aumentar a distância genética entre as mesmas (Figura 2). Para isso, foram escolhidos genótipos que deveriam continuar no programa, para então serem recombinados. Os genótipos eliminados foram escolhidos de acordo com diversos fatores, dentre eles: genótipos considerados pertencentes a uma população (contaminantes), porém, próximos geneticamente da outra população; genótipos identificados pelo método hierárquico de UPGMA e pela análise das coordenadas principais (PCoA), agrupados juntamente com indivíduos de outra população; genótipos geneticamente próximos, mantendo aqueles cuja média de produção foi superior.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro mantém um programa de melhoramento genético de milho desde o ano de 1996, visando à eficiência no melhoramento populacional a longo prazo. Programa este que já disponibilizou, para a região Norte/Noroeste Fluminense, dois cultivares de milho híbrido, o "UENF 506-6" e o "UENF 506-8". Para dar continuidade a este programa envolvendo as populações CIMMYT e Piranão, foi conduzido o 12º ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos, tendo, como etapa adicional, a utilização de marcadores de DNA do tipo ISSR.

Os cruzamentos foram realizados com os progenitores em ambas as populações e resultou na obtenção de 138 famílias de irmãos completos, que foram avaliadas em dois ambientes: Campos dos Goytacazes e Itaocara. Estimaram-se as médias e os parâmetros genéticos das populações CIMMYT e Piranão. Em virtude ao grande número de tratamentos (138 famílias), as mesmas foram agrupadas em "sets", sendo que cada "set" continha 23 famílias e quatro testemunhas, totalizando seis "sets", com duas repetições. A análise de variância conjunta revelou resultados significativos em relação à variabilidade genética nas populações, e, portanto, os genótipos superiores poderão ser indicados para ambos os locais. Os parâmetros genéticos possibilitaram a identificação de genótipos com potencialidade em ambas as populações.

A seleção das famílias superiores foi realizada por meio do índice de seleção de Mulamba e Mock (1978). Os 40 genótipos superiores de cada

população foram submetidos à etapa de marcador molecular, via técnica ISSR. E mediante a análise molecular, foi possível a geração de uma matriz que foi utilizada para obtenção das distâncias, pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizado para agrupar os genótipos pelo método hierárquico UPGMA e PCoA.

As análises obtidas foram suficientes para descartar os acessos que possuíam características desfavoráveis para a continuação do programa, antes da etapa de recombinação. Apenas 42 indivíduos superiores, sendo 20 CIMMYT e 22 Piranão, deram origem às populações no 12º ciclo.

As análises estatísticas demonstraram que o programa vigente apresenta variabilidade entre e dentro das populações, além de possibilitar a identificação e eliminação de genótipos considerados contaminantes, permitindo, desta forma, a manutenção de características desejáveis de cada população, ampliando ou mantendo a distância entre as mesmas.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a) A técnica ISSR foi considerada uma ferramenta importante para a identificação de contaminantes que devem ser eliminados da recombinação para que seja garantida a distância genética entre as populações;
- b) As populações CIMMYT e Piranão apresentaram variabilidade intra e interpopulacional, mostrando-se suficiente para a permanência deste programa;
- c) Os ganhos preditos com o índice de seleção, proposto por Mulamba e Mock (1978), mostraram-se superior aos preditos por outros índices, permitindo aumento de ganho para a maioria das características consideradas mais importantes;
- d) O gráfico de dispersão dos 42 genótipos selecionados revelou a existência de variabilidade genética e o distanciamento em ambas as populações;
- e) O ganho genético obtido neste ciclo foi correspondente a um incremento médio de rendimento de $521 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{ciclo}^{-1}$, ou seja, $261 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, beneficiando o produtor que utilizará sementes melhoradas, com potencial aproximado de oito sacas de milho a mais por hectare. Isso demonstra também que o programa está sendo efetivo, visto que, apesar de as famílias CIMMYT e Piranão já terem sido submetidas a 12 ciclos de

