

**GANHOS GENÉTICOS POR SELEÇÃO RECORRENTE E
ESTREITAMENTO GENÉTICO NA POPULAÇÃO UENF-14 DE
MILHO-PIPOCA POR MARCADORES SSR-ESTs**

AMANDA GONÇALVES GUIMARÃES

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
OUTUBRO - 2016**

**GANHOS GENÉTICOS POR SELEÇÃO RECORRENTE E
ESTREITAMENTO GENÉTICO NA POPULAÇÃO UENF-14 DE
MILHO-PIPOCA POR MARCADORES SSR-ESTs**

AMANDA GONÇALVES GUIMARÃES

“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. Antônio Teixeira do Amaral Júnior

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
OUTUBRO – 2016

GANHOS GENÉTICOS POR SELEÇÃO RECORRENTE E
ESTREITAMENTO GENÉTICO NA POPULAÇÃO UENF-14 DE
MILHO-PIPOCA POR MARCADORES SSR-ESTs

AMANDA GONÇALVES GUIMARÃES

“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 26 de outubro 2016

Comissão Examinadora:

Prof^a. Monique Moreira Moulin (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas)
IFES/Campus Alegre

Dr. Janeo Eustáquio de Almeida Filho (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UENF

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UENF
Orientador

À minha mãe Cecília (*in memoriam*), meu pai Márcio e minha irmã Cíntia,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por toda força, sabedoria e coragem para a realização deste sonho;

A todos os meus familiares, em especial ao meu pai Márcio, minha mãe Cecília (pela força em pensamento) e minha irmã Cíntia, pelo incentivo e compreensão pelas vezes que eu estive ausente nos momentos que mais precisavam;

À UENF, pela oportunidade e infraestrutura concedida para meu crescimento pessoal e profissional;

Ao Professor Antônio Teixeira do Amaral Júnior, pela orientação e ensinamentos transmitidos, proporcionando meu crescimento profissional;

Aos Professores Messias Gonzaga Pereira, Helaine Chistine Cancela Ramos, Alexandre Pio Viana e Marcelo Vivas, pelo conhecimento transmitido e ajuda na condução do trabalho;

Aos Professores do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UENF, por partilharem o conhecimento e pela contribuição na minha formação acadêmica;

Ao secretário do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, José Daniel, pela eficiência e prontidão em nos ajudar;

A Capes, pela concessão da bolsa de Doutorado e por tornar possível a realização desse sonho;

Aos meus amigos de Paraopeba, Ana Flávia e Marílis, pela amizade eterna;

A todos os meus colegas e companheiros da Equipe Milho-Pipoca, Milho-Comum e orientados do Prof. Alexandre Pio Viana, pela ajuda na condução dos experimentos de campo, pois, sem vocês, não teria conseguido, principalmente na “Colheita Feliz” em Itaocara (“só os fortes entenderão”);

Às “pipoqueiras”, Ju e Gabi, pela cumplicidade e troca de apoio durante a caminhada do doutorado;

Às amigas do “só elas no estudo”, que foram fundamentais nas horas de descontração durante esses anos;

Às minhas amigas que foram fundamentais na Qualificação: Erina, Jocarla e Ellen, pela persistência nos estudos, amizade e horas de descontração.

Aos funcionários da Pesagro-Rio de Itaocara, pela ajuda prestada nesses anos;

Aos funcionários de campo do Colégio Agrícola Antônio Sarlo em Campos dos Goytacazes, em especial ao técnico agrícola Geraldo Francisco de Carvalho, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço também ao Dr. Leandro Espanhol pelo empenho em coordenar os experimentos na Estação Experimental de Itaocara;

Às técnicas do LMGV Marcela Boechat e Vitória, e aos pós-doutorandos (as) Fernanda Santana, Eillen, Guilherme, Fernando Higino e Janeo Eustáquio, pelo auxílio com as análises moleculares e estatísticas;

