

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA EM MILHO (*Zea mays* L.):
AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS E MOLECULARES

KEILA SILVA DA CUNHA GALVÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2014

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA EM MILHO (*Zea mays* L.):
AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS E MOLECULARES

KEILA SILVA DA CUNHA GALVÃO

Tese 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 Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2014

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA EM MILHO (*Zea mays* L.):
AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS E MOLECULARES

KEILA SILVA DA CUNHA GALVÃO

Tese 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 Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em 29 de abril de 2014.

Comissão examinadora:

Prof^a. Ana Paula Candido Gabriel Berilli (D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas) – IFES/Campus Itapina

Prof^a. Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc. em Produção Vegetal) – UENF

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

Aos meus queridos pais, Adolfo (*in memoriam*) e Soely,
A minhas irmãs, Sheila e Patrícia,
A minha avó querida, Soemes (*in memoriam*),
Ao meu marido, Paulo Vinicius.

DEDICO ESTA CONQUISTA

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador, e a Nossa Senhora, por toda proteção e graças concedidas;
À UENF e CAPES pelo suporte financeiro e pela infraestrutura para a realização deste trabalho. À CAPES, pela concessão da bolsa;

Aos meus familiares, por todo carinho e por compreender a minha ausência em muitos momentos de suas vidas e também por acreditarem e torcerem por mim durante todo este tempo;

Ao meu marido, Vinicius, por todos estes anos de convivência, carinho e compreensão;

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

Aos professores do Curso Genética e Melhoramento de Plantas da UENF, pela contribuição na minha formação profissional, em especial a Telma Nair Santana Pereira e Alexandre Pio Viana e, pelas importantes contribuições;

Aos professores Ana Paula Candido Gabriel Berilli, Helaine Christine Cancela Ramos e Alexandre Pio Viana por fazerem parte da banca de defesa da minha tese;

Ao colega de trabalho, Pedro e professores Helaine e Alexandre, pelo suporte nas análises estatísticas dos dados experimentais;

Ao bolsista de IC, Julio, pela amizade e pela indispensável ajuda;

Aos colegas do LMGV Julio, Pedro, Renato, Gislanne, Sérgio, Jocarla, Geovana, Marcela, Fernanda e Lucas, pela convivência e amizade;

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

Aos bolsistas Valdinei e Luzimara por todo suporte aos experimentos 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;

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. Origem e Classificação Botânica do Milho.....	05
3.2. Importância Sócioeconômica.....	06
3.3. Melhoramento Genético do Milho.....	09
3.4. Diversidade Genética.....	11
3.5. Seleção Recorrente.....	12
3.6. Parâmetros Genéticos.....	16
3.7. Índices de Seleção.....	16
3.8. Marcadores Moleculares.....	19
3.8.1. Marcadores Moleculares Microsatélites Gênicos.....	22
3.8.2. Dispersão Gráfica (Análise das Coordenadas Principais – PcoA).....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Material Genético.....	26
4.2. Seleção Recorrente Recíproca.....	26
4.2.1. Geração das Famílias de Irmãos Completos e de Sementes S ₁	27

4.2.2. Avaliação das Famílias de Irmãos Completos.....	28
4.2.2.1. Local e Delineamento Experimental.....	28
4.2.2.2. Seleção das Famílias Superiores – Análise Estatística.....	29
4.2.2.2.1. Análise de Variância.....	29
4.2.2.2.2. Estimadores dos Parâmetros Genéticos...	31
4.2.2.2.3. Estimativa dos ganhos por meio de índices de seleção.....	31
4.2.2.2.3.1. Índice de Smith (1936) e Hazel (1943)	31
4.2.2.2.3.2. Índice clássico de Mulamba e Mock (1978).....	34
4.2.2.2.3.3. Índice de Pesek e Baker (1969).....	34
4.2.2.2.3.4. Índice de Williams (1962).....	35
4.2.2.2.4. Estimadores de Ganhos Genéticos.....	36
4.3. Avaliação da Diversidade Genética por Marcador Molecular....	36
4.3.1. Extração do DNA.....	37
4.3.2. Seleção e Síntese de <i>primers</i> SSR – EST.....	37
4.3.3. Reação de Amplificação da Polimerase em Cadeia.....	38
4.3.4. Eletroforese.....	38
4.3.5. Análise dos Dados Moleculares via SSR-EST.....	41
4.4. Recombinação das Famílias Superiores.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. Avaliação das Famílias de Irmãos Completos e Análise de Variância.....	43
5.2. Estimativas dos Parâmetros Genéticos.....	47
5.3. Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978).....	50
5.4. Estimativas de Ganho de Seleção.....	53
5.5. Análise dos Marcadores SSR-EST na Seleção dos Genótipos	54
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICE.....	84
Apêndice A.....	85

RESUMO

GALVÃO, Keila Silva da Cunha; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2014; Seleção Recorrente Recíproca em Milho (*Zea mays* L.): Avaliações Fenotípicas e Moleculares. Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira. Conselheiros: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira e Prof. Alexandre Pio Viana.

No presente trabalho, visou-se ampliar os ganhos genéticos advindos do programa de seleção recorrente interpopulacional em desenvolvimento. Neste sentido, resultados relativos ao 13º ciclo são apresentados, acrescentando, na fase de seleção, os marcadores de DNA de regiões funcionais do genoma, como ferramentas auxiliares para maximização da diversidade genética entre e dentro das populações. Para tanto, 210 famílias de irmãos completos foram avaliadas em dois ambientes: Campos dos Goytacazes e Itaocara. 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, $h_{X_f}^2$ variou de 19,54 % a 70,45 %, evidenciando a característica produção com 48,33%, indicando uma boa possibilidade de ganhos para esta característica. A seleção com base no ensaio de campo foi realizado com a utilização do índice de Mulamba e Mock (1978), utilizando como critério, pesos arbitrários às 8 características morfoagronômicas. Com base na média das 40 melhores famílias de cada população, estimou-se um ganho genético para a característica produção

de 12%. Para a caracterização genético-molecular foi utilizado 20 *primers* em 80 genótipos, sendo 40 provenientes de cada população (CIMMYT e Piranão). A partir da análise dos 20 *loci* SSR-EST, foi obtido um total de 93 alelos com número de alelo por *locus* variando de 2 a 8 e média de 4,65. Com a análise do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi possível quantificar o polimorfismo genético de cada *locus* na população em estudo, sendo o valor máximo de 0,76 para o *locus* *bip2*, ao passo que o menor valor (0,27) foi observado para o *locus* *umc1108*, com valor médio de 0,55. Ao analisar a frequência de alelos das populações CIMMYT e Piranão individualmente observou-se número de alelos variando de 1 a 6, enquanto que na população Piranão a variação foi de 2 a 8, com médias de 3,65 e 4,35, respectivamente. Os valores do Índice de Shannon (I) obtidos para as duas populações sob melhoramento (CIMMYT – 0,89 e Piranão – 1,04) pode-se inferir que existe variabilidade genética suficiente para a continuidade deste programa de melhoramento. A heterozigosidade observada (H_o) nas populações variou de 0,00 a 0,73, com média de 0,30. A análise do coeficiente de endogamia (f) dos indivíduos das diferentes populações mostrou valores variando entre -0,36 e 1,00 em CIMMYT; -0,34 e 1,00 em Piranão, com valores médios de 0,47 e 0,36, respectivamente. A distância genética entre os 40 genótipos superiores de cada população foi analisada pelo método de agrupamento UPGMA, onde foi possível a formação de dois grandes grupos com distância média de 0,42. A quantificação dessa variabilidade foi obtida através da análise de variância molecular (AMOVA), onde observou-se que do total da variância genética, 27% foi detectada entre as populações e 73% dentro das populações, foi observada maior variabilidade nos indivíduos dentro dos grupos quando se comparam os grupos separadamente. Com base nesses resultados, pode-se observar que um dos principais objetivos de um programa de seleção recorrente vem sendo alcançado, ou seja, a variabilidade genética dentro das populações tem sido mantida a níveis satisfatórios, ao passo que a variabilidade entre tem aumentado ao longo dos ciclos de seleção, contribuindo para a longevidade desse programa de melhoramento. As populações possuem ampla diversidade genética, sendo tal diversidade correspondente ao genoma funcional, dando indicativos de que a presente estratégia poderá contribuir para expressivos ganhos genéticos, especialmente associados à produtividade de grãos dos futuros híbridos.

ABSTRACT

GALVÃO, Keila Silva da Cunha; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; April, 2014; Reciprocal Recurrent Selection in Maize (*Zea mays* L.): Phenotypic and Molecular Evaluations. Adviser: Messias Gonzaga Pereira. Committee Members: Telma Nair Santana Pereira and Alexandre Pio Viana.

This study aims to increase the genetic gains in the interpopulation recurrent selection program. In this sense, results for the 13th cycle are shown, adding in the selection phase, the DNA markers of functional regions of the genome, as auxiliary tools for maximizing genetic diversity among and within populations. To this end, 210 full-sib families were evaluated in two environments: Campos dos Goytacazes and Itaocara. These were grouped into "sets" with two replications. Genetic parameters of various agronomic characteristics of CIMMYT and Piranão populations were estimated. The analysis of variance showed significant results in relation to the genetic variability in populations. The coefficient of heritability ranged from 19.54% to 70.45%, showing the characteristic grain yield with 48.33%, indicating a good possibility of gains for this trait. Selection based on field trial was conducted using the index Mulamba and Mock (1978), using as criteria, arbitrary weights at 8 agronomic characteristics. Based on the average of the best 40 families from each population, we estimated a genetic gain for the characteristic grain yield of 12%. For molecular genetic characterization 20 primers were used in 80 genotypes, 40 from each population (CIMMYT and Piranao). From the analysis of 20 EST-SSR loci, we obtained a total of 93 alleles.

The number of alleles per locus ranged from 2 to 8 and an average of 4.65. With the analysis of the polymorphic information content (PIC) was possible to quantify the genetic polymorphism of each locus in the population being studied, and the maximum value of 0.76 for the locus *bip2*, while the lowest value (0.27) was observed for *umc1108* locus, with an average value of 0.55. By analyzing the allele frequency of the individual populations CIMMYT and Piranão. The number of observed alleles ranged from 1 to 6 into CIMMYT and 2 to 8 into the Piranão population, with an average of 3.65 and 4.35, respectively. The values of the Shannon index (I) obtained for the two populations under improvement (CIMMYT - and Piranão 0.89 - 1.04) can be inferred that there is sufficient genetic variability for the continuity of this breeding program. The observed heterozygosity (H_o) in populations ranged from 0.00 to 0.73, with a mean of 0.30. The analysis of the inbreeding coefficient (f) of the individuals from different populations showed values ranging between -0.36 and 1.00 at CIMMYT; -0.34 And 1.00 in Piranão, with average values of 0.47 and 0.36, respectively. The genetic distance among the top 40 genotypes of each population was analyzed by UPGMA clustering method, where the formation of two groups with an average distance of 0.42 was possible. The quantification of this variability was obtained by the analysis of molecular variance (AMOVA), where it was observed that from the total genetic variance, 27% was detected among populations and 73% within populations. Greater variability was observed among individuals within groups when comparing the groups separately. Based on these results, it can be observed that one of the main objectives of a recurrent selection program has been achieved, ie, the genetic variability within populations has been maintained at satisfactory levels, while the variability has increased over cycles of selection, contributing to the longevity of the breeding program. Populations have extensive genetic diversity, and this diversity corresponding to the functional genome, giving indications that this strategy may contribute to genetic gain, especially associated with grain yield of future hybrids.

1. INTRODUÇÃO

A seleção recorrente recíproca é um esquema cíclico proposto para explorar todos os tipos de ação gênica responsáveis pela heterose. Sua característica mais importante é o melhoramento simultâneo das populações per se e do híbrido entre estas. Desse modo, a finalidade das populações melhoradas pode ser o híbrido interpopulacional para utilização direta como cultivar e também como fontes de linhagens para o desenvolvimento de híbridos (Hallauer e Miranda Filho, 1988). Vasta é a literatura disponível a respeito dos diferentes métodos, sobre as comparações entre eles e sobre a eficiência da seleção recorrente recíproca (Hallauer, 1992; Souza Júnior, 1999).

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância econômica e social, sendo cultivado em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo para a alimentação humana, animal e, mais recentemente, como fonte de biocombustível. No Brasil, a cultura do milho ocupa o segundo lugar, em área e produção de grãos, sendo superada apenas pela cultura da soja e terceiro maior produtor mundial, sendo superado pelos Estados Unidos e pela China (CONAB, 2013). Outros países importantes na produção deste cereal são México, Argentina, Índia, Romênia e África do Sul.

A cultura do milho no Brasil possui enorme diversidade de manejo. Em uma mesma região, convivem agricultores de alta tecnologia, que utilizam todos os insumos disponíveis, e os de agricultura familiar, que utilizam poucos insumos. Essa diferença de manejo é visível, principalmente com relação à semente

utilizada. Os empresários utilizam os melhores híbridos comerciais, enquanto os agricultores familiares utilizam cultivares sem o potencial produtivo desses híbridos ou até mesmo os grãos colhidos na safra anterior como semente. Para que os agricultores familiares possam ter maior lucro, é indispensável que aproveitem a heterose na sua integralidade.

Para isso, é necessário que a semente híbrida seja acessível, sobretudo no que se refere ao custo. Uma opção são os híbridos interpopulacionais, como demonstrado por Souza Sobrinho et al. (2002). Esses híbridos podem ser obtidos de populações derivadas de híbridos simples comerciais que apresentem grande vigor quando cruzadas. Adicionalmente, pode-se promover a seleção recorrente recíproca (SRR) entre essas populações, para aumentar a capacidade de combinação entre elas.

A Seleção Recorrente Recíproca é um método que 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.

O presente trabalho visa aprimorar o programa de melhoramento de milho comum da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

(UENF). O mesmo tem gerado bons resultados com destaque para o lançamento e recomendação para a região Norte/Noroeste Fluminense de três cultivares de milho híbrido, 'UENF 506-6', 'UENF 506-8' e UENF506-11', correspondendo a híbridos interpopulacionais resultantes do sexto, oitavo e décimo-primeiro ciclos, respectivamente. O trabalho encontra-se no 13^o ciclo de seleção recorrente, com manutenção dos ganhos genéticos. Na fase atual, os objetivos são manter ou até mesmo ampliar a variabilidade genética entre e dentro das populações, de forma a potencializar ainda mais, a heterose resultante do cruzamento interpopulacional e entre linhagens derivadas das populações em etapas futuras.

2. OBJETIVOS

- a) Conduzir o 13º ciclo de Seleção Recorrente Recíproca entre famílias de irmãos completos;
- b) Melhorar simultaneamente as populações de milho CIMMYT e Piranão;
- c) Avaliar características morfoagronômicas e estimar parâmetros genéticos obtidos nas famílias de irmãos completos; e
- d) Utilizar marcadores SSR-EST's para estimar a diversidade genética em progênies de irmãos completos oriundos do programa de seleção recorrente recíproca de milho para auxiliar na etapa de seleção dos genótipos mais divergentes para compor o bloco de recombinação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origem e Classificação Botânica do Milho

O milho é um cereal essencialmente americano, uma vez que é, no continente americano, que se encontram os seus parentes silvestres mais próximos: teosinte e *Tripsacum*, bem como seu centro de origem e diversidade, o México (Hallauer, 1985).

O milho (*Zea mays* L), 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).

Estudos arqueológicos fornecem elementos que permitem afirmar que o milho já existia como cultura, ou seja, em estado de domesticação, há cerca de quatro mil anos e que apresentava as principais características morfológicas que o definem botanicamente na atualidade (Guimarães, 2007).

A origem do milho tem sido bastante estudada e várias hipóteses foram propostas. Três hipóteses podem ser consideradas: 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, e a mais aceita, 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 é uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L. É uma planta monoica, alógama, anual, robusta e ereta com $2n=2x=20$ cromossomos (Paterniani e Campos, 1999).