seleção recorrente recíproca, ainda possuem variabilidade genética intra e interpopulacional suficiente para a continuidade do programa de Seleção Recorrente de milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual (2009) São Paulo: *FNP consultoria e comércio LTDA*, 385-406p.
- Aguiar, C.G.; Schuster, I.; Amaral Júnior, A.T.; Scapim, C.A.; Vieira, E.S.N. (2008) Heterotic groups in tropical maize germoplasm by test crosses and simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 7(4):1233-1244p.
- Ajibade, S.R., Weeden, N.F.; Chite, S.M. (2000) Inter simple sequence repeat analysis relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111:47-55.
- Amaral Júnior, A.T., Thébaut, J.T.L. (1999) *Análise multivariada na avaliação de diversidade em recursos genéticos vegetais*. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF, 55p.
- Asensio, L.J. (1989) *Técnicas de análisis de datos multidimensionales: bases teóricas y aplicaciones en agricultura*. Madri: Neografis S. L., 301p.
- Balestre, M.; Machado, J.L.; Lima, J.C.; Souza, J.C.; Nóbrega Filho, L. (2008) Genetic distance estimates among single cross hybrids and correlation with specific combining ability and yield in corn double cross hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 7(1):65-73.

- Beadle, G.W. (1978) Teosinte and the origin of maize. In: Walden, D.B. (ed.). *Maize breeding and genetics*. New York, Jhon Wiley & Sons, 8:113-141.
- Benchimol, L.L.; Souza Jr, C.L.; Garcia, A.A.F.; Kono, P.M.S.; Mangolin, C.A.; Barbosa, A.M.M.; Coelho, A.S.G.; Souza, A.P. (2000) Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. *Plant Breeding*, 119:491-496.
- Borém, A.; Caixeta, E.T. (2009) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG, v.2, p.374.
- Borém, A.; Miranda, G.V. (2009) *Melhoramento de plantas*. 5 ed. Viçosa, MG: UFV, 525p.
- Bornet, B.; Branchard, M. (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology*, 19:209-215.
- Bosco, J. dos S. (2002). Emprego de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. *Anais do Simpósio sobre Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas*. Lavras: UFLA.
- Bruel, D.C.; Carpentieri-Pípolo, V.; Ruas, C.F.; Gerage, A.C.; Souza, S.G.H. (2007) Assessment of genetic diversity in maize inbred lines using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7:173-178.
- Bull, L.T.; Cantarella, H. (1993) *Cultura do Milho*, 301p.
- Carvalho, H.W.L.; Leal, M. L.S.; Santos, M.X.; Souza, E.M. (2003) Estimativas de parâmetros genéticos em ciclos avançados de seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos na variedade de milho BR 5028 São Francisco. *Agrotrópica*, 15(2):113-120p.
- Carvalho, V.P.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Ferreira, J.M.; Moreira, R.M.P. (2002) Assesment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using

- inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2:577-568p.
- Carvalho, V.P.; Ruas, C.F.; Ferreira, J.M.; Rosângela, M.P.M.; Ruas, P.M. (2004) Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetic and Molecular Biology*, 27(2):228-236p.
- Castoldi, F.L. (1997) Comparação de métodos multivariados aplicados na seleção em milho. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 118p.
- Cockerham, C.C. (1956) Effects of linkage on the covariances between relatives. *Genetics*, Bethesda, 41:138-141p.
- Coimbra, R. R. (2000) Seleção de famílias de meios-irmãos da população DFT 1 – Ribeirão de milho pipoca. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – UFV – Viçosa, MG, 54p.
- Colombo, C.; Gérald, S.; Charrier, A.(2000) Diversity within American cassava germoplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.23, 189-199p.
- Comstock, R. E.; Robinson, H. F. (1948) The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics*. 4:254-266.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2009) *Acompanhamento da safra Brasileira: grãos*. Décimo segundo levantamento, Brasília. Em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 01 de dezembro de 2009.
- Crossa, J.; Franco, J. (2004) Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica*, 137:19-37.
- Cruz, C.D. (2005) *Princípios de genética quantitativa*; Viçosa, MG: Editora UFV, 394p.

- Cruz, C.D. (2006) Programa GENES – *Aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa, MG: Editora UFV, 480p.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.2.Viçosa, MG: Editora UFV, 585p.
- Cruz, C.D.; Carneiro, P.C.S. (2006) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.2, ed.2,Viçosa, MG: Editora UFV, 144p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. (1997) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa, MG: Editora UFV, 390p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. (2001) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 2 ed. Viçosa, MG: Editora UFV. 390p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J.; Carneiro, P.C.S. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.1, 3 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 480p.
- Cruz, C.D.; Vencovsky, R.; Oliveira, S.; Tosello, G.A. (1993) Comparison of gains from selection among corn progênies, based on different criteria. *Revista Brasileira de Genética*, 16(1):79-89.
- Daros, M. (2003) Melhoramento de milho pipoca: seleção recorrente em famílias de irmãos completos e progênies S_1 . Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – UENF - RJ, 92p.
- Daros, M.; Amaral Júnior, A.T.; Pereira, M.G.; Santos, F.S.; Gabriel, A.P.C., Freitas Júnior, S. P. (2004) Recurrent selection in inbred popcorn families. *Scientia Agricola*, 61:609-614.
- Delboni, J.S.; Silva, J.C.; Cruz, C.D.; Silva, C.H.O. (1989) Análise de cruzamentos dialélicos entre variedades de milho braquítico-2, usando o método de Gardner e Eberhart. *Revista Ceres*, Lavras, v.36, n.206, 365-372p.

- Diniz Filho, J.A. (2000) Métodos filogenéticos comparativos. Ribeirão Preto: Holos, 120p.
- Doebley, J.; Stec, A. (1993) Inheritance of the Morfological Differences Between Maize and Teosinte: comparison of results for two F₂ populations. *Genetics*, 134:559-570.
- Doebley, J. (2004) The Genetics of Maize Evolution. *Annual Review of Genetics* 38:37-59.
- Eberhart, S.A.; Debela, S., Hallauer, A.R. (1973) Reciprocal recurrent selection in the BSSS and BSCB1 maize varieties and half sib selection in BSSS. *Crop Science*. 13:451-456.
- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos da Silva. Viçosa, MG: Editora UFV, 279p.
- Falconer, D.S.; Mackay, T. F. (1996) Introduction to quantitative genetics. 4 ed. Londres: Longman Group, 464p.
- Fancelli, A.L.; Dourado Neto, D. (2000) *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- Ferrão, R.G.; Silva, J.C.; Cruz, C.D. (1985) Avaliação da capacidade combinatória de oito linhagens de milho em um sistema dialélico desbalanceado. *Revista Ceres*, 32(182):283-292.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa - CENARGEM, 3 ed., 220p.
- Freitas, F.O. (2001) *Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (Zea mays, L.) e feijão (Phaseolus vulgaris, L.)*.

- Fuzatto, S.R.; Ferreira, D.F.; Ramalho, M.A.P.; Ribeiro, P.H.E. (2002) Divergência genética e suas relações com os cruzamentos dialélicos na cultura do milho. *Ciências Agrotécnica*, 26(1): 22-32.
- Gabriel, A.P.C. (2006) Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.) assistida por marcadores moleculares. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Campos dos Goytacazes – UENF - RJ, 112p.
- Galinat, W.C. (1974) Intergenomic mapping of maize, teosinte and *Tripsacum*. *Evolution*, 27:644-55p.
- Galinat, W.C. (1977) The origin of corn. In: Sprague, G.F. (ed.) *Corn and corn improvement*. Madison: American Society of American of Agronomy.
- Garcia, J.C.; Mattoso, M.J.; Duarte, J.O.; Cruz, J.C. (2005) Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. *Circular técnica 74 - Embrapa*, 12p.
- Gardner, O.G. (1963) Estimates of genetic parameters in cross fertilizing plants and their implications in plant breeding. In: Hanson, W.D.; Robinson, H.F. (Eds). *Statistical genetics and plant breeding*. Washington: National Academy of Science, 225-252p.
- Gaut, B.S.; d'Ennequin, M.L.T.; Peek, A.S.; Sawkins, M.C. (2000) Maize as model for the evolution of plant nuclear genomes. *PNAS*, 97(13):7008-7015p.
- Gevers, H.O. (1974) Reciprocal recurrent selection in maize under two systems of parent selection. *Proc. Of fifth Genetic Congress Republic South Africa*.
- Goloubinoff, P.; Paabo, S.; Wilson, A.C. (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an Adh 2 gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy Sciences*. Washington, D.C., 90:1997-2001.