No entanto, 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 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 F_1 , entre estes acessos, exibem meiose completamente normal e completa fertilidade (Doebley, 2004).

3.2. Importância Socioeconômica

O milho (*Zea mays* L.) está entre as três culturas mais cultivadas no mundo. A utilização do milho como grande cultura deu um enorme salto após o início da utilização dos primeiros híbridos duplos, por volta de 1920. O híbrido duplo foi um sucesso e predominou até 1950, quando o híbrido simples passou a dominar o mercado. Antes daquele período, plantavam-se somente variedades. As pesquisas de melhoramento para produção de híbridos no Brasil começaram em 1932; porém, o primeiro híbrido duplo foi lançado somente em 1946, e o primeiro simples, em 1952 (Fancelli, 1994).

O milho assume importância social e econômica, principalmente pela geração de empregos na zona urbana e rural, e por fornecer produtos largamente utilizados na alimentação humana, tanto na forma “in natura” como processada, como pães, farinha e massas e ainda para a alimentação animal, ração ou silagem (Silva, 2006). Os diferentes usos dos seus derivados estendem-se às

aplicações industriais e farmacêuticas, podendo ser usado para produzir etanol de amido, plásticos, e como base para a produção de antibióticos (Huang et al., 2006; Paes, 2008).

Os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de milho. Na safra 2011/2012 a produção atingiu 313,9 milhões de toneladas (USDA). No período seguinte (2012/2013), por causa da seca, a safra americana sofreu redução de 12,7%. Mesmo assim, o país respondeu por 31,9% do total do milho produzido no mundo (FAO, 2013). O consumo do produto pelos EUA é alto - em torno de 280,0 milhões de toneladas /ano. A China aparece como o segundo maior produtor mundial de milho (208,0 milhões de toneladas). O consumo de milho pelos chineses é superior à produção. Por isso, o país importa grandes quantidades de outros países produtores, inclusive do Brasil. Ainda no ranking mundial, o Brasil ocupa a 3ª posição. A produção brasileira para a safra (2012/2013) foi de 77,4 milhões de toneladas (CONAB, 2013).

O milho é cultivado em praticamente todo o território nacional. Cerca de 77% da área plantada e 92% da produção concentraram-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo que a região Sul participou com 42% da área e 53% da produção; Sudeste com 19% da área e 19% da produção e Centro-Oeste com 15% da área e 19% da produção. Entretanto, a participação dessas regiões, tanto em área plantada quanto em produção, vem se alterando ao longo dos últimos 31 anos. A região Nordeste tem apresentado grandes variações na área plantada e produção, o que dificulta estimar se sua participação tem aumentado ou diminuído. Na região Sul, a participação na área plantada e produção se mantém praticamente constante, enquanto que a região Sudeste reduziu em 10% a área plantada e produção. As regiões Norte e Centro-Oeste, apresentaram, no mesmo período, aumentos da participação na área plantada e produção. Enquanto que a região Norte aumentou sua participação em 5,3% na área plantada e 2,8% na produção, a região Centro-Oeste aumentou sua participação em 9,6% na área plantada e em 14,6% na produção (Agriannual, 2013).

Historicamente, a região Norte/Noroeste Fluminense foi reconhecida como uma das maiores produtoras de cana-de-açúcar do Brasil, a qual apresentava uma agricultura pujante e competitiva baseada em três traços característicos: cultivo em latifúndios, exploração da terra por monocultura e uso

de força de trabalho para o seu desenvolvimento (Silva, 2006; Ribeiro, et al., 2009).

A partir da década de 50, com o surgimento de novas tecnologias, como o emprego de cultivares melhoradas, técnicas mais eficientes de irrigação e emprego de maquinário em larga escala para o plantio, outras regiões de cultivo de cana-de-açúcar ao longo do país se destacaram nesta atividade (Silva, 2006). Entretanto, a indústria canavieira do Norte Fluminense permaneceu produtiva até a década de 80, quando o endividamento dos usineiros, conjugado ao plantio sucessivo em monocultura sem a reposição dos nutrientes do solo ocasionou a redução da produtividade da cana-de-açúcar na região, levando ao declínio da indústria canavieira local (Ribeiro et al., 2009). No panorama atual, a agricultura local encontra-se estagnada e carente de alternativas que permitam aos agricultores da região aumento da renda.

A despeito da região Norte/Noroeste Fluminense não apresentar tradição na produção de milho, com apenas 7.000 ha plantados e produtividade de 2,5 Kg.ha⁻¹ as características edafoclimáticas da região, com relevo de plano a pouco ondulado, favorável ao uso da mecanização no manejo da cultura, e seu clima caracterizado por um verão chuvoso e inverno seco, possibilitam um bom desenvolvimento da cultura do milho comum (Fancelli e Dourado Netto, 2000; Ribeiro et al., 2009). Em adição a este fato, além da necessidade do milho para grãos, a cultura é fartamente utilizada para produção de silagem para o gado na região (SIDRA, 2006).

Diante do exposto, torna-se necessário o desenvolvimento de cultivares que possam atender as demandas dos agricultores da região, promovendo o desenvolvimento da agricultura local, a fixação do homem do campo e o avanço da economia local devido à promoção de emprego e renda. Para tanto, o melhoramento genético vegetal é uma ferramenta indispensável, uma vez que permite a obtenção de cultivares com alta produtividade e adaptados a condições ambientais diversas (Allard, 1971). Uma série de características, como produção, uso eficiente de nitrogênio na adubação, resistência a doenças, adaptação a diferentes ambientes, climas e aumento da qualidade e da quantidade do teor de proteínas, óleos, entre outros podem ser obtidas via melhoramento genético.

O sucesso de um programa de melhoramento depende dos genitores selecionados e de sua capacidade para gerar indivíduos superiores quando em

cruzamento, bem como da fenotipagem destes genótipos, com avaliações em campo das populações, bem como das linhagens e híbridos obtidos via melhoramento (Allard, 1971; Cruz et al., 2004). Este processo ainda pode ser otimizado pela aplicação de tecnologias que visem aumentar a eficiência do processo de seleção, como a seleção assistida por marcadores moleculares.

3.3. Melhoramento Genético 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 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).

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 a resposta *per se* de uma população, enquanto o melhoramento interpopulacional constitui um método para melhorar a resposta heterótica entre duas populações.

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 agrônômico 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).

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 famílias; 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).

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, 2006). Estes índices associam as informações referentes às

diversas características de interesse agrônomo, fazendo uso de pesos econômicos, previamente estabelecidos, bem como de variâncias genóticas e fenotípicas de cada característica, e as respectivas covariâncias entre cada par de características, permitindo, num mesmo programa de seleção, ganhos para diversas características.

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 agrônomo 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. 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, 2006).

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, 2006). Desde o primeiro trabalho desenvolvido por Shull em 1909, vários estudos apresentaram evidências que o cruzamento entre linhas geneticamente divergentes, frequentemente, produzem famílias superiores (Paterniani, 2001).

O conhecimento da variabilidade genética, portanto, entre os genótipos 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).

A quantificação do grau de dissimilaridade genética entre gêneros, espécies, subespécies, populações e materiais elites melhorados é essencial tanto para a genética de populações (Reif et al., 2005) quanto para o sucesso de programas de melhoramento que visam o desenvolvimento de novas cultivares (Máric et al., 2004). Além de proporcionar um melhor entendimento da organização de germoplasma e aumentar a eficiência na amostragem de genótipos, o conhecimento da distância genética também permite a escolha de cruzamentos orientada biologicamente (Vieira et al., 2007; Bertan et al., 2009), resultando na obtenção de progênies segregantes com alta variabilidade genética para a seleção (Máric et al., 2004). Essa variabilidade genética disponível em populações segregantes é fundamental para programas de melhoramento, pois, além de aumentar a chance de identificar genótipos superiores, está diretamente relacionado ao ganho genético obtido através da seleção artificial. Os resultados das análises de diversidade também podem ser utilizados para recomendar novas cultivares quando a meta é aumentar a base genética de cultivares comerciais (Vieira et al., 2007).

3.5. 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 consequente 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 famílias: irmãos completos e famílias, parcialmente, endogâmicas S_1 ; b) avaliação de famílias: realizada em ensaios envolvendo repetições e locais, por meio de delineamento experimental apropriado; e c) recombinação das famílias selecionadas: com a finalidade de gerar variabilidade para o próximo ciclo de seleção. Para a recombinação, utiliza-se a semente remanescente das famílias selecionadas. Parte das sementes é destinada aos ensaios de competição e a outra parte (S_1) 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 agrônomico. 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, 2006).

Uma das estratégias 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 (SRRFIC), 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 famílias de irmãos completos (A x B), avaliadas em ensaios de produção, os quais permitem identificar as combinações (famílias) mais promissoras. Cada ciclo se completa quando as famílias 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 famílias de irmãos completos, as sementes S_1 correspondentes às melhores famílias são plantadas, efetuando-se a autofecundação das plantas envolvidas nos cruzamentos, gerando, após algumas gerações de autofecundação, linhagens potenciais para híbridos de alta produção.

Existem diversas variações do esquema de seleção recorrente recíproca. O método de SRRFIC é obtido do cruzamento entre pares de plantas selecionadas na população, autofecundando-se, simultaneamente, os indivíduos selecionados. Para tanto há a necessidade de as 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 famílias 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).

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 (Benchimol et al., 2000; Vigouroux et al., 2005; Tardin et al., 2007; Aguiar et al., 2008; Balestre et al., 2008; Cunha et al., 2012; Berilli et al., 2013). 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; Paterniani e Vencovsky, 1977).

Portanto, estabelecer e melhorar novos grupos heteróticos pode ser de grande ajuda para melhorar a resposta agrônômica 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 moleculares, os quais permitem um estudo sem ou pouca interferência ambiental na divergência genética, como ocorre com os marcadores morfoagronômicos (Milach, 1998).

Existem inúmeros trabalhos baseados em melhoramento conduzido por SRRFIC. Tardin et al. (2007) fizeram uma modificação no método de SRRFIC, incorporando, antes da etapa de recombinação propriamente dita, uma etapa de avaliação da diversidade genética dos genótipos 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. Além disso, 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 et al. (2011) conduziram o 10º Ciclo de SRRFIC em Milho, incorporando uma etapa com marcador molecular RFLP, na identificação de genótipos superiores, para a condução dos próximos ciclos do programa. Cunha et al. (2012) também utilizaram um marcador

molecular, ISSR, em seu trabalho para conduzir 12^o Ciclo de SRRFIC, com o objetivo de avaliar a variabilidade entre e dentro das progênies S₁ selecionadas com base no índice de seleção.

3.6. 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, 2006).

O termo parâmetro é utilizado para designar as constantes características de uma população, particularmente, a média e a variância. 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). 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).

3.7. 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; Cruz e Regazzi, 2001; Tardin et al., 2007; Berilli et al., 2011; Cunha et al., 2012; Berilli et al., 2013).

Para se obter genótipos 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 produtor e 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 várias 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, 2006).

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 utilizar os índices de seleção, são necessários o valor econômico relativo a cada característica, e as covariâncias genotípicas 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 genotípicas. Assim, este índice é estabelecido pela combinação linear dos valores fenotípicos médios dos caracteres ponderados pelos seus respectivos pesos econômicos.

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).

Os índices de seleção têm sido utilizados pelo Programa de Melhoramento de Milho da UENF. Tardin et al. (2007) utilizaram o índice de Smith (1936) e Hazel (1943), quando, após várias tentativas de atribuição de pesos econômicos, as 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 et al. (2011) também utilizaram 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. Berilli et al. (2013) com base nos resultados do índice de seleção de Mulamba e Mock, das 242 famílias de irmãos

completos avaliadas no delineamento em látice, selecionaram as 42 famílias consideradas superiores em suas características morfoagronômicas. De acordo com Cunha et al. (2012) para seleção das famílias, o índice de seleção, Mulamba e Mock foi o que proporcionou ganhos mais adequados para o conjunto de características avaliadas, empregando-se pesos econômicos atribuídos por tentativas.

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 famílias superiores.

3.8. Marcadores Moleculares

A etapa inicial de um programa de melhoramento baseia-se principalmente na escolha de genitores e no planejamento dos futuros cruzamentos. As avaliações da diversidade genética dos potenciais genitores por meio de marcadores moleculares são, muitas vezes, correlacionadas com resposta heterótica. A associação entre técnicas moleculares e procedimentos convencionais permite reduzir esse tempo e proporciona melhorias direcionadas.

O uso dos marcadores moleculares em programas de seleção recorrente inicialmente teve como principal objetivo a investigação das mudanças nas frequências alélicas decorrentes da etapa de seleção inerente a este método (Labate et al., 1999; Koeyer et al., 2001; Pinto et al., 2003a). No entanto, o uso dessa ferramenta molecular para auxiliar o melhorista durante as etapas de execução da seleção recorrente foi observada a partir do trabalho de Tardin et al. (2007), onde os autores utilizaram as informações moleculares para identificar os genótipos mais divergentes em duas populações de milho comum, em programa

de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos (SRRFIC), buscando potencializar os ganhos genéticos com a exploração da heterose.

De acordo com Milach (1998), os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, os de hibridação e os de amplificação do DNA. Entre os marcadores baseados em hibridação estão o RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), minissatélites ou VNTR (*Variable number of tandem repeats*). Já os baseados em amplificação do DNA incluem marcadores do tipo RAPD (*Random amplified of polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence characterized amplified regions*), STS (*Sequence tagged sites*), microsatélites ou SSR (*Single sequence repeats*), AFLPs (*Amplified fragment length polymorphism*) e SNP (*Single nucleotide polymorphism*).

A partir da década de 80, foi realizado enorme e rápido progresso nas técnicas de marcadores moleculares, e assim, os estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético passaram a ser realizados com maior segurança, rapidez e eficiência. Estas ferramentas são importantes por apresentarem grande quantidade de polimorfismo. A escolha de uma técnica de marcador molecular depende de sua reprodutividade e simplicidade. Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis hoje se diferenciam pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade ao nível de DNA, e assim variam de acordo com a habilidade de detectar diferenças entre os indivíduos, custos, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Borém e Caixeta, 2009). Os marcadores moleculares possibilitaram não só a quantificação da variabilidade genética existente dentro e entre espécies distintas, como também influenciaram positivamente nas técnicas de mapeamento, possibilitado a incorporação de novos alelos provenientes de espécies relacionadas aos programas de melhoramento (Bered, 1997).

Os marcadores de DNA são ferramentas moleculares poderosas por atuarem diretamente no nível de DNA. Sendo pouco influenciados pelo ambiente, 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).

Desta forma, no melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a manipulação assistida por marcadores moleculares, buscando obter maior eficiência na transferência de alelos favoráveis. Marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica têm sido desenvolvidos, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoces (Borém e Caixeta, 2009).

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 (Falconer e Mackay, 1996).

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).

O programa de melhoramento de milho comum da UENF, envolvendo as populações CIMMYT e Piranão, há alguns anos vem trabalhando com efetividade com a SRRFIC monitorada por marcadores moleculares (Tardin et al., 2007; Berilli et al., 2011; Cunha et al., 2012; Berilli et al., 2013). O uso dessa ferramenta auxiliar no programa de SRR teve início no oitavo ciclo com o uso de marcador RAPD (Tardin et al., 2007), seguido pelo marcador AFLP no nono ciclo (Gabriel, 2006) e marcador ISSR no décimo e décimo segundo ciclo de SRRFIC (Berilli et al., 2011; Cunha et al., 2012). A eficácia desta metodologia pode ser comprovada pelo registro junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) de duas cultivares de milho híbrido recomendados para a região Norte/Noroeste Fluminense, 'UENF 506-6' e 'UENF50611'.