- Gomes, M.S. (1999) *Heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Lavras – MG, Universidade federal de Lavras – UFLA, 78p.
- Gonçalves, L.S.A.; Rodrigues, R.; Amaral Júnior, A.T.; Karasawa, M.; Sudré, C.P. (2008) Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, 7 (4):1289-1297.
- Goodnam, M.M.; Smith, J.S.C. Botânica *In: Paterniani, E. e Viegas, G. P. (1987) Melhoramento e produção de milho*. Campinas, Fundação Cargill, 1:41-78.
- Gupta M, Chyisys, Romero-Severson J, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical Applied Genetics*, 89:998–1006.
- Hallauer, A.R. (1977) Four cycles of reciprocal full-sib selection. North cent. Corn Breed. Res. Comm. (NCR-2) Rep. Mimeogr. Library, Iowa State Univ., Ames, p.11-13.
- Hallauer, A.R. (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 3:01-33.
- Hallauer, A.R., Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Science*, 10:315-16.
- Hallauer, A.R.; Miranda, J.B. (1987) *Quantitative Genetics in Mayze Breending*. 286p.
- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. (1988) *Quantitative genetics in maize breeding*. 2 ed.Ames. Iowa State University Press. 468 p.
- Hazel, L.N. (1943) The genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics*, Austin, 28:476-490.

- Huang, J. & S.M. Sun, (2000) Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical Applied Genetics*, 100:1050–1060.
- Hull, F.H. (1945) Recurrent selection for specific combining ability in corn. *Journal American Socyt. Agronomy*, 37:134-145.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2009) Disponível em www.ibge.gov.br. Acesso em 10 de novembro de 2009.
- Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar & D.S, (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical Applied Genetics* 100:1311–1320.
- Kantety, R.V., X.P. Zeng, J.L. Bennetzen & B.E. Zehr, (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1:365–373.
- Liu, Y.J.; Huang, Y.B.; Rong, T.Z.; Tian, M.L. and Yang, J.P. (2005) Comparative analysis of genetic diversity in land-races of waxy maize from Yunnan and Guizhou using SSR markers. *Sci. Agric. Sinica* 4, 648-653p.
- Mangesldorf, P.C. (1974) *Corn its origin, evolution and improvment*. Cambridge, Mass, USA.
- Marques, M.J.B.S.G.S.M. (2000) *Número mínimo de famílias de meios-irmãos de milho pipoca, critério de seleção e predição de ganhos por seleção*. Tese de Doutorado. Viçosa: UVF, 236p.
- Martins, E.R. (2000) *Conservação da Poaia (Psychotrya ipecacuanha): coleta, ecogeografia, variabilidade genética e caracterização reprodutiva*. Tese

(Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 109 p.

- Meyer, W. T.G. Mitchell, E.Z. Freedman & R. Vilgays, (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal Clinical Microbiology*, 31: 2274–2280.
- Milach, S.C.K. (1998) *Marcadores Moleculares em plantas*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 17-28.
- Mingoti, A.S. (2007) *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada*. Belo Horizonte: Editora UFMG, 295p.
- Miranda, G.V. (2003) Melhoramento de milho nas Universidades. *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA.
- Miranda, G.V.; Souza, L.V.; Galvão, J.C.C.; Guimarães, L.J.M.; Melo, A.V.; Santos, I.C. (2008) Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations. *Euphytica*: DOI 10.1007/s10681-007-959-9.
- Mohammadi, S.A.; Prasanna, B.M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tool and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- Mulamba, N.N.; Mock, J.J. (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits *Egypt Journal of Genetics and Cytology*, Alexandria, 7:40-57.
- Nagaoka, T. & Y. Ogihara, (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical Applied Genetics*, 94:597–602.

- Oliveira, A.C. (1998) Construção de Mapas Genéticos em Plantas. In: Milach, S.C.K. (ed) *Marcadores de DNA em Plantas*. Porto Alegre, Editora: UFRGS, 141p.
- Padilha, L. (2002) *Marcadores moleculares semi-automatizados e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical*. Tese de Doutorado – Lavras – MG. Universidade Federal de Lavras – UFLA, 85p.
- Paterniani, M.E.A.G.Z. (2001) Use of heterosis in mayze breeding: history, methods and perspectives – a review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 1(2):159-178.
- Paterniani, E.; Miranda Filho, J.B. (1978) Melhoramento de populações. In: Paterniani, E. (ed) *Melhoramento e produção de milho no Brasil*. Piracicaba, Esalq, 202-246 p.
- Paterniani, E.; Vencovsky, R. (1977) Reciprocal recurrent selection in maize (*Zea mays* L.) based on the testcross of half-sib families. *Maydica*, 22: 141-152.
- Paterniani, E. (1980) *Melhoramento e Produção do Milho no Brasil*. Fundação Cargil. v. único, 650p.
- Paterniani, E., Campos, M.S. (1999) *Melhoramento do milho*. In: Borém, A. (Editor). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV. p. 429-485.
- Paterniani, M.E.A.G.Z.; Sawazaki, E.; Gallo, P.B.; Luders, R.R.; Da Silva, R.M. (2003) Parâmetros genéticos em um composto de milho e potencial para seleção recorrente. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*. Porto Seguro, Bahia.
- Perrier, X.; Jacquemoud-Collet J.P. (2006) DARwin Software: <http://darwin.cirad.fr/darwin>.

- Pereira, J.R. (1985). *Seleção de irmãos completos, visando a qualidade da semente e outros caracteres agronômicos em soja (Glycine Max (L.) Merrill)*. Tese de Mestrado– Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 85p.
- Pesek, J.; Baker, R.J. (1969) Desired improvement in relation to selection indices. *Can. J. Plant Science*, Ottawa, 49(6):803-804; 1:215-274.
- Pinto, R.J.B. (1995) *Introdução ao melhoramento genético de plantas*. Maringá. 275p.
- R – The R Project for Statistical Computing: www.r-project.org.
- Ramalho, M.A.P.; Santos, J.B.; Pinto, C.A.B. (2004) *Genética na Agropecuária*. 3.ed.rev.- Lavras: UFLA, 2004. 472p.
- Rangel, R.M. (2009) *Análise biométrica na população UENF de milho pipoca sob seleção recorrente*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 104p.
- Reddy, M.P.; Sarla, N.; Siddiq, E.A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9 – 17.
- Ribeiro Júnior, J.I.; Cruz, C.D.; Scapim, C.A.; Pacheco, C.A.P. (2000) Metodologia para avaliar os ganhos por seleção recorrente recíproca em populações de milho. *Revista Ceres*, 47(274):591-602p.
- Robinson, H.F.; Cockerham, C.C. (1965) Estimación y significado de los parâmetros genéticos. *Fitotecnia Latinoamericana*, San José, v.2, 23-38p.
- Ronzelli Junior, (1996) *Melhoramento Genético de Plantas*. Curitiba. 219p.

- Santacruz-Varela, A.; Widrechner, M.P.; Ziegler, K.E.; Alvador, R.J.; Millard, M.J. and Bretting, P.K. (2004) Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science*, 44:456-1467p.
- Santos, P.G.; Juliatti, F.C.; Buiatti, A.L.; Hamawaki, O.T. (2002) Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho em Uberlândia, MG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 37(5):597-602p.
- Santos, F.S. (2005) *Seleção recorrente entre famílias de meios-irmãos da população UNB-2U de milho pipoca (Zea mays L.)*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 96p.
- SAS (1985) SAS user's guide: statistics. NC Cary, New York, 958p.
- Scapim, C.A.; Carvalho, C.G.P.; Cruz, C.D. (1995) Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 30(5): 683-686
- Scapim, C.A.; Pacheco, C.A.P.; Tonet, A.; Braccini, A.L.; Pinto, R.J.B. (2002) Análise dialélica e heterose de populações de milho pipoca. *Bragantia*, 61:219-230.
- Sera, T.; Ruas, P.M.; Ruas, C.De F.; Diniz, L.E.C.; Carvalho, V.De P.; Rampim, L.; Ruas, E. A.; Silveira, S.R.da (2003) Genetic polymorfism among 14 elite *Coffea arabica* L. cultivars using RAPD markers associated with restriction digestion. *Genetics and Molecular Biology*, v.26, 59-69p.
- Shull, G.F. (1909) A pure line method of corn breeding. *Am. Breed. Assoc. Rep.*, v.5, 51-59p.