Entre os marcadores baseados em polimorfismo do DNA, destacam-se os microssatélites (ou SSR). Estes se constituem em alternativa promissora por se tratar de uma técnica relativamente simples, com resolução adequada em matriz

de agarose, necessidade de pequena quantidade de DNA para análise e por não exigir conhecimento aprofundado de biologia molecular por parte do analista, nem instalações sofisticadas de laboratório (Oliveira et al., 2010). Repetições de sequências simples (SSR's), ou microssatélites, com repetições em tandem de sequências motifs de di- à tetra-nucleotídeos flanqueado por sequências únicas, são ubíquos, abundantes e bem distribuídos em genomas de eucariotos (Wang et al., 1994). Uma limitação relevante para a aplicação desse tipo de marcador é a necessidade de conhecimento prévio das sequências genômicas para o desenvolvimento de iniciadores. No entanto, esta limitação vem diminuindo na cultura do mamoeiro devido ao grande esforço que tem sido direcionado ao sequenciamento genômico e ao desenvolvimento de marcadores SSR específicos para a espécie (Eustice et al., 2008).

Os marcadores SSR permitem monitorar o nível de homozigose das linhagens e acelerar o processo de obtenção das mesmas, identificando os indivíduos que apresentam maior número de locos em homozigose (Milach, 1998; Oliveira et al., 2010). Esses marcadores são os mais indicados para o monitoramento da pureza genética, devido às suas características de multialelismo e codominância, apresentando um elevado conteúdo de informação genética por *locus*. Uma vez identificada a heterozigosidade residual em uma linhagem, elas podem ser submetidas ao avanço na geração de autofecundação, a partir de indivíduos únicos que apresentem níveis elevados de homozigose entre os *loci* avaliados.

3.8.1. Marcadores Moleculares Microssatélites Gênicos

As pesquisas em biotecnologia estão trazendo grande impacto para a agricultura e a indústria alimentícia em todo o mundo. Os métodos para se analisar a estrutura e função de genes, em larga escala, denominados coletivamente de tecnologia genômica, têm proporcionado uma enorme produção de informações e a geração de bancos de dados de sequências de DNA, que possibilitam a identificação dos fatores genéticos determinantes e/ou associados com características de interesse agrônômico (Saha et al., 2002).

O sequenciamento do genoma total de organismos superiores, como o milho, é uma tarefa árdua e de custo elevado, devido à sua complexidade e

tamanho. Por isso, vários projetos de sequenciamento de plantas vêm optando pelo sequenciamento de *Expressed Sequence Tags* ou EST, onde apenas os genes expressos pelo organismo são sequenciados. Genes expressos são aqueles que se encontram ativos no momento e nas condições da análise. O banco de dados obtido pelos pesquisadores brasileiros é o resultado do sequenciamento de várias bibliotecas de cDNA, ou seja, sequências de DNA correspondentes aos genes expressos nos vários tecidos da planta (folhas, raízes, frutos, flores e ramos - sadios e submetidos a estresses bióticos e abióticos como pragas, doenças, frio, calor, seca) em diversos estágios de desenvolvimento (Rudd, 2003).

Os SSRs derivados de bibliotecas EST oferecem a vantagem sobre SSRs genômicos, de estar intrinsecamente associados com sequências codificantes do genoma (Eujayl et al., 2002), fornecendo assim informações funcionais sobre as regiões do genoma relacionadas com as variações fenotípicas.

Diferenças nas frequências e nas classes de microssatélites também são encontradas dentro das sequências expressas (EST's). Sequência de DNA das regiões 5' não-traduzida (*upstream* do gene), da 3' não-traduzida (*downstream* do gene) ou dos *introns*, normalmente, possuem mais repetições de di e tetranucleotídeos, que regiões traduzidas, onde os trinucleotídeos são mais abundantes (Smulder et al., 1997; Cardle et al., 2000).

Os marcadores SSR provenientes das EST's são conhecidos também como SSR-EST ou SSRs gênicos. Eles possuem a vantagem adicional de serem desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma, o que pode aumentar a chance de marcar características de interesse e, conseqüentemente, a sua eficiência na seleção assistida por marcadores. Como outras vantagens, por ser uma metodologia relativamente simples, de desenvolvimento de marcadores microssatélites é a que demanda menos tempo e recurso (Yu et al., 1999).

Os SSR-EST's possuem maior potencial em acessar a diversidade funcional dos bancos de germoplasma e populações naturais. Estes não se agrupam próximo ao centrômero, o que acontece nos marcadores microssatélites genômicos, e sim, concentram-se em regiões ricas em genes (Varshney et al., 2005).

Devido as vantagens do desenvolvimento dos marcadores SSR utilizando as informações das sequências disponíveis, estes estão sendo identificados,

desenvolvidos e usados em diferentes estudos e em várias espécies de plantas, inclusive para a cultura do milho (Senior et al., 1996) e, portanto, disponíveis na literatura. A expectativa é potencializar os ganhos genéticos nos próximos ciclos do programa de melhoramento, haja vista que as divergências intra e inter populacionais estarão diretamente associadas ao genoma funcional, ampliando a expectativa de que tais divergências reflitam em maior heterose em futuros híbridos.

Uma metodologia alternativa utilizada para o desenvolvimento de marcadores SSR é a análise de sequências dos bancos de dados utilizando recursos computacionais. As sequências de DNA disponibilizadas nos bancos públicos ou restritos são fontes para a identificação de novos marcadores microssatélites. Essas sequências são na grande maioria, sequências transcritas, conhecidas como ESTs (*Expressed Sequence Tags*), e podem ser analisadas através de diferentes programas computacionais disponíveis nos dias de hoje. Depois de identificados os microssatélites nas sequências transcritas, *primers locus*-específicos flanqueando estas repetições podem ser desenhados e a região contendo o microssatélite, amplificada (Cho et al., 2000). Os marcadores SSR-ESTs têm sido amplamente empregados como uma poderosa ferramenta genético-molecular devido ao seu alto nível de transferibilidade, próxima associação com genes de função conhecida e baixo custo para desenvolvimento com a disponibilidade de bancos de dados públicos (Zhang et al., 2014).

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).

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). 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 (Cruz et al., 2004).

3.8.2. Dispersão Gráfica (Análise das Coordenadas Principais - PCA)

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 - PCA. 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.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Genético

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, Piranão, também é oriunda da mesma universidade, 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, encontram-se no 14º ciclo e fazem parte do programa de melhoramento de milho 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 (SRRFIC), conduzido pela universidade.

4.2. Seleção Recorrente Recíproca

Na Seleção Recorrente Recíproca, cada ciclo envolve três etapas básicas a serem seguidas: a) a geração de famílias ou famílias de irmãos completos; b) a avaliação das famílias para a identificação das superiores; e c) a recombinação

das sementes remanescentes (S_1) correspondentes às famílias superiores, para a obtenção das populações em um ciclo mais avançado.

Neste trabalho foi utilizada a metodologia descrita por Hallauer e Ebehart (1970), 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 das S_1 , foi realizado em março de 2010 no Campo Experimental da UENF, anexo ao Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes, RJ, situado a 21° 45' de latitude sul e 41° 20' de longitude oeste, e a 11 m de altitude, classificado como tropical chuvoso, clima de bosque com uma precipitação média anual de 1023 mm, evapotranspiração potencial de 1601 mm anuais e temperatura média anual de 23 °C (Fontes, 2002).

Foram semeadas 300 linhas (150 de cada população) com sementes recombinadas do último ciclo de seleção recorrente interpopulacional, 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).

Na etapa de obtenção de famílias 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 210 famílias de irmãos completos e 420 famílias 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 Famílias de Irmãos Completos

4.2.2.1. Local e Delineamento Experimental

As 210 famílias de irmãos completos, obtidas na etapa anterior, foram avaliadas em outubro de 2010, em delineamento em blocos ao acaso arranjados em set com duas repetições dentro de set, em dois ambientes: Campos dos Goytacazes - Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, região Norte do Estado do Rio de Janeiro, situado a 21° 45' de latitude sul e a 41° 20' de longitude oeste, e a 11 m de altitude, classificado como tropical chuvoso, clima de bosque com uma precipitação média anual de 1023 mm, evapotranspiração potencial de 1601 mm anuais e temperatura média anual de 23 °C e Itaocara - Estação Experimental da PESAGRO - RIO, localizada na Região Noroeste Fluminense, situada a 21° 39' 12" de latitude sul e 42° 04' 36" de longitude oeste, e a 60 m de altitude, com temperatura média anual de 22,5 °C e precipitação média anual de 1041 mm (Fontes, 2002).

Dado o grande número de tratamentos (210 famílias), estas foram agrupadas em seis “sets”, contendo cada um 35 famílias e cinco testemunhas ($C_8 \times P_8$; $C_{10} \times P_{10}$; $C_{11} \times P_{11}$; $C_{12} \times P_{12}$ e BR 106) (Apêndice A), totalizando 40

tratamentos por set. 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 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 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).

Após o florescimento das plantas, foram avaliadas as seguintes características, em cada unidade experimental: 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; número de plantas (NPL): número total de plantas no momento da colheita; empalhamento (EMP): número de espigas mal empalhadas (que deixam grãos expostos), no momento da colheita; número de espigas (NESP): número total de espigas colhidas; número de espigas doentes (NED): número de espigas manifestando sintomas de doença; peso de espigas (PES): peso, em gramas por parcela, das espigas despalhadas, com precisão de centésimos de quilograma; produção (PROD): produtividade estimada com base no peso dos grãos debulhados, em quilogramas por metro de fileira; e 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 2011.

4.2.2.2. Seleção das Famílias Superiores - Análise Estatística

4.2.2.2.1. Análise de Variância

As características foram submetidas à análise de variância, conforme o delineamento em blocos ao acaso arranjados em set, de acordo com o modelo genético estatístico proposto por Hallauer e Miranda Filho (1987):

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + S_j + AS_{ij} + R/AS_{ijk} + F/S_{jl} + AF/S_{ijl} + \xi_{ijkl}, \text{ onde:}$$

μ = média experimental;

A_i = efeito fixo do i-ésimo ambiente;

S_j = efeito do j-ésimo “set”;

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

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

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

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

ξ_{ijkl} = erro experimental.

A análise de variância dos dados foi realizada empregando-se os recursos computacionais do Programa 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	E (QM) ^{1/}
Ambientes (A)	a - 1	$\sigma^2 + fr\theta\sigma_{AS}^2 + f\theta\sigma_{R/AS}^2 + r\theta\sigma_{AF/S}^2 + fsr\Phi_A$
Sets (S)	s - 1	$\sigma^2 + ar\sigma_{F/S}^2 + far\sigma_S^2$
A x S	(a - 1) (s - 1)	$\sigma^2 + r\theta\sigma_{AF/S}^2 + f\theta\sigma_{R/AS}^2 + fr\sigma_{AS}^2$
Repetições (R) / A x S	as (r - 1)	$\sigma^2 + f\theta\sigma_{R/AS}^2$
Famílias (F) / S	s (f - 1)	$\sigma^2 + ar\sigma_{F/S}^2$
A x F / S	s (f - 1) (a - 1)	$\sigma^2 + r\theta\sigma_{AF/S}^2$
Erro	as (f - 1) (r - 1)	σ^2
Total	afrs - 1	

$$^{1/} \theta = \frac{a}{a-1}; \quad \Phi_A = \frac{\sum A_i^2}{a-1}$$

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

4.2.2.2.2. Estimadores de Parâmetros Genéticos

Variância genotípica entre famílias: $\sigma_g^2 = (QMF-QMR)/ar$

em que:

QMF = quadrado médio das famílias;

QMR = quadrado médio do resíduo;

a = ambiente; e

r = repetição.

Variância fenotípica entre famílias: $\sigma_f^2 = QMF/ar$

em que:

QMF = quadrado médio das famílias;

a = ambiente; e

r = repetição.

Herdabilidade com base na média de famílias: $h_{x_f}^2 = \sigma_g^2 / \sigma_f^2$

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

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

4.2.2.2.3. Estimativa dos Ganhos por meio de Índices de Seleção

4.2.2.2.3.1. Índice de Smith (1936) e Hazel (1943)

Esse índice de seleção foi concebido como uma função linear dos valores fenotípicos observados nas várias características. O valor observado de cada

característica é ponderado por um dos coeficientes do índice (Baker, 1986; Cruz et al., 2004), obtendo-se o seguinte agregado fenotípico:

$$I = b_1 P_1 + \dots + b_i P_i + b_n P_n,$$

em que:

I = índice de seleção;

b_i = o peso atribuído à característica P_i no índice de seleção; e

n = número de características avaliadas.

O valor genético total é representado por uma combinação linear dos valores genéticos de cada característica, ponderados por pesos econômicos conhecidos, definidos pelo pesquisador (Baker, 1986; Marques, 2000). Essa combinação linear é designada do agregado genotípico:

$$W = a_1 G_1 + a_i G_i + \dots + a_n G_n,$$

em que:

W = valor genético ou agregado genotípico;

a_i = peso econômico atribuído ao valor genético G_i de cada característica; e

n = número de características avaliadas.

A variação no agregado genotípico, devida ao uso do índice de seleção, é (Baker, 1986):

$$\Delta W = (W_s - W_o) = b_w (I_s - I_o), \quad (1)$$

em que:

ΔW = variação esperada no valor genotípico;

W_s = valor genotípico dos indivíduos selecionados;

W_o = valor genotípico da população original;

b_w = coeficiente de regressão linear;

I_s = valor do índice de seleção nos indivíduos selecionados; e

I_o = valor do índice de seleção da população original.

A expressão (1) pode ser apresentada da seguinte forma:

$$\Delta W = (\text{Cov}(W,I))/V(I) * (I_s - I_o), \quad (2)$$

em que:

$\text{Cov}(W, I)$ = covariância entre o valor genético e o índice; e

$V(I)$ = variância do índice.

Se a variação for expressa em unidades de desvio padrão, tem-se a expressão (Baker, 1986):

$$\Delta W / \sigma_w = (I_s - I_o) \sigma_{w,i} / (\sigma_i * \sigma_w \sigma_i) = (I_s - I) / \sigma_i r_{WI}, \quad (3)$$

em que:

σ_w = desvio-padrão do agregado genotípico;

σ_i = desvio-padrão do índice de seleção;

$\sigma_w \sigma_i$ = covariância entre o valor genotípico e o índice de seleção; e

r_{WI} = coeficiente de correlação entre o valor genotípico e o índice de seleção.

Como o diferencial de seleção expresso em unidades de desvio-padrão fenotípico depende da intensidade de seleção, para maximizar a expressão (3) são necessários coeficientes do índice de seleção que maximizem a correlação. Smith (1936), citado por Baker (1986), demonstrou que a solução do seguinte sistema de equações na forma matricial é a que maximiza o coeficiente de correlação:

$$Pb = Ga,$$

em que:

P = matriz n por n das variâncias e covariâncias fenotípicas;

b = vetor n x 1 de coeficientes do índice clássico, a ser determinado;

G = matriz n por n das variâncias e covariâncias genotípicas; e

a = vetor n x 1 dos pesos econômicos atribuídos aos valores genéticos.

Com a resolução em ordem a b, obtém-se: $b = P^{-1} Ga$, que permite obter os coeficientes do Índice Clássico.

4.2.2.2.3.2. Índice Clássico de Mulamba e Mock (1978)

O índice de Mulamba e Mock (1978) hierarquiza os genótipos, inicialmente, para cada característica, por meio da atribuição de valores absolutos mais elevados àqueles de melhor desempenho. Por fim, os valores atribuídos a cada característica são somados, obtendo-se a soma dos “ranks”, que assinala a classificação dos genótipos (Cruz et al., 2004).