- Silva, R.M.; Miranda Filho, J.B. (2003) Heterose em cruzamentos entre populações de milho: peso de espigas. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, 60:3p.
- Silva, M.C. (2006) Avaliação de descritores morfológicos e seleção de diferentes tipos de progênies de *Pennisetum* sp. Tese (Doutorado em Zootecnia). Recife: UFRPE. 78p.
- Smith, H. F. (1936) A discriminant function for plant selection. *Annals of Eugenics*, London, 7:240-250p.
- Sneath, P.H.; Sokal, R.R. (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman, 573p.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *International Association for Plant Taxonomy*, 11:33-40p.
- Souza, V.Q.; Pereira, A. da S.; Kopp, M.M.; Coimbra, J.L.M.; Carvalho, F.I.F. de; Luz, V.K.da; Oliveira, A.C. (2005) Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. *Bragantia*, Campinas, 64(4): 569-575p.
- Tardin, F.D. (2006) Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 92p.
- Tardin F.D.; Pereira, M.G.; Santos, F.S.; Amaral Júnior, A.T.; Daros, M.; Gabriel, A.P.C. e Daher, R.F. (2003) Utilização de índices clássicos de seleção aplicados em programa de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.). In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2003, Porto Seguro. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Londrina – PR: Brazilian Society of Plant Breeding, 2-3p.

- Tardin, F.D.; Pereira, M.G.; Gabriel, A.P.C.; Amaral Júnior, A.T.; Souza Filho, G.A. (2007) Selection index and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7:225-233.
- Vencovsky, R. (1969) Genética quantitativa. In: Kerr, W. E. (Org.). Melhoramento e genética. São Paulo: Melhoramento, 17-38p.
- Vigouroux, Y.; Mitchell, S.; Matsuoka, Y.; Hamblin, M.; Kresovich, S.; Smith, J.S. C.; Jaqueth, J.; Smith, O.S.; Doebley, J. (2005) An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. *Genetics*, 169:1617-1630.
- Von Pinho, R.G. (2003) Produção de milho no Brasil e no mundo: Realidade e perspectiva. *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA.
- Weatherwax, P. (1954) Indian corn in old America. New York, USA: The MacMillan Co. 253p.
- Willians, J.S. (1962) The evaluation of a selection index. *Biometrics*, North Carolina, 18:375-393.
- Wu, K.,R. Jones, L. Dannaeburger & P.A. Scolnik, (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, 22:3257–3258.
- Zietkiewicz E; Rajalski A; Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176–183.

APÊNDICES

Apêndice A: Média de produção em Kg/ha das 138 famílias de irmãos completos e das quatro testemunhas obtidas pelo programa de seleção recorrente.

Família	Média	Família	Média	Família	Média	Família	Média
13	7000 a	113	5550 ab	63	5000 ab	116	4400 ab
104	6950 a	88	5550 ab	24	5000 ab	86	4400 ab
60	6900 a	133	5550 ab	135	4950 ab	10	4350 ab
137	6900 a	17	5550 ab	62	4950 ab	120	4350 ab
128	6650 a	*T3	5492 ab	41	4950 ab	84	4300 ab
101	6600 a	30	5400 ab	97	4900 ab	*T4	4283 ab
138	6600 a	118	5300 ab	11	4900 ab	78	4275 ab
112	6600 a	126	5300 ab	36	4900 ab	25	4200 ab
64	6550 a	52	5300 ab	16	4900 ab	83	4200 ab
48	6450 a	91	5250 ab	72	4850 ab	93	4150 ab
134	6400 a	7	5250 ab	49	4850 ab	107	4100 ab
53	6400 a	114	5250 ab	9	4800 ab	43	4100 ab
99	6350 a	100	5250 ab	47	4800 ab	26	4000 ab
4	6150 ab	80	5250 ab	124	4750 ab	55	3900 ab
115	6150 ab	130	5250 ab	108	4750 ab	85	3900 ab
73	6150 ab	50	5200 ab	2	4750 ab	95	3850 ab
29	6100 ab	131	5200 ab	121	4700 ab	54	3850 ab
119	6100 ab	129	5200 ab	22	4700 ab	37	3800 ab
76	5950 ab	34	5200 ab	109	4700 ab	33	3800 ab
1	5950 ab	89	5200 ab	14	4700 ab	45	3700 ab
123	5950 ab	136	5150 ab	40	4650 ab	90	3700 ab
106	5900 ab	110	5150 ab	79	4650 ab	31	3700 ab
56	5900 ab	102	5150 ab	61	4650 ab	77	3500 ab
132	5850 ab	51	5150 ab	65	4650 ab	92	3400 ab
18	5850 ab	81	5150 ab	67	4600 ab	21	3400 ab
105	5850 ab	75	5150 ab	59	4550 ab	19	3400 ab
12	5850 ab	58	5100 ab	44	4550 ab	54	3400 ab
38	5800 ab	82	5100 ab	68	4550 ab	*T1	3342 ab
39	5750 ab	27	5100 ab	*T2	4517 ab	87	3200 ab
111	5700 ab	96	5100 ab	8	4500 ab	15	3200 ab
23	5700 ab	71	5050 ab	117	4500 ab	66	3150 ab
46	5700 ab	28	5000 ab	74	4500 ab	70	3000 ab
69	5650 ab	32	5000 ab	3	4450 ab	125	1800 b
20	5650 ab	5	5000 ab	35	4450 ab	98	1750 b
94	5600 ab	122	5000 ab	42	4450 ab	-	-
103	5550 ab	127	5000 ab	6	4450 ab	-	-