4.2.2.2.3.3. Índice de Pesek e Baker (1969)

Os pesos econômicos constituem uma das dificuldades da aplicação do Índice Clássico de Smith (1936) e Hazel (1943) e por essa razão foi proposto por Pesek e Baker, em 1969, um índice de seleção baseado nos ganhos desejados, os quais são mais fáceis de definir. Segundo Cruz et al. (2004), a partir da expressão fornecida pelo Índice Clássico de Smith (1936) e Hazel (1943), obtém-se a expressão dos ganhos esperados:

$$\Delta g = G b_i / \sigma_i,$$

em que:

Δg = vetor de ganhos esperados;

G = matriz das variâncias e covariâncias genotípicas;

b_i = vetor $n \times 1$ de coeficientes do índice;

i = intensidade de seleção; e

σ_i = desvio-padrão do índice.

Por substituição do vetor dos ganhos esperados por um vetor com os ganhos desejados, Δg_d , é possível estimar o vetor b dos coeficientes do índice:

$$b = G^{-1} \Delta g_d \sigma_i / i,$$

em que:

σ_i/i = um escalar que não influi na proporcionalidade dos coeficientes e pode ser eliminado.

4.2.2.2.3.4. Índice de Williams (1962)

Este índice de seleção, em geral denominado Índice Base, é uma combinação linear das características de interesse no melhoramento, em que os pesos econômicos são os coeficientes de ponderação do índice, o que dispensa o uso de matrizes de variância e covariâncias (Baker, 1986; Cruz et al. 2004).

Representa-se do seguinte modo:

$$I = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n = a' X,$$

em que:

I = índice de seleção;

a_i = peso econômico atribuído à característica i , sendo $i = 1, \dots, n$;

a' = vetor dos pesos econômicos;

x_i = média da característica i , sendo $i = 1, \dots, n$; e

X = vetor de médias das n características que entram no índice.

Na etapa de seleção 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 espigas mal empalhadas, número de espigas doentes e florescimento.

Nas análises computacionais, foram dados pesos para cada característica analisada que demonstrou diferenças significativas entre os genótipos, pelo teste F, na análise de variância. Foram usados como ganhos desejados o coeficiente de variação genético, o desvio-padrão genotípico, a razão entre o coeficiente de variação genético e o coeficiente de variação experimental,

a herdabilidade e os pesos econômicos obtidos aleatoriamente por tentativas, quais sejam: 300, 1, 10, -10, 100, -10, 300, 20. Atentando-se para os ganhos mais favoráveis para cada característica em questão, deu-se ênfase para produção (uma das características mais importantes do trabalho).

Das 210 famílias avaliadas, em cada população foram selecionadas 40 para o estudo da divergência genética, via marcadores moleculares SSR-EST. O programa computacional Genes (Cruz, 2013) foi utilizado para a realização das análises.

4.2.2.2.4. Estimadores de Ganhos Genéticos

Os cálculos das estimativas dos parâmetros genéticos foram realizados para serem estimados os ganhos por seleção (GS), o ganho no avanço do 12º ciclo para o 13º ciclo, pela expressão:

$$GS = (\overline{X}_s - \overline{X}_0) \cdot h_{X_f}^2$$

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.

4.3. 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 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 Plant Genomics DNA Extraction Kit YGP 100 - RBC (BioAmerica).

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 “GelRed™”, 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 100 ng). As imagens foram reveladas pelo sistema de fotodocumentação MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems).

Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação no aparelho NANODROP 2000c, para mensurar o volume de DNA genômico obtido, com leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 260 nm. Posteriormente, as amostras de trabalho foram padronizadas na concentração de 5 ng. μl^{-1} e mantidas a -20 °C.

4.3.2. Seleção e Síntese de *primers* SSR-EST

A seleção de *primers* SSR polimórficos para a espécie *Zea mays* L., os quais foram desenvolvidos e mapeados por Sharapova et al. (2002), foi realizada a partir de buscas em bancos de dados e também na literatura. Foi realizada uma busca de sequências SSR-EST ligadas a características de interesse agrônomo em bancos de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=zea%20mays>), especificamente no mapa IBM02 (cultura do milho comum), que se encontra completo para os 10 grupos de ligação.

Inicialmente, foi selecionado um total de 667 *primers* de SSR-EST nos 10 grupos de ligação componentes do mapa. Em seguida, foi realizada uma triagem

dos *primers*, buscando manter uma distância genética mínima de 30 cM ao longo de cada cromossomo, evitando-se a seleção de *primers* localizados na extremidade de cada braço, resultando na obtenção de um total de 165 *primers* SSR-ESTs, que foram enviados para síntese.

Após a síntese, os *primers* foram suspensos em água ultrapura de acordo com as indicações do fabricante. Posteriormente, os tubos foram identificados e em seguida, misturados em um único tubo às sequências *Forward* e *Reverse* de cada *primer*.

4.3.3. Reação de Amplificação da Polimerase em Cadeia

Para testar as condições de todos os PCR, foi realizado um gradiente de temperatura, variando de 50°C a 70,5°C, tendo sido selecionadas as temperaturas ótimas para cada um dos 36 *primers*. Após a definição das temperaturas, foi realizado um *screening*, no qual foram selecionados 20 *primers* com base no grau de polimorfismo e na qualidade de amplificação (Tabela 2).

As reações de amplificação de DNA foram realizadas em um volume final de 30 µL, contendo 30 ng de DNA, 6 µL de tampão de reação 5X, MgCl₂ (1,5mM), DNTPs (200 µM de cada), 0,5 µM de cada iniciador (Sigma, USA) e 0,75 U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA). As amplificações foram realizadas utilizando-se a técnica de “touchdown”, em termociclador Eppendorf, em que a temperatura de pareamento dos *primers* teve início com 5°C acima da temperatura ótima e sofreu um decréscimo de 1°C durante os cinco primeiros ciclos de amplificação até alcançar a temperatura desejada. O programa utilizado foi de 94°C durante 4 minutos; 94°C por 1 minuto; Y°C com redução de 1°C a cada ciclo por 1 minuto; 72°C por 3 minutos (durante os cinco primeiros ciclos); 94°C por 1 minuto; Y°C por 1 minuto; 72°C por 3 minutos (durante 30 ciclos); 72°C por 7 minutos, onde: Y= Temperatura de anelamento específica para cada *primer* (Tabela 2).

4.3.5. Eletroforese

Após a amplificação, o material foi distribuído em placas específicas contendo 96 poços para eletroforese capilar no aparelho AdvanCETM FS96 junto

com outra placa contendo o marcador de 10 e 500 pares de base da NoLimits™. Foi utilizado também o marcador DNA Ladder (Invitrogen, USA) de 250pb durante as corridas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. O material contido nas placas foi transportado para os capilares onde foram submetidos à corrida de 140 minutos em uma corrente de 7,50 Kw. Após esta etapa, as imagens resultantes da eletroforese foram utilizadas para análise.

Tabela 2 - Sequências dos vinte *primers* SSR-EST's utilizados no trabalho e respectivos *locus*, número do cromossomo, distância do centrômero (cM), sequência dos *primers* e temperaturas de anelamento.

<i>Locus</i>	Cromossomo	cM	Sequência (5' → 3')	TM (°C)
umc1948	1	82,6	<u>ATCTATCTGGTTTCACGATCTCGC</u> TGTTGAAATAATGGAACACCTCCC	53,2°C
umc1917	1	335	<u>ACTTCCACTTCACCAGCCTTTTC</u> GGAAAGAAGAGCCGCTTGGT	68,1°C
umc2149	1	798,4	<u>AGCAGCACCATCGTAATAAGCAC</u> TACATGCAAAGCTAGCTAGTCGGA	58,1°C
umc1108	2	358,6	<u>ATGATGAAGCCTCACACATACGAA</u> TAAAGAGAGAGGAAACAAGCTGCG	60,8°C
cko1	3	97	<u>GAACCCCTCCACGTAGCTCAG</u> GCCACGCTCAACTACGACAAC	53,2°C
umc1135	3	466,4	<u>CGCTAGCTTAGCTCCATCGTTTTA</u> TTTTTAACCTCACGAGCATCGTCT	53,2°C
umc2152	3	616,9	<u>CCTTTGTCTTCCGCTATCTTCCTT</u> TAGCTTCACCTGATGATCTTGAC	60,8°C
umc1969	4	242,1	<u>CTCGAGCCCAGCAGAGAAAG</u> GGTGGAGCCCATGGCTATTACTAT	60,8°C
umc1031	4	276,3	<u>ACGTGGACAACCAGTCTATCAACA</u> TTGGGTTTCATACCTCCTAGGAACA	60,8°C

Tabela 2 – Cont.

bip2	4	669,1	<u>AGCAAGCAGTTTCGAAACAAGGAT</u> <u>GACACCAGCACCACTTGAACG</u>	60,8°C
gln4	5	469,2	<u>AGCAGAACGGCAAGGGCTACT</u> <u>TTTGGCACACCACGACGA</u>	58,1°C
umc1250	6	228,6	<u>CTGCTGCTTTTTGGTGTGTCTCT</u> <u>GAGGCAAGAGCTAGGTCTCGATAG</u>	53,2°C
umc2170	6	392,9	<u>CACTGCAAGCCTCTACAGACAATG</u> <u>GAGAGTTCTCCAGGCGAGGTG</u>	60,8°C
umc1412	7	478,6	<u>CTCAGCTTGCAGGTTATCGCTT</u> <u>GCATCTGTAGCCTTTTTGTGTGTG</u>	60,8°C
umc1268	8	452	<u>ACGAACAACCTAGCACAGTCCTAAA</u> <u>CAAGGCGGTTACCAAGTTTACATC</u>	53,2°C
umc1078	9	306,5	<u>AGGCACTAGCAGGCGAGAGG</u> <u>GCGTAGTAACATCCATCCAACCAA</u>	68,1°C
umc1714	9	514,1	<u>CAAGGGCTCTTGCTCTTGA ACTAA</u> <u>CGACGACCTTAATTGTGTTCTTT</u>	60,8°C
umc1739	10	177,4	<u>CAAAAAGCTTTAGTTTTTACAGGCAGA</u> <u>GCGTGTAATTTGCTCCTTCTTCTT</u>	63,5°C
tip5	10	335,1	<u>TTGACAAGCTAGTGTGCAACTGTG</u> <u>TGAAAGCCCACTGGACAACTAAT</u>	53,2°C
umc2126	10	452,1	<u>CAGTTCTGCACTTCTGCTTGCTC</u> <u>AGGACTGTGAAGAGCGCGAG</u>	68,1°C

4.3.5. Análise dos Dados Moleculares via SSR-EST

Os dados obtidos a partir da amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código numérico para cada alelo por *locus*, conforme procedimento descrito por Ramos et al. (2011).

Para a análise molecular, inicialmente foi estimada a Diversidade Genética, heterozigosidade observada (H_o) para o grupo de genótipos em questão, além do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e o coeficiente de endogamia (f), utilizando o programa PowerMarker versão 3.25 (Liu e Muse, 2005). O aplicativo Genes (Cruz, 2013) foi utilizado para obtenção da matriz de dissimilaridade genética através do Índice Ponderado, bem como para analisar a variabilidade genética entre e dentro dos grupos através da Análise de Variância Molecular (AMOVA). Posteriormente, com o auxílio do programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2009) foi realizada uma dispersão gráfica dos genótipos com base no método da Análise das Coordenadas Principais (PCA), bem como a análise da frequência alélica.

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 via marcadores de DNA, de forma que os materiais recombinados de maneira independente, em cada população, foram superiores agronomicamente e divergentes. As recombinações foram conduzidas de maneira a assegurar que cada genótipo se cruzasse com todos os outros dentro de sua respectiva população. 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 do milho (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, 15 foram eliminados de cada população, permanecendo 25 genótipos de cada população para compor as populações melhoradas (14º 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: 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 Famílias de Irmãos Completos e Análise de Variância

Na Tabela 3, encontram-se 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 8 características avaliadas, em 210 famílias de irmãos completos, nos dois ambientes avaliados, Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ.

Verifica-se que houve diferenças significativas pelo teste F em nível de 5% e 1 % de probabilidade, para Ambiente (A), para às 8 características, sendo os ambientes 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 famílias em seleção recorrente, bem como em ensaios de comparação de desempenho agrícola.

As características PROD, FLO, NPL, EMP, NED, PES e P100 revelaram diferenças significativas para “sets” demonstrando 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. Para a característica NESP, a ausência de significância para a referida fonte de variação não significa que os “sets” foram mal compostos,

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 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 2010/2011.

FV	GL	Quadrado Médio ^{1/}							
		PROD	FLO	NPL	EMP	NESP	NED	PES	P100
Ambientes (A)	1	6457232,2**	156,687**	102,283 **	9,982**	2091,463*	326,498**	2441558,5**	994,477**
Sets (S)	5	10033874,9*	37,129**	66,138**	3,583**	298,075 ^{ns}	7,190**	3939307,7*	175,818**
AxS	5	35371093,3**	19,781**	68,089 ^{ns}	1,355*	384,897*	12,417**	11279456,3**	105,364 ^{ns}
Repetições (R) / AxS	12	4602210,3**	7,441**	17,683*	2,126 ^{ns}	69,048*	7,466**	1474037,1**	30,526 ^{ns}
Famílias (F) / S	204	3432278,9**	5,687**	15,707**	0,786**	98,144**	6,823*	1155664,2**	26,135**
AxF / S	204	1383187,8 ^{ns}	4,186 ^{ns}	7,275 ^{ns}	0,624 ^{ns}	22,354 ^{ns}	4,743 ^{ns}	475841,9 ^{ns}	10,400 ^{ns}
Resíduo	408	1759043,0	3,009	7,872	0,629	28,932	4,762	542689,5	11,345
CV _e (%)	-	22,733	2,746	12,224	195,721	15,832	89,604	20,275	11,802
Média Geral	-	5834,211	63,160	22,950	0,405	33,973	2,435	3633,373	28,539
Média em Campos	-	5925,962	63,610	23,298	0,295	32,406	1,802	3580,769	29,627
Média em Itaocara	-	5743,333	62,714	22,607	0,514	35,526	3,061	3685,476	27,461

^{1/} PROD = produção (Kg/ha); FLO = número de dias para florescimento; NPL = número de plantas; EMP = empalhamento; NESP = número de espigas; NED = número de espigas doentes; PES = peso de espigas; 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.

mas apenas que o arranjo das famílias em cada “set” não resultou em diferenças significativas.

Levando-se em consideração a interação Ambiente x “Set” (AxS), nota-se que as características PROD, FLO, EMP, NESP, NED e PES revelaram diferenças significativas, denotando que os genótipos, aleatoriamente distribuídos nos sets, mostraram modificações fenotípicas estimuladas pelas mudanças edafoclimáticas dos ambientes. Enquanto as características NPL e P100, houve ausência de significância, o que indica que os genótipos nos diferentes “sets” comportaram-se de forma semelhante mesmo diante das mudanças edafoclimáticas dos ambientes.

Para a fonte de variação genótipo dentro de “set” (G/S), as 8 características apresentaram significâncias em nível de 5 % (NED) e 1 % (FLO, NPL, EMP, NESP, PES, P100 e PROD) de probabilidade pelo teste F, demonstrando haver variabilidade genética suficiente a ser explorada nos ciclos, possibilitando progressos com a seleção. Além disso, indica que o objetivo de melhoramento da população sem perda da variabilidade genética pela seleção recorrente foi alcançado também na população de 13º ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos.

Avaliando-se a característica NPL (Tabela 3), verifica-se a ocorrência de significância para a fonte de variação G/S em 1% de probabilidade, pelo teste F. A ocorrência de falhas de plantas nas parcelas, causando variações no número de plantas, é um problema que ocorre com frequência em experimentos realizados em campo, dificultando a comparação entre tratamentos, pois reduz a confiabilidade das análises biométricas, dos testes de hipóteses e das comparações entre médias de tratamentos. Nesse experimento, o número de plantas foi de 10 a 27 plantas por parcela; no entanto, a correção para NPL não foi realizada por não ser um procedimento adequado para o presente conjunto de dados. Deste modo, esta significância pode ser devido a causas genéticas e não ambientais, pois, conforme a Tabela 3, essa característica não apresentou significância para a fonte de variação A x S.

A ausência de valor significativo para a interação Ambiente x genótipo dentro de “set” (AxG/S), para as características PROD, FLO, NPL, EMP, NESP, NED, PES e P100, evidencia que as famílias mantiveram a mesma resposta fenotípica 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. Ferrão (1985), Santos et al. (2007), Tardin et al. (2007), Berilli et al. (2011) e Cunha et al. (2012) 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.

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 13º 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.

Para a interação $G \times A$, apresentou ausência de significância para a maioria das características avaliadas, indicando, assim, um comportamento similar destes genótipos nos dois ambientes estudados. Isto sugere que há possibilidade de recombinação simultânea de genótipos superiores para ambos os locais e a condução de um único programa de melhoramento.

A variabilidade genética é necessária para a condução de um programa de seleção recorrente. Porém, a significância para as características EMP e NED 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 ($CV_e\%$) foi observada em FLO, com valor de 2,746%. Quanto à característica que apresentou maior $CV_e\%$, foi observado em EMP, com o valor de 195,721%. Quanto menor o $CV_e\%$ 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 (Rangel et al., 2007). Resultados similares foram

obtidos por Tardin et al. (2007), 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.

Das 8 características avaliadas pelo programa de seleção recorrente, as de maior preocupação, por parte dos melhoristas em milho comum, são a PROD e o 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%.

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. Estimativas 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 experimental (CV_e) para as 8 características avaliadas no 13º ciclo de seleção recorrente recíproca, em famílias de irmãos completos em milho CIMMYT e Piranão, em Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ, indicando que as famílias de irmãos completos dispõem de variabilidade genética para as características e, portanto, são promissores para os próximos ciclos.

Observa-se também a variância genotípica com valores relativamente altos para as características PES e PROD, 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.

Tabela 4 - Estimativas das variâncias genotípicas (σ_g^2), fenotípica (σ_f^2), coeficientes de variação genética (CV_g), índice de variação (I_v) coeficiente de herdabilidade (h_x^2), as médias de cada característica e o coeficiente de variação experimental (CV_e).

Características ^{1/}	Parâmetros genéticos						
	σ_g^2	σ_f^2	$CV_g(\%)$	$I_v(\%)$	h^2	Média	$CV_e(\%)$
PROD	421115,0	870522,5	11,13	48,39	48,33	5828	23,01
FLO	2,608	4,095	2,21	66,22	63,68	72,79	3,35
NPL	1,952005	3,92479	6,07	49,63	49,74	23	12,24
EMP	0,03832	0,19619	47,75	24,40	19,54	0,41	195,74
NES	17,2856	24,5364	12,23	77,15	70,45	34	15,85
PES	153334,3	289577,2	10,78	53,03	52,95	3632	20,33
PGR	105278,8	217630,6	8,93	38,82	48,37	2914	23,01
P100	3,35895	6,76887	6,32	48,95	49,62	29	12,91

^{1/} PROD = produção (pkha); FLO = número de dias para florescimento NPL = número de plantas; EMP = empalhamento; NES = número de espigas; PES = peso de espiga (g); PGR = peso de grãos (g) e P100 = peso de 100 grãos (g).

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

As características, como EMP e NED, foram as que apresentaram elevados valores de coeficiente de variação experimental, 195,74 % e 54,03 % respectivamente. Cunha et al. (2012) e Berilli et al. (2013), avaliando famílias de irmãos completos em milho comum, e Daros et al. (2004), famílias de irmãos completos e S₁ em milho pipoca, também encontraram valores elevados para coeficiente de variação para estas características. Porém, de acordo com Coimbra (2002), esses valores altos de coeficiente de variação para essas características são esperados, de acordo com informações disponíveis na literatura sobre o milho.

Pode-se observar que as outras características NPL, P100 e FLO, apresentam um $CV_e(\%)$ baixo, enquanto, para a característica PROD, um $CV_e(\%)$ médio (23,01 %), 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. (2008), 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 ainda na Tabela 4 que, de maneira geral, as características apresentaram elevados valores de CV_g , destacando-se PES e PROD, o que indica boas chances de sucesso em programas de melhoramento que utilizem essa população, visando à seleção para essas características. Berilli et al. (2013), no 11º ciclo de seleção do mesmo material deste estudo, também identificou valores altos para as características NPL, NED, EMP e PROD.

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 (h_x^2) 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 famílias, condição essa muito favorável para a seleção (Silva, 2006). No caso dos caracteres avaliados, a h_x^2 para as populações, com base na seleção na média das famílias, apresenta oscilação nos valores de 19,54 % a 70,45 %. Para a maioria das características, os valores foram superiores a 40 %, com exceção das características EMP e NED, que apresentaram valores de 19,54 % e 26,61 %, respectivamente. Gabriel (2006), que trabalhou com as mesmas populações do

presente estudo no avanço do 10º ciclo, observou o h_x^2 para a PROD, no valor de 78,79 % e PES 78,02 %. No presente trabalho, para estas características em relevância, observou-se um h_x^2 para PROD no valor de 48,33 % e PES no valor de 52,95 %, 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 8 características no 13º 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) e 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^2) e pesos atribuídos por tentativas (PA) (300,1, 10, -10, 100, 10, 300,20), sendo a seleção praticada em 8 características (PROD, FLO, NPL, EMP, NESP, NED, PES e P100). Ao todo, 40 famílias, das 210 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.

Os ganhos percentuais preditos para o índice de seleção de Mulamba e Mock (1978), para todos os pesos econômicos (Tabela 5), proporcionaram valores simultâneos positivos para característica de maior importância para o programa: produção (PROD). Entretanto, para alguns pesos econômicos, houve menores ganhos, mas quando utilizou-se o peso econômico h^2 , ocorreu o maior ganho para PROD no valor de 11,89%, PES um valor de 11,12% e P100 apresentando um valor de 7,05%. Essa estimativa foi superior à que se obteve quando se usou o peso econômico CV_g/CV_e (10,41%), que proporcionou também

Tabela 5 - Estimativas dos ganhos percentuais, com base no diferencial de seleção, por seleção simultânea, em 8 características no 13º ciclo de seleção recorrente intrapopulacional em famílias de irmãos completos em milho. Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ.

Características ^{1/}	Mulamba e Mock					Smith e Hazel				
	CVg	DPg	CVg/CVe	h ²	PA	CVg	DPg	CVg/CVe	h ²	PA
PROD	9,35	11,95	10,41	19,68	11,89	10,92	11,06	10,92	10,92	10,92
FLO	-5,75	-1,50	1,35	1,33	-1,46	1,82	1,77	1,82	1,82	1,82
NPL	4,31	2,32	2,70	2,60	2,21	2,68	2,67	2,68	2,68	2,68
EMP	-15,39	-1,43	-7,19	-6,75	-0,54	-15,39	-15,39	-15,39	-15,39	-15,39
NESP	11,42	7,70	8,96	8,87	8,36	8,83	8,93	8,83	8,83	8,83
NED	-10,78	-0,96	-2,44	-2,17	-0,41	-1,29	-1,13	-1,29	-1,29	-1,29
PES	10,03	12,15	10,89	11,12	12,12	11,29	11,38	11,29	11,29	11,29
P100	7,98	5,96	7,19	7,05	5,89	4,56	4,70	4,56	4,56	4,56

Características ^{1/}	Willians					Pesek e Backer				
	CVg	DPg	CVg/CVe	h ²	PA	CVg	DPg	CVg/CVe	h ²	PA
PROD	11,35	11,35	11,35	11,35	11,35	11,16	11,16	11,16	11,16	11,16
FLO	1,54	1,50	1,54	1,54	1,50	1,76	1,76	1,76	1,76	1,76
NPL	2,24	2,32	2,24	2,24	2,32	2,63	2,63	2,63	2,63	1,94
EMP	1,68	-1,43	1,68	1,68	-1,43	-15,84	-15,84	-15,84	-15,84	-15,84
NESP	7,50	7,70	7,50	7,50	7,70	8,68	8,68	8,68	8,68	8,68
NED	-0,85	-0,96	-0,85	-0,85	-0,96	-1,29	-1,29	-1,29	-1,29	-1,29
PES	12,15	12,15	12,15	12,15	12,15	11,42	11,42	11,42	11,42	11,42
P100	1,54	1,50	1,54	1,54	1,50	4,70	4,70	4,70	4,70	4,70

Pesos econômicos utilizados nos índices de seleção: CV_g = coeficiente de variação genético; DP_g = desvio-padrão genético; CV_g/CV_e = razão CV_g/CV_e; h² = herdabilidade e PA = Pesos atribuídos por tentativas (300,1, 10, -10, 100, 10, 300,20). ^{1/} PROD = produção (kg/ha); FLO = número de dias de florescimento; NPL = número de plantas; EMP = empalhamento; NESP = número de espigas; NED = número de espigas doentes; PES = peso de espiga (g/parcela); P100 = peso de 100 grãos (gramas).

um maior ganho genético. Nesse contexto, após várias tentativas, atribuindo pesos de várias grandezas aleatoriamente, conseguiu-se prever os ganhos simultâneos mais elevados na principal característica, sendo de 11,89%.

Avaliando-se os pesos econômicos CV_g e DP_g, nota-se que as características FLO, EMP e NED apresentaram ganhos negativos, o que é interessante na confecção de uma população, ou seja, é importante se ter uma

população com menos dias de florescimento, espigas mal empalhadas e número de espigas doentes.

Avaliando-se o peso econômico PA, percebe-se que as características FLO, EMP e NED exibiram ganhos negativos, o que é interessante na confecção de uma população, já as características PROD, NPL, NESP, PES e P100 apresentaram ganhos positivos.

Nesse aspecto, quando se utilizou o índice de seleção de Mulamba e Mock (1978), atribuindo pesos arbitrários, foi possível obter maiores ganhos. Vilarinho et al. (2003), avaliando a eficiência da seleção truncada, dos índices de Smith (1936) e Hazel (1943), de Williams (1962), de Pesek e Baker (1969), de Mulamba e Mock (1978), na identificação de progênies S_1 e S_2 superiores de milho pipoca, concluíram que na estratégia de seleção recomendada para 30 e 60 famílias o índice de Mulamba e Mock (1978) foi o que proporcionou os resultados mais desejáveis para ganhos satisfatórios em produção.

Comparando a eficiência de vários índices de seleção e dos ganhos preditos por cada um deles, no melhoramento da resistência ao frio em duas populações de milho, Crosbie et al. (1980) observaram que os melhores ganhos em todas as características avaliadas foram possíveis com os índices de seleção de Mulamba e Mock e de Williams. Consideraram, ainda, que estes índices têm a vantagem de não serem afetados pela desigualdade das variâncias das características, bem como da simplicidade de uso e de não necessitarem da estimação de parâmetros genéticos, pode-se considerar que eles sejam tão robustos quanto o índice Clássico de Smith (1936) e Hazel (1943).

Rangel et al. (2007), avaliando o avanço de ciclo interpopulacional em milho pipoca, utilizaram 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 %.

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 famílias 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.

No oitavo ciclo de seleção recorrente da população de milho da UENF, Tardin et al. (2007), para selecionar as 43 famílias superiores utilizou-se o índice

de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943), esse índice associa as informações referentes às diversas características de interesse agrônomo, fazendo uso de pesos econômicos, previamente estabelecidos, bem como de variâncias genóticas e fenotípicas de cada característica e as respectivas covariâncias entre cada par de características. Berilli et al. (2011) No entanto, diferentemente da maneira clássica de se utilizar o índice de seleção, a seleção simultânea para o 10º ciclo, foi feita dentro de cada “set”. Para isso, selecionou-se os 10 melhores genótipos, fornecidos pelo índice de Smith e Hazel, dentro de cada “set”, de modo que foi possível aumentar, mesmo em pequena escala, o ganho genético, e ainda permitir um maior controle do efeito ambiente, pois com a estratificação, todos os “sets” vão contribuir com o mesmo número de genótipos, não havendo, portanto, o favorecimento de genótipos que se encontrem em apenas um “set”. Berilli et al. (2013) utilizaram O índice de Mulamba & Mock permitiu a predição de ganhos que melhor se adequaram aos objetivos do programa, ou seja, um maior ganho para produção, considerada a característica de maior importância, e um ganho menor para as características consideradas indesejáveis ao programa, tais como número de plantas quebradas, acamadas e espigas doentes, sendo, portanto, o índice eleito para selecionar as 40 famílias consideradas superiores. Cunha et al. (2012) utilizaram o índice de Mulamba e Mock (1978) para selecionar as famílias superiores no 12º ciclo de seleção recorrente.

Para o presente trabalho, o índice na “soma de ranks” de Mulamba e Mock (1978) permitiu ganhos superiores e melhor distribuídos entre as características. Assim, selecionaram-se os 40 melhores genótipos para recombinação com base no índice de Mulamba e Mock (1978), sendo possível manter o ganho genético para PROD e PES, além de proporcionar ganhos negativos para FLO, EMP e NED, conforme pode ser constatado na Tabela 5.

5.4. Estimativas de Ganho de Seleção

A estimativa de ganho foi obtida por meio do ganho de seleção. O diferencial de seleção foi obtido com a média dos 25 selecionados (7208) menos a média do experimento (5828). A partir deste cálculo, obteve-se o valor de 1380. Considerando o diferencial de seleção e a herdabilidade (0,483), obteve-se o ganho genético no valor de 12 % por ciclo, com a estimativa de 480 kg.ha⁻¹.ciclo⁻¹

e $240 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, 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 13 ciclos de seleção recorrente recíproca, ainda possuem variabilidade genética intra e interpopulacional suficiente para a continuidade do programa de Seleção Recorrente de milho.

5.5. Análise dos Marcadores Moleculares SSR-EST na Seleção dos Genótipos

A partir da análise dos 20 *loci* SSR-EST, foi obtido um total de 93 alelos com número de alelo por *locus* variando de 2 a 8 e média de 4,65 (Tabela 6). Estudos anteriores envolvendo o uso de marcadores moleculares neste mesmo programa de melhoramento consistiu em análises via marcadores dominantes do tipo RAPD (Tardin et al., 2007) e ISSR (Berilli et al., 2011; Cunha et al., 2012), os quais obtiveram valores médios de alelos polimórficos por *primer* de 5,43, 8,77 e 4,04, respectivamente. Tais marcadores são multilocos e hereditariamente dominante, com o número médio de alelos por *primer* correspondentes ao polimorfismo de vários *loci* dispersos aleatoriamente no genoma. Mesmo considerando a diferença da natureza genética dos marcadores utilizados em ciclos prévios e o utilizado no presente estudo, verificamos resultados aproximados e até superior, sendo o polimorfismo relatado neste trabalho proveniente de regiões funcionais do genoma, o que demonstra a potencialidade da técnica para auxiliar o programa de seleção recorrente.