*T1 = C₅xP₅; T2 = C₈xP₈; T3 = C₁₁xP₁₁; T4 = BR106.

Apêndice B: Relação dos 80 genótipos e suas respectivas populações em referência à Figura 1.

Genótipos Originais	População	Genótipos Originais	População
1	Piranão	41	CIMMYT
2	Piranão	42	CIMMYT
3	Piranão	43	CIMMYT
4	Piranão	44	CIMMYT
5	Piranão	45	CIMMYT
6	Piranão	46	CIMMYT
7	Piranão	47	Piranão
8	Piranão	48	CIMMYT
9	Piranão	49	CIMMYT
10	Piranão	50	CIMMYT
11	Piranão	51	CIMMYT
12	Piranão	52	Piranão
13	Piranão	53	Piranão
14	Piranão	54	CIMMYT
15	Piranão	55	CIMMYT
16	Piranão	56	CIMMYT
17	Piranão	57	Piranão
18	Piranão	58	CIMMYT
19	Piranão	59	Piranão
20	Piranão	60	Piranão
21	Piranão	61	CIMMYT
22	Piranão	62	CIMMYT
23	CIMMYT	63	CIMMYT
24	CIMMYT	64	CIMMYT
25	Piranão	65	CIMMYT
26	CIMMYT	66	CIMMYT
27	Piranão	67	CIMMYT
28	CIMMYT	68	CIMMYT
29	Piranão	69	CIMMYT
30	Piranão	70	CIMMYT
31	Piranão	71	CIMMYT
32	Piranão	72	CIMMYT
33	Piranão	73	CIMMYT
34	Piranão	74	CIMMYT
35	Piranão	75	CIMMYT
36	Piranão	76	CIMMYT
37	Piranão	77	CIMMYT
38	Piranão	78	CIMMYT
39	CIMMYT	79	CIMMYT
40	CIMMYT	80	CIMMYT

Apêndice C: Relação dos 42 genótipos e suas respectivas populações em referência à Figura 3.

Genótipos Originais ^{1/}	Genótipos Após Seleção ^{2/}	População	Genótipos Originais ^{1/}	Genótipos Após Seleção ^{2/}	População
1	1	Piranão	39	23	CIMMYT
4	2	Piranão	42	24	CIMMYT
5	3	Piranão	43	25	CIMMYT
6	4	Piranão	49	26	CIMMYT
8	5	Piranão	50	27	CIMMYT
9	6	Piranão	54	28	CIMMYT
10	7	Piranão	55	29	CIMMYT
11	8	Piranão	58	30	CIMMYT
12	9	Piranão	63	31	CIMMYT
13	10	Piranão	65	32	CIMMYT
14	11	Piranão	67	33	CIMMYT
15	12	Piranão	69	34	CIMMYT
16	13	Piranão	70	35	CIMMYT
17	14	Piranão	71	36	CIMMYT
20	15	Piranão	72	37	CIMMYT
21	16	Piranão	73	38	CIMMYT
27	17	Piranão	74	39	CIMMYT
30	18	Piranão	75	40	CIMMYT
33	19	Piranão	76	41	CIMMYT
34	20	Piranão	79	42	CIMMYT
36	21	Piranão		-	-
38	22	Piranão		-	-

^{1/} - Conforme a Figura 1.

^{2/} - Conforme a Figura 3.