Com a análise do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi possível quantificar o polimorfismo genético de cada *locus* na população em estudo. O PIC indica a informatividade dos *loci* dos referidos marcadores e seu potencial para detectar diferenças entre os genótipos com base em suas relações genéticas (Rajendran et al., 2014). De acordo com Botstein et al. (1980), um *locus* pode ser classificado como altamente informativo quando o valor de PIC for $>$ do que 0,5, moderadamente informativo quando o valor varia de 0,5 a 0,25 e não informativo quando o seu valor é inferior a 0,25. Nesse sentido, dos 20 *loci* microssatélites analisados neste estudo, 14 (70%) podem ser considerados altamente informativos. Em nosso estudo, o valor máximo de PIC foi de 0,76 para o *locus*

Tabela 6 - Iniciadores SSR-EST's e respectiva localização cromossômica, distância do centrômero (cM), temperaturas de anelamento (TM), número de alelos (Na), tamanho dos alelos e conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Locus	GL	cM	TM (°C)	Na	Tamanho Min-Max	PIC
umc1948	1	82,6	53,2°C	4	143 - 196	0,627
umc1917	1	335	68,1°C	3	163 - 204	0,562
umc2149	1	798,4	58,1°C	5	168 - 230	0,484
umc1108	2	358,6	60,8°C	2	145 - 180	0,279
cko1	3	97	53,2°C	4	124 - 147	0,503
umc1135	3	466,4	53,2°C	2	125 - 144	0,310
umc2152	3	616,9	60,8°C	5	170 - 210	0,569
umc1969	4	242,1	60,8°C	6	80 - 137	0,733
umc1031	4	276,3	60,8°C	4	114 - 149	0,398
bip2	4	669,1	60,8°C	6	116 - 170	0,762
gln4	5	469,2	58,1°C	6	253 - 285	0,697
umc1250	6	228,6	53,2°C	5	170 - 206	0,643
umc2170	6	392,9	60,8°C	4	145 - 196	0,627
umc1412	7	478,6	60,8°C	3	162 - 210	0,452
umc1268	8	452	53,2°C	4	104 - 165	0,369
umc1078	9	306,5	68,1°C	6	118 - 192	0,662
umc1714	9	514,1	60,8°C	6	126 - 185	0,392
umc1739	10	177,4	63,5°C	8	114 - 163	0,599
tip5	10	335,1	53,2°C	5	148 - 210	0,704
umc2126	10	452,1	68,1°C	5	155 - 204	0,640

bip2, ao passo que o menor valor (0,27) foi observado para o *locus* umc1108, com valor médio de 0,55 (Tabela 6). Esse valor médio de PIC indica alto nível de polimorfismo dos *loci* analisados, embora alguns trabalhos relatem baixo a médio nível de polimorfismo para marcadores SSR-EST's (Zang et al., 2014). Esse baixo polimorfismo tem sido atribuído à seleção contra as variações em regiões conservadas dos marcadores SSR-EST's (Scott et al., 2000).

Não há relatos anteriores encontrados sobre o uso de marcadores SSR-EST para a análise das relações genéticas na cultura do milho, no entanto, o valor

médio de PIC determinado em nosso estudo foi maior do que alguns resultados relatados na literatura baseados em marcadores SSR genômicos, como relatado por Wende et al. (2013), 0,54, e Heckenberger et al. (2002), 0,58, e Garcia et al. (2004) com o valor de 0,89. No entanto, é importante notar que as estimativas de PIC são inerentes aos *loci* analisados, bem como a estrutura da população em estudo.

Na busca pela quantificação da diversidade genética dentro de populações, muitas medidas descritivas vêm sendo utilizadas, possibilitando inferir sobre a estrutura da população, entre elas o número de alelos, Índice de Shannon e heterozigosidade observada. Ao analisar a frequência de alelos das populações CIMMYT e Piranão individualmente, observou-se número de alelos variando de 1 a 6, enquanto que na população Piranão a variação foi de 2 a 8, com médias de 3,65 e 4,35, respectivamente (Tabela 7). Este é o primeiro relato de aplicação de marcadores SSR funcionais no melhoramento dessas duas populações, no qual foi possível verificar maior riqueza alélica da população Piranão, em que podemos observar maior riqueza alélica da população Piranão, o que indica também maior diversidade genética entre os indivíduos desta população. Xia et al. (2004) trabalhando com análise de marcadores SSR genômico em linhagens endogâmicas de milho CIMMYT obtiveram uma média de 7,4 alelos por *locus*, com variação de 2 a 18. No entanto, é importante salientar que, diferente do último trabalho citado, no presente trabalho foi utilizado microssatélites funcionais (SSR-EST), onde já é esperado encontrar um menor nível de polimorfismo por se tratar de regiões mais conservadas ao longo do genoma.

A diversidade genética foi analisada neste estudo através do índice de Shannon (I), no qual foram encontrados valores de 0,89 para população CIMMYT e 1,04 para a população Piranão (Tabela 7), ratificando o que já havia sido verificado através do número médio de alelos por *locus*. O Índice de Shannon, também chamado de Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, é uma medida de diversidade amplamente utilizada em estudos de populações (Amaral et al., 2013), a qual permite inferir sobre a riqueza ou diversidade genotípica dentro de populações. De acordo com este índice, quando mais próximo da unidade maior será a diversidade. Observando os valores obtidos no presente trabalho para as duas populações sob melhoramento (CIMMYT – 0,89 e Piranão – 1,04) pode-se inferir que existe variabilidade genética suficiente para a continuidade deste

programa de melhoramento, com possibilidade real de ganhos genéticos com a seleção nos próximos ciclos de seleção recorrente recíproca

Tabela 7 - Parâmetros de diversidade genética das populações CIMMYT e Piranão com base nos 20 *loci* SSR-EST analisados.

Parâmetros	CIMMYT	Piranão	Média Geral
Na	3,65 (1 – 6)	4,35 (2 – 8)	4,00
Ne	2,26 (1,00 – 3,87)	2,64 (1,10 – 5,10)	2,45
He	0,49 (0,00 – 0,74)	0,55 (0,10 – 0,80)	0,52
H_o	0,26 (0,00 – 0,73)	0,34 (0,00 – 0,69)	0,30
I	0,89 (0,00 – 1,52)	1,04 (0,20 – 1,69)	0,97
F	0,47 (-0,36 – 1,00)	0,36 (-0,34 – 1,00)	0,41

A heterozigosidade esperada (H_e) em populações variou de 0 a 0,80, com uma média de 0,52, enquanto que a heterozigosidade observada (H_o) nas populações variou de 0 a 0,73, com média de 0,30 (Tabela 7). Entre as populações o maior valor médio de H_o foi encontrado na população Piranão (0,34), enquanto a população CIMMYT apresentou valor médio de 0,26. Zhang et al. (2014) caracterizar os marcadores SSR genéticos e genômicas em cevada e encontraram valores de heterozigosidade variando de 0,08-0,69 e 0,39-0,78, respectivamente. Na análise da diversidade genética entre acessos de melancia utilizando SSR-EST's, Mujaju et al. (2013), encontraram uma heterozigosidade média de 0,12, que foi menor do que a encontrada por marcadores SSR genômicos. Apesar de raros, há relatos na literatura de maior H_o em marcadores SSR-EST relação aos marcadores SSR genômicos, por exemplo, no estudo desenvolvido por Liu et al. (2010). Estes pesquisadores descobriram valores maiores de H_o em *locus* de SSR-EST de 0,069 em relação marcadores genômicos, que apresentaram valor de 0,014. Independentemente da localização

dos SRR genômicos, Liu e Wu (1998) destacam que apesar dos parâmetros serem importantes, nem a diversidade nem a heterozigosidade são um bom indicador para a previsão da heterose.

A análise do coeficiente de endogamia (f) entre os indivíduos das diferentes populações mostrou valores variando entre -0,36 e 1,00 em CIMMYT; -0,34 e 1,00 em Piranão, com valores médios de 0,47 e 0,36, respectivamente. Este parâmetro é um dos mais importantes na genética de populações, pois ele mede o balanço entre homozigotos e heterozigotos, sendo que os valores médios obtidos estão relacionados com a riqueza alélica observada nas populações. Como pode ser visto o valor baixo de heterozigosidade da população CIMMYT é um reflexo da maior fixação de alelos, indicado pelo coeficiente de endogamia.

Em programas de melhoramento que visam ao desenvolvimento de linhagens, a análise do coeficiente de endogamia, ou índice de fixação, permite inferir sobre o nível de homozigose dos indivíduos, acelerando o processo de obtenção de linhagens. No entanto, em programas de melhoramento tais como a seleção recorrente, o aumento da endogamia pode gerar consequências negativas uma vez que nesta situação a endogamia pode atuar revelando alelos deletérios recessivos, bem como reduzindo a heterozigosidade que pode resultar em perda de diversidade alélica.

A distância genética entre os 40 genótipos superiores de cada população foi analisada pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de distância genética obtida (Figura 1). Através da análise do dendrograma é possível verificar uma clara distinção entre as populações, com a formação de dois grandes grupos com distância média de 0,42. O grupo I é constituído exclusivamente por genótipos da população Piranão, enquanto o grupo II inclui apenas genótipos da população CIMMYT. Este resultado é bastante animador pois, demonstra que ao longo dos ciclos de SRR, principalmente aqueles monitorados pelos marcadores moleculares, está havendo um distanciamento genético entre as populações sob melhoramento, o que pode contribuir para a maximização da heterose em futuros ciclos. Esse fato fica mais evidente ao analisar os resultados encontrados por Tardin et al. (2007) e Berilli et al. (2011), onde os autores encontraram vários “contaminantes” nos grupos formados, ou seja, haviam famílias Piranão agrupando com as famílias CIMMYT e vice-versa.

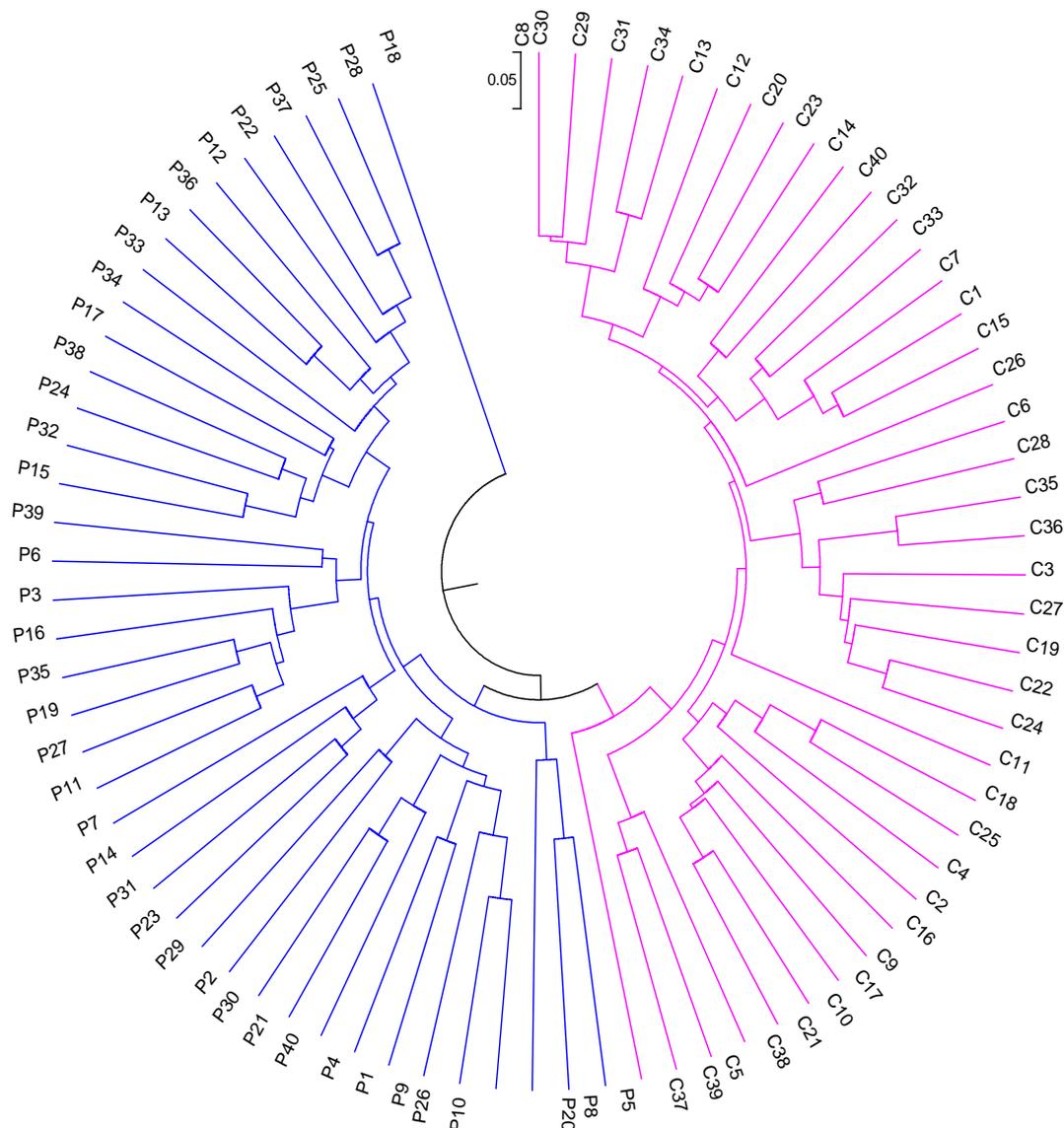


Figura 1 - Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA das 80 famílias S₁. Em azul estão os 40 genótipos pertencentes à população Piranão e em rosa os 40 genótipos da população CIMMYT.

A representação gráfica da divergência genética permite verificar a existência de significativa variabilidade entre e dentro das populações. A quantificação dessa variabilidade foi obtida através da análise de variância molecular (AMOVA), onde observou-se que do total da variância genética, 27% foi detectada entre as populações e 73% dentro das populações (Tabela 8), demonstrando que apesar de se trabalhar com populações distintas, foi observada maior variabilidade nos indivíduos dentro dos grupos quando se comparam os grupos separadamente. Os resultados apresentados por Berilli et al. (2011) ao analisar o décimo ciclo de SRR mostram que 89,84% da variância

genética total estava dentro das populações CIMMYT e Piranão, e apenas 10,16% entre as populações antes da etapa de seleção, tendo esse último valor aumentado para 14,27% após a seleção dos genótipos mais divergentes. Cunha et al. (2012) avaliando o ciclo onze de SRR encontraram uma porcentagem de variância genética de 88,77% dentro e 11,23% entre as populações CIMMYT e Piranão antes da seleção, e de 82,33% dentro e 17,67% entre após a seleção. Com base nesses resultados, pode-se observar que um dos principais objetivos de um programa de seleção recorrente vem sendo alcançado, ou seja, a variabilidade genética dentro das populações tem sido mantida a níveis satisfatórios, ao passo que a variabilidade entre tem aumentado ao longo dos ciclos de seleção, contribuindo para a longevidade desse programa de melhoramento.

Tabela 8 - Análise de variância molecular das populações CIMMYT e Piranão antes e após a seleção com base na genotipagem molecular.

Antes da seleção					
Fonte de variação	GL	QM	Componentes de variância	Porcentagem	Probabilidade
Entre as populações	1	13,7938	0,3234	27,3353	<0,001
Dentro de populações	78	0,8596	0,8596	72,6647	<0,001
Total	79	1,0233	1,11829	100	
Após a seleção					
Fonte de variação	GL	QM	Componentes de variância	Porcentagem	Probabilidade
Entre as populações	1	11,3889	0,4249	35,6898	<0,001
Dentro de populações	48	0,7657	0,7657	64,3102	<0,001
Total	49	0,9825	1,1906	100	

GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio.

Um dos fatores que pode ter contribuído para essa clara distinção entre as duas populações é a existência de alelos privados ou exclusivos, ou seja, aqueles que estão presentes em apenas uma população. Entre os alelos identificados, 24 (25,80%) foram exclusivos, sendo os mesmos detectados em 13 dos 20 *loci* analisados (Tabela 8). O *locus* que apresentou maior número de alelos privados foi o umc1739 com 4 alelos. Entre as populações, a Piranão apresentou 19 alelos exclusivos (79,17%) e a população CIMMYT apresentou 5 alelos (20,83%), demonstrando que parte da riqueza alélica da população Piranão advém da presença de alelos exclusivos na população. Alelos exclusivos podem ser úteis na

identificação de cultivares, e foram encontrados também no trabalho de Liu et al. (2003) ao analisarem via marcadores SSR linhagens endogâmicas de milho de importância para o melhoramento em regiões temperada, tropical e subtropical. Ao trabalhar com populações de milho tropical em programa de SRR, Pinto et al. (2003b) também encontraram alelos exclusivos nas populações em estudo, sendo grande parte encontrado na população BR-106.

Tabela 9 - Alelos privados e suas respectivas frequências nas populações CIMMYT e PIRANÃO para os 20 *loci* SSR-EST's analisados.

<i>Locus</i>	Alelo Privado	Populações	
		CIMMYT*	PIRANÃO*
umc1948	5	-	0,014
umc1917	5	-	0,028
umc2149	3	-	0,694
umc1108	4	-	0,222
cko1	3	-	0,122
umc1135	4	-	0,068
umc2152	5	-	0,189
umc1969	1	0,083	-
umc1969	4	-	0,041
umc1031	6	0,013	-
bip2	4	-	0,235
gln4	5	-	0,176
umc1250	3	-	0,125
umc2170	4	-	0,041
umc1412	1	0,238	-
umc1412	6	-	0,051
umc1268	1	0,026	-
umc1268	5	-	0,051
umc1078	4	-	0,077
umc1714	6	-	0,038
umc1739	7	-	0,013
tip5	8	-	0,026
umc2126	5	0,225	-
umc1948	5	-	0,153

*Frequência do alelo privado considerando 40 indivíduos de cada população.

Para a obtenção das 50 famílias superiores para o próximo ciclo de seleção, foram eliminados 15 dos 40 genótipos de cada população considerados superiores na etapa de índice de seleção, de forma a ampliar a variabilidade intrapopulacional e a distância genética interpopulacional. Para facilitar esta etapa

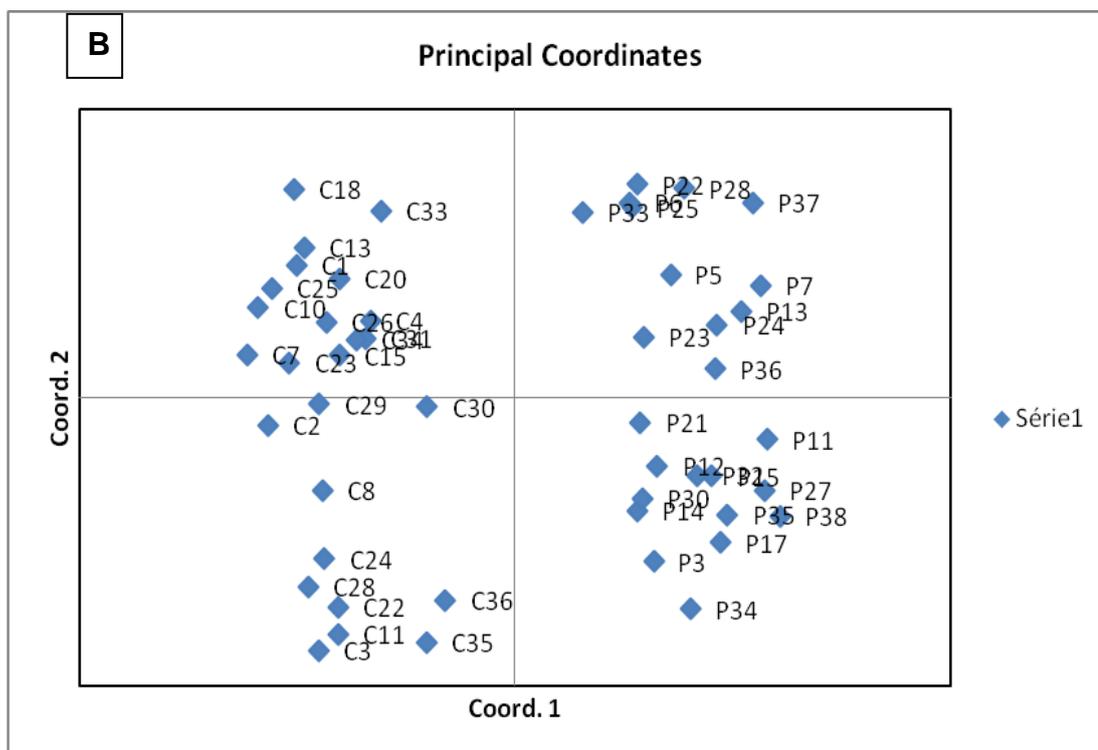
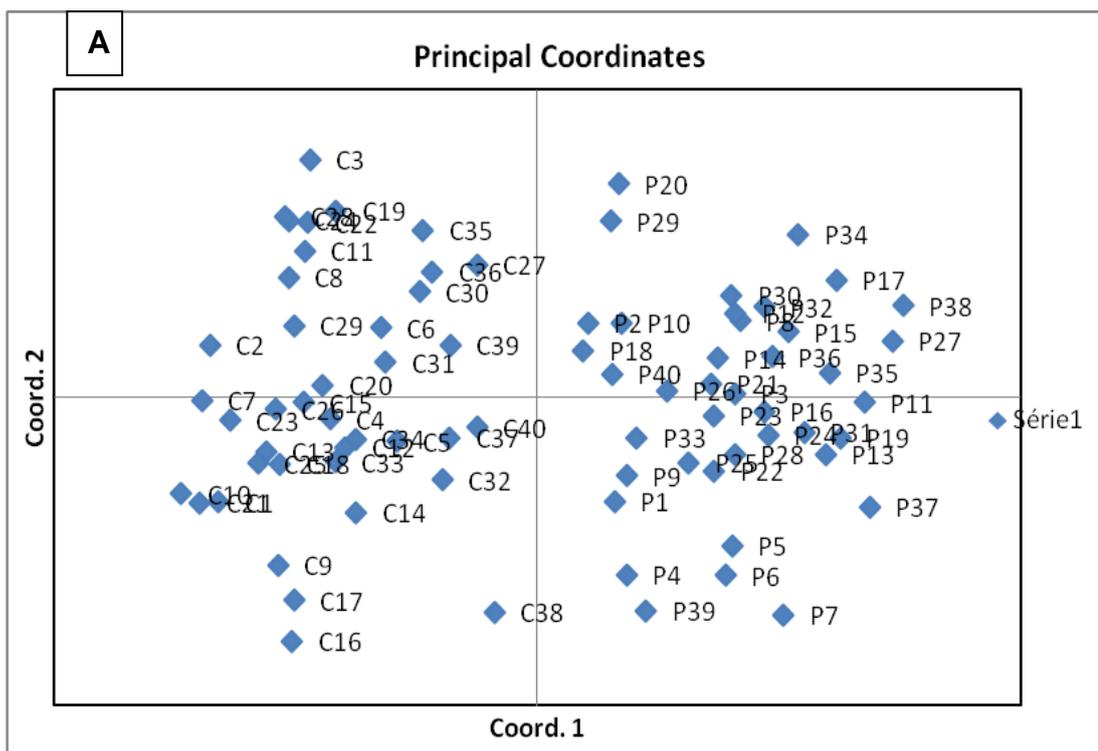


Figura 2 - Dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais considerando as populações antes da seleção (A) e após a seleção (B) via marcadores moleculares SSR.

de eliminação de genótipos menos divergentes foi realizada a análise dos componentes principais, com a dispersão gráfica da diversidade genética (Figura 2A). Para tanto, adotaram-se os seguintes critérios, a saber: eliminação dos genótipos próximos à outra população; e a eliminação de genótipos geneticamente próximos dentro da população, mantendo-se aqueles divergentes cujas médias de produção de grãos foram superiores. Após a seleção dos genótipos foi possível observar um aumento na variação entre as populações e alocação das famílias de acordo com os seus respectivos grupos heteróticos, o que é esperado uma vez que um dos objetivos do programa é o aumento da variabilidade genética dentro e principalmente entre populações (Figura 2B). A partir dos resultados teóricos e experimentais, Melchinger (1999) demonstrou que a organização do germoplasma em grupos heteróticos geneticamente divergentes é a chave para uma exploração ideal da heterose.

Considerando que a heterose depende diretamente da distância genética entre as populações (Hallauer e Miranda Filho, 1988), conclui-se que pela efetividade dos marcadores espera-se potencializar a heterose nos futuros híbridos, quer sejam interpopulacionais ou inter linhagens derivadas das populações resultantes. Isso porque a diversidade funcional detectada por marcadores SSR-EST pode estar mais associada ao vigor híbrido do que os marcadores que acessam regiões randômicas do genoma, fazendo com que a distância genética se traduza em maior heterose nos híbridos interpopulacionais resultantes.

Existem hoje vários estudos na literatura utilizando marcadores genômicos em que buscam verificar a correlação entre heterose em híbridos simples em função da distância genética entre os pais, mas, na maioria dos casos os resultados não são positivos. Trabalhando com milho, foi avaliada a produtividade de híbridos simples, no qual se estimou a capacidade de combinação específica através de cruzamentos dialélicos, a heterose e também a distância genética entre as linhagens utilizando marcadores genômicos SSR e AFLP. Os resultados obtidos demonstraram que não houve correlação entre a heterose e a distância genética por SSR e AFLP, indicando que não é possível inferir sobre o desempenho dos híbridos de milho a partir da divergência genética entre as linhagens (Guimarães et al., 1999; Paterniani et al., 2008).

Os resultados mencionados acima demonstram que a divergência não está sempre associada a heterose, a menos que esta distância seja funcional, isto é, que o *locus* do marcador está associado com a expressão de genes responsáveis pela característica de interesse. Existem hoje na literatura, diversos trabalhos utilizando marcadores genômicos nos quais se busca apurar a correlação entre a heterose em híbridos simples em função da distância genética entre os respectivos genitores. De acordo com Mohammadi et al. (2008), o uso de marcadores não ligados a características no estimador da distância genética pode ser uma possível razão para a baixa magnitude ou baixa correlação entre distância genética e heterose. Bernardo (1992) sugere a utilização de marcadores intimamente ligados ao segmento do cromossomo que determina a expressão da característica de uma forma a resolver este problema. Tal fato nos mostra a importância de se utilizar marcadores que estejam associados a características fenotípicas de interesse agrônomo, ou seja, marcadores que pertençam a uma classe funcional e que contribuirá para uma cobertura mais efetiva e direcionada do genoma, aumentando a consistência nos resultados relativos à similaridade ou divergência funcional intra e interpopulacionais, como o presente trabalho.

Como pode ser visto, estas análises permitiram a eficiente formação do lote de recombinação para a composição da população para o 14^o ciclo de seleção recorrente recíproca. Os resultados também demonstram a eficiência do método para melhorar tanto as populações bem como para a formação de híbridos superiores interpopulacionais. Outro fato relevante que merece salientar é que a genotipagem molecular das linhagens permite também, facilitar a obtenção das linhagens endogâmicas. As linhagens superiores, mais divergentes e com elevados coeficientes de endogamia são as candidatas ideais para avanço de geração na busca das linhagens potenciais candidatas à genitoras de híbridos.

Os marcadores SSR gênicos foram efetivos em agrupar os genótipos em suas respectivas populações. Foram também, eficazes em identificar ampla variabilidade tanto intra quanto interpopulacionais. Espera-se que tal variabilidade e distância genética estejam mais diretamente associadas à heterose dos futuros híbridos, haja vista a natureza da região genômica amostrada. Finalmente, possibilita que linhagens superiores sejam identificadas e possam ser conduzidas à endogamia em menor espaço de tempo para a obtenção de híbridos superiores.

Tendo em vista o sucesso dos resultados positivos obtidos no presente trabalho, buscar-se-á identificar a natureza genômica dos *loci* aqui analisados, dado a potencialidade apresentada pelos mesmos para distinção das populações e quantificação da variabilidade genética a nível funcional. O conhecimento da funcionalidade desses *loci* nos ajudará a compreender a natureza da variabilidade detectada, além de permitir o monitoramento das características relacionadas aos marcadores, análise da diversidade genética e caracterização de cultivares.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, pretendeu-se aprimorar o programa de melhoramento de milho comum da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). O mesmo tem gerado bons resultados com destaque para o lançamento e recomendação para a região Norte/Noroeste Fluminense de três cultivares de milho híbrido, 'UENF 506-6', 'UENF 506-8' e UENF506-11', correspondendo a híbridos interpopulacionais resultantes do sexto, oitavo e décimo-primeiro ciclos, respectivamente. O trabalho encontra-se no 13º ciclo de seleção recorrente, com manutenção dos ganhos genéticos. Na fase atual, os objetivos são manter ou até mesmo ampliar a variabilidade genética entre e dentro das populações, de forma a potencializar ainda mais, a heterose resultante do cruzamento interpopulacional e entre linhagens derivadas das populações em etapas futuras.

Os cruzamentos foram realizados com os progenitores em ambas as populações e resultou na obtenção de 210 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 (210 famílias), as mesmas foram agrupadas em sets, sendo que cada set continha 35 famílias e cinco testemunhas, totalizando seis "sets", com duas repetições. 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 SSR-EST 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 realizadas foram suficientes para descartar os acessos que possuíam características desfavoráveis para a continuação do programa, antes da etapa de recombinação. No total, 50 indivíduos superiores, deram origem às populações no 14º ciclo.

As análises estatísticas demonstraram que o programa vigente apresenta variabilidade entre e dentro das populações, além de possibilitar a identificação e, 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) As populações CIMMYT e Piranão apresentaram variabilidade intra e interpopulacional, mostrando-se suficiente para a permanência deste programa;
- b) 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;
- c) O gráfico de dispersão dos 50 genótipos selecionados revelou a existência de variabilidade genética e o distanciamento em ambas as populações;
- d) Os resultados obtidos indicam que as populações em estudo. possuem ampla diversidade genética, sendo tal diversidade correspondente ao genoma funcional, dando indicativos de que a presente estratégia poderá contribuir para expressivos ganhos genéticos, especialmente associados à produtividade de grãos dos futuros híbridos.
- e) Os marcadores SSR-EST foram efetivos em agrupar os genótipos em seus respectivos grupos heteróticos. Os indivíduos selecionados permitirão não somente dar sequência aos ciclos seguintes, como também, incrementar a heterose nos procedimentos de hibridação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual: Anuário Brasileiro do milho (2013) São Paulo: FNP consultoria e comércio LTDA, 10-96p.
- 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):1233-1244.
- Allard, R.W. (1971) Princípios do melhoramento genético em plantas. São Paulo: Ed. Blucher, 381p.
- Amaral L.P.; Ferreira R.A.; Lisboa G.S.; Longhi S. J.; Watzlawick L.F. (2013) Variabilidade espacial do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener em Floresta Ombrófila Mista. *Scientia Forestalis*, 41: 083-093.
- 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.

- Baker, R. J. (1986) Index Selection in plant breeding. *CRC Press, Boca Raton-Florida*, 218p.
- 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.
- Bered, F.; Barbosa Neto, J. F.; Carvalho, F. I. F. (1997) Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*, 27: 513-520.
- Berilli, A.P.C.G.; Pereira, M.G.; Gonçalves, L.S.A.; Cunha, K.S. da; Ramos, H.C.C.; Filho, G.A.S.; Amaral Júnior, A.T. do. (2011) Use of molecular markers in reciprocal recurrent selection of maize increases heterosis effects. *Genet. Mol. Res.* 10 (4): 2589-2596.
- Berilli, A.P.C.G.; Pereira, M.G.; Trindade, R.S.; Costa, F.R.; Cunha, K.S. (2013) Response to the selection in the 11th cycle of reciprocal recurrent selection among full-sib families of maize. *Acta Scientiarum*, 35: 435-441.
- Bernardo, R. (1992) Relationship between single-cross performance and molecular markers heterozygosity. *Theoretical and Applied Genetic*, 83: 628–634.
- Bertan, I.; Carvalho, F. I. F.; Oliveira, A. C.; Benin, G.; Vieira, E. A.; Valério, I. P. (2009) Morphological, pedigree and molecular distance and their association with hybrid wheat performance. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 155-163.
- Borém, A.; Caixeta, E.T. (2009) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG, v.2, 374p.

- Borém, A.; Miranda, G.V. (2009) *Melhoramento de plantas*. 5 ed. Viçosa, MG: UFV, 525p.
- 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.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314–331.
- Cardle, L.; Ramsay, L.; Milbourne, D.; Macaulay, M.; Marshall, D.; Waugh, R. (2000) Computation and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156:847-854.
- 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 famílias de meio-irmãos na variedade de milho BR 5028 São Francisco. *Agrotrópica*, 15(2):113-120.
- Cho, Y.C.; Ishii, T.; Temnykh, S.; Chen, X.; Lipovich, L.; McCouch, S.R.; Park, W.D.; Ayres, N.; Cartinhour, S. (2000) Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100:713-722.
- Cockerham, C.C. (1956) Effects of linkage on the covariances between relatives. *Genetics*, Bethesda, 41:138-141.
- Coimbra, R. R.; Miranda, G. V.; Viana, J. M. S.; Cruz, C. D.; Murakami, D. M.; Souza, L. V.; Fidelis, R. R. (2002) Estimation of genetic parameters and prediction of gains for DFT1-Ribeirão popcorn population. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2(1):33-38.

- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2013) *Acompanhamento da safra Brasileira: grãos*. Sétimo levantamento, Brasília. Em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 10 de abril de 2014.
- 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.
- Cunha, K.S. da; Pereira, M.G. ; Gonçalves, L.S.A. ; Berilli, A.P.C.G. ; De Oliveira, E.C. ; Ramos, H.C.C. ; Do Amaral Júnior, A.T. (2012) Full-sib reciprocal recurrent selection in the maize populations CIMMYT and Piranão. *Genetics and Molecular Research*, v. 11, 3398-3408.
- Crosbie, T. M.; Mock, J. J.; Smith, O. S. (1980) Comparasion of gains predicted by several methods for cold tolerance traits of two maize populations. *Crop Science*, 20(5):649-655.
- Crossa, J.; Franco, J. (2004) Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica*, 137:19-37.
- Cruz, C. D. (2006) *Programa Genes: Versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.
- Cruz, C. D. (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, Maringá 35: 271-276.
- 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.; Carneiro, P.C.S. (2006) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.2, ed.2, Viçosa, MG: Editora UFV, 144p.

- 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.
- 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.
- Eustice, M.; Yu, Q.; Lai, C. W.; Hou, S.; Thimmapuram, J.; Liu, L.; Alam, M.; Moore, P. H.; Presting, G. G.; Ming, R. (2008) Development and application of microsatellite markers for genomic analysis of papaya. *Tree Genetics and Genomes*, 4: 333-341.
- Eujayl I.; Sorrells, M.E.; Baum, M.; Wolters, P.; Powell, W. (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the a and b genomes of wheat. *Theor Appl Genet* 104(2–3):399–407.
- Falconer, D.S.; Mackay, T. F. (1996) Introduction to quantitative genetics. 4 ed. Londres: Longman Group, 464p.
- Fancelli, A.L. (1994) Tecnologia da produção do milho para alta produtividade. Piracicaba: ESALQ/USP, 222p.
- Fancelli, A.L.; Dourado Neto, D. (2000) *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- FAO (2013) Statistical database. Rome. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e04.htm>. Acesso em: 15 mar. 2014.

- 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.
- Fontes, P. S. F. (2002) *Adubação nitrogenada e avaliação de cultivares de banana (Musa spp.) no Noroeste do Estado do Rio de Janeiro*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 64p.
- Freitas, F.O. (2001) *Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (Zea mays, L.) e feijão (Phaseolus vulgaris, L.)*.
- 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*, 27:644-55.
- 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, A.A.F.; Benchimol, L.L.; Barbosa, A.M.M.; Geraldi, I.O.; Souza Jr, C.L.; Souza, A.P. (2004) Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 4: 579-588.
- 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):7008-7015.
- Gevers, H.O. (1974) Reciprocal recurrent selection in maize under two systems of parent selection. *Proc. Of fifth Genetic Congress Republic South Africa*.
- 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.
- Guimarães, C.T., Moreira, M.A. (1999) Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. (Ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV, 715-740p.
- Guimarães, P. S. (2007) Desempenho de híbridos simples de Milho (*Zea mays* L.) E correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais cultivares e população de plantas na produção de milho-verde. 132f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.
- 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*, 11-13p.
- Hallauer, A.R. (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 3:01-33.
- Hallauer, A. R. (1992) Recurrent selection in maize. In: JANICK, J. (Ed.). *Plant breeding reviews*. New York: Wile, v. 9, 115-179p.
- Hallauer, A.R., Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Science*, 10:315-16.
- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. (1987) *Quantitative Genetics in Mayze Breeding*, 286p.

- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. (1988) *Quantitative genetics in maize breeding*. Ames. Iowa State University Press. 2 ed, 468p.
- Hazel, L.N. (1943) The genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics*, Austin, 28:476-490.
- Heckenberger M, Bohn M, Ziegler JS, Joe LK, Hauser JD, Hutton M and Melchinger AE (2002) Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties. I. Genetic and technical sources of variation in SSR data. *Molecular Breeding*, 10: 181–191.
- Huang, R.; Birch, C. J.; George, D. L. (2006) Water use efficiency in maize production – the challenge and improvement strategies. In: Humpreys, E... [et al] (Eds.). *Water to gold: Maize Association of Australia 6th Triennial Conference: proceedings*. 21-23 fev., Regional Theatre, Griffith NSW, Maize Association of Australia, Darlington Point, NSW.
- Hull, F. H. (1945) Recurrent selection and specific combining ability in corn. *Journal Am. Agron., Madison*, 37:134-145.
- Koeyer, D.L.; Phillips, R.L.; Stuthman, D.D. (2001) Allelic shifts and quantitative trait *loci* in a recurrent selection population of oat. *Crop Science* 41:1228-1234.
- Labate, J.A.; Lamkey, K.R.; Lee, M.; Woodman, W.L. (1997) Molecular genetic diversity after reciprocal recurrent selection in BSSS and BSCB1 maize populations. *Crop Science* 37:416-423.
- Liu, X.C.; Wu, J.L. (1998) SSR heterogenic patterns of parents for marking and predicting heterosis in rice breeding. *Mol. Breed.* 4: 263-268. Menkir A, Goldsbrough P., Ejeta G (1997). RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. *Crop Sci.* 37: 564-569.

- Liu, K.; Major, G.; Spencer, M. J.; Stephen, S.; Ed, B.; John, D. (2003) Genetic Structure and Diversity Among Maize Inbred Lines as Inferred From DNA Microsatellites. *Genetics*. 165: 2117–2128.
- Liu, K.; Muse, S.V. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128–2129.
- Liu, Y-l.; Li, Y-h.; Zhou, G.; Uzokwe, N.; Chang, R.; Chen, S.; Qiu, L. (2010) Development of Soybean EST-SSR markers and their use to assess genetic diversity in the subgenus Soja. *Agricultural Sciences in China*, 9: 1423-1429.
- Máric, S.; Bolaric, S.; Martincic, J.; Pejic, I.; Kozumplik, V. (2004) Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. *Plant Breeding*, 123: 366-369.
- Mangesdorf, P.C. (1974) *Corn its origin, evolution and improvement*. 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.
- Melchinger, A.E. (1999) Genetic diversity and heterosis. In J.G. Coors and S. Pandey (ed.) *The genetics and exploitation of heterosis in crops*. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. 99–118p.
- Milach, S.C.K. (1998) *Marcadores Moleculares em plantas*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 17-28p.
- 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.
- Mohammadi, S.A.; Prasanna, B.M.; Sudan, C.; Singh, N.N. (2008) SSR heterogenic patterns of maize parental lines and prediction of hybrid performance. *Biotechnology and Biotechnology*, 22: 541-547.
- Mujaju, C.; Sehic, J.; Nybom, H. (2013) Assessment of EST-SSR Markers for Evaluating Genetic Diversity in Watermelon Accessions from Zimbabwe. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 1448-1456.
- 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.
- Oliveira, E. J.; Silva, A. S.; Carvalho, A. M.; Santos, L. F.; Costa, J. L.; Amorim, V. B. O.; Dantas, J. L. L. (2010) Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. *Euphytica*, 173: 279-287.
- Paes, M. C. D. (2008) Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. In: CRUZ, J. C. [et al.] (Ed). A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Cap. 2, 48-61p.
- Paterniani, M.E.A.G.Z. (2001) Use of heterosis in maize breeding: history, methods and perspectives – a review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 1(2):159-178.
- 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.; Miranda Filho, J. B. (1978) Melhoramento de populações. In: Paterniani, E. (Ed.) *Melhoramento e produção de milho no Brasil*. Piracicaba, Esalq, 202-246p.
- 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, 429-485p.
- 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.
- Paterniani, M.E.A.G.Z.; Guimarães, P.deS.; Lurdes, R.R.; Gallo, P.B.; Souza, A.P.de; Laborda, P.R.; Oliveira, K.M. (2008) Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. *Bragantia, Campinas*. v. 67, n. 3, 639-648p.
- Peakall, R.; Smouse, P. (2009) *GenAlEx Tutorials – Part 1: Introduction to Population Genetic Analysis*. Australian National University, Australia.
- Pereira, J.R. (1985). *Seleção de irmãos completos, visando a qualidade da semente e outros caracteres agrônômicos 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.

- Pinto, L.R.; Vieira, M.L.C.; Souza, C.L.; Souza, A.P. (2003a). Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite *loci*. *Genetic and Molecular Biology*. 26: 355-364.
- Pinto, L.R.; Vieira, M.L.C.; Souza, Jr.C.L.; Silva, R.M. (2003) Isoenzymatic variability in tropical maize populations under reciprocal recurrent selection. *Scientia Agricola*. 60: 291-297.
- Rajendran A, Muthiah A, Joel J, Shanmugasundaram P and Raju D (2014) Heterotic grouping and patterning of quality protein maize inbreds based on genetic and molecular marker studies. *Turkish Journal of Biology*, 38: 10-20.
- Ramos, H.C.C.; Pereira, M. G.; Silva, F. F.; Gonçalves, L.S.A.; Pinto, F. O.; de Souza Filho, G. A.; Pereira, T.S.N. (2011) Genetic characterization of papaya plants (*Carica papaya* L.) derived from the first generation of backcross. *Genetic and Molecular Research*. 10: 393-403.
- Rangel, R. M.; Amaral Júnior, A. T.; Viana, A. P.; Freitas Júnior, S. P.; Pereira, M. G. (2007) Prediction of popcorn hybrid and composites means. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7(3):287-295.
- Reif, J. C.; Melchinger, A. E; Frisch, M. (2005) Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science*, 45:1-7.
- Ribeiro, A.C.; Athayde, K.R.; Castro, R.A.R. (2009). Novo ciclo da agroindústria canavieira brasileira: perspectivas de inserção do estado do Rio de Janeiro. *Revista Inovare*, 8ª edição, p: 111-126. Disponível em http://www.cescage.edu.br/new/main.php?module=edit_edicoes.
- Ronzelli Junior, (1996) *Melhoramento Genético de Plantas*. Curitiba, 219p.
- Rudd, S. (2003) Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences. *Trends Plant Science*, v.8, n.7, 321-329p.

- Saha, S.; Karaca, M.; Jenkins, J. N.; Zipf, A. E.; Reddy, O. U.; Kantenty, R. V. (2002) Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica*, v.130, 355-364p.
- Santacruz-Varela, A.; Widrechner, M.P.; Ziegler, K.E.; Alvador, R.J.; Millard, M.J.; Bretting, P.K. (2004) Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science*, 44:456-1467.
- 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):597-602.
- Santos, F. S.; Amaral Júnior, A. T.; Freitas Júnior, S. P.; Rangel, M. R.; Pereira, M. G. (2007) Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho-pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. In: *Bragantia*, Campinas, 66(3):389-396.
- 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.
- Scott, K.D.; Eggler, P.; Seaton, G.; Rossetto, M.; Ablett, E.M.; et al. (2000) Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetic*, 100:723–726.
- Senior, M.L.; Chin, E.C.L.; Lee, M.; Smith, J.S.C.; Stuber, C.W. (1996) Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. *Crop Science* 36:1676-1683.
- Sharopova, N.; McMullen, M.D.; Schultz, L.; Schroeder, S.; Sanchez-Villeda, H.; Gardiner, J.; Bergstrom, D.; Houchins, K.; Melia-Hancock, S.; Musket, T.; Duru, N.; Polacco, M.; Edwards, K.; Ruff, T.; Register, J.C.; Brouwer, C.;

Thompson, R.; Velasco, R.; Chin, E.; Lee, M.; Woodman-Clikeman, W.; Long M.J.; Liscum, E.; Cone, K.; Davis, G.; Coe, E.H. Jr. (2002) *Plant Molecular Biology*.48:463-81.

SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática (2006) <http://www.sidra.ibge.gov.br>. (acessado em março de 2013).

Silva, M.C. (2006) Avaliação de descritores morfológicos e seleção de diferentes tipos de famílias de *Pennisetum* sp. Tese (Doutorado em Zootecnia). Recife: UFRPE, 78p.

Smith, H. F. (1936) A discriminant function for planta selection. *Ann. Eugen*, 7:240-250.

Smulders, M.J.M.; Bredemeijer, G.; Rus-Kortekaas, W.; Arens, P.; Wosman, B. (1997) Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions oh other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Appllied Genetics* 94:264-272.

Souza Jr., C. L. (1999) Recurrent selection and heterosis. In: Coors, J.G. e S. Pandey (ed.) *Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*. Madison: American Society of Agronomy, 524p.

Souza Sobrinho, F. de; Ramalho, M. A. P.; Souza, J. C. de. (2002) Alternatives for obtaining double cross maize hybrids. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, 70-76p.

Tardin, F.D.; Pereira, M.G.; Gabriel, A.P.C.; Amaral Júnior, A.T.; Souza Filho, G.A. (2007) Selection índex and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. *Crop Breeding and Applied Biotchnology*, 7:225-233.

Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23:48-55.

- Vencovsky, R. (1969) Genética quantitativa. In: Kerr, W. E. (Org.). Melhoramento e genética. São Paulo: Melhoramento, 17-38p.
- Vieira, M. A. (2007) Cultivares e população de plantas na produção de milho-verde. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 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.
- Xia, X. C. J. C., Reif, D. A., Hoisington, A. E., Melchinger, M., Frisch, and Warburton, M. L. (2004) Genetic Diversity among CIMMYT Maize Inbred Lines Investigated with SSR Markers: I. Lowland Tropical Maize. *Crop Science*. 44:2230–2237.
- Zhang, M.; Mao, W.; Zhang, G.; Wu, F. (2014) Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley. *PLoS ONE* 9(4): e94881. doi:10.1371/journal.pone.0094881.
- Wang, Z.; Weber, J. L.; Zhong, G.; Tanksley, S. D. (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 88:1–6.
- Weatherwax, P. (1954) Indian corn in old America. New York, USA: The MacMillan Co, 253p.
- Wende, A.; Shimelis, H., Derera, J.; Mosisa, W.; Danson, J.; Laing, M.D. (2013) Genetic interrelationships among medium to late maturing tropical maize inbred lines using selected SSR markers. *Euphytica*, 191:269–277.
- Willians, J.S. (1962) The evaluation of a selection index. *Biometrics*, North Carolina, 18:375-393.

Yu, K.; Park, S.J.; Poysa, V. (1999) Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome* 42:27-34.

APÊNDICE

Apêndice A: Ranqueamento das médias dos 25 genótipos superiores e testemunhas avaliadas em ensaio de competição em Campos e Itaocara, RJ.

Genótipo	Média (Kg/ha)	Genótipo	Média (Kg/ha)
182	8200	184	7150
166	7550	111	6950
150	7500	127	6900
155	7450	16	6900
118	7400	171	6900
72	7400	14	6850
74	7400	183	6850
52	7400	44	6850
147	7300	135	6850
131	7300	148	6850
17	7300	T4 (C12 X P12)	6214
167	7250	T3 (C11 X P11)	6114
43	7250	T2 (C10 X P10)	5421
78	7250	T1 (C8 X P8)	5343
91	7200	T5 (BR 106)	5017
Média dos 25 genótipos superiores: 7208 kg/ha			
Media das Testemunhas: 5622 Kg/ha			