Aos bolsistas Luzimara, Valdinei, Marta, Larisse, Jaqueline e Márcia por sempre nos ajudar na parte de campo e nas avaliações do galpão;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para que eu conseguisse chegar até aqui.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. CAPÍTULOS.....	4
3.1 GANHOS GENÉTICOS E AVANÇOS SELETIVOS NA POPULAÇÃO UENF- 14 DE MILHO-PIPOCA	4
3.1.1 INTRODUÇÃO	4
3.1.2 REVISÃO	6
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1.5 CONCLUSÕES.....	29
3.2 ESTRUTURA POPULACIONAL E IMPACTO DA SELEÇÃO RECORRENTE EM MILHO-PIPOCA POR MARCADORES SSR-ESTs	30
3.2.1 INTRODUÇÃO	30
3.2.2 REVISÃO	32
3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.2.5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

GUIMARÃES, Amanda Gonçalves; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro, 2016. Ganhos genéticos por seleção recorrente e estreitamento genético na população UENF-14 de milho-pipoca por marcadores SSR-ESTs. Orientador: Antônio Teixeira do Amaral Júnior. Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Helaine Chistine Cancela Ramos.

O milho-pipoca é bastante consumido em todo mundo e vem crescendo a preocupação das instituições públicas do Brasil em disponibilizar para os produtores rurais cultivares mais produtivas e com boa capacidade de expansão. O programa de seleção recorrente com milho-pipoca da UENF se encontra no 8º ciclo, já tendo sido lançada a cultivar UENF-14 para as regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, após o sexto ciclo de seleção recorrente. Com a preocupação da manutenção dos ganhos nos sucessivos ciclos sem exaustão da variabilidade genética, objetivou-se aferir os ganhos preditos para o Ciclo C-8 em comparação com os demais ciclos do programa de seleção recorrente com milho-pipoca da UENF, bem como utilizar os marcadores microssatélites gênicos (SSR-ESTs) para estimar a divergência genética entre os ciclos. Para tanto, foram obtidas 200 famílias de irmãos-completos, após a recombinação das famílias selecionadas no Ciclo C-7. Na avaliação das famílias, adotou-se o delineamento de blocos casualizados com arranjos em *sets* dentro de três repetições, no total de oito *sets*, sendo que cada *set* conteve 25 famílias e seis testemunhas (C4, C5, C6, C7 de UENF-14, BRS Angela e IAC 125), em dois ambientes distintos: em

Campos dos Goytacazes e em Itaocara, localizados nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, respectivamente, na safra do ano agrícola de 2013/2014. Na seleção das 30 famílias superiores para a composição do Ciclo C-8 foi utilizado o índice de seleção Mulamba e Mock, que proporcionou ganhos genéticos de 4,60 e 3,61 %, respectivamente, para produtividade de grãos e capacidade de expansão houve incremento de 111,99 kg ha⁻¹ e de 1,75 mL g⁻¹, por ciclo nessa mesma ordem. A evolução dos ciclos revelou haver ganho genético acumulado para os principais caracteres de importância econômica da cultura, possibilitando a antevisão de sucesso na continuidade da seleção recorrente. Para a análise da diversidade genética, o DNA genômico foi extraído de folhas jovens de 25 indivíduos de cada ciclo (C0, C1 C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8), totalizando 225 amostras da população UENF-14. Foram utilizados 50 marcadores SSR-ESTs, dos quais, 16 revelaram-se polimórficos. Foram detectados 34 alelos com média de 2,13 alelos por loco. Ao longo dos ciclos, houve redução na heterozigosidade observada, esperada e do Índice de Shannon, nas magnitudes de 61,90, 18,37 e 0,15 %, respectivamente; e aumento de 1,76 % da endogamia. Embora constante, houve maior compartilhamento dos alelos com menor variabilidade nos ciclos finais, o que garante a oportunidade de ganhos genéticos nos próximos ciclos seletivos.

ABSTRACT

GUIMARÃES, Amanda Gonçalves; D.Sc.; Darcy Ribeiro North Fluminense State University. October, 2016. Genetic gains by recurrent selection and genetic narrowing in UENF-14 population of popcorn by ESTs-SSR markers. Adviser: Antônio Teixeira do Amaral Júnior. Committee Members: Alexandre Pio Viana e Helaine Chistine Cancela Ramos.

The popcorn is widely consumed worldwide and has been increasing concern in public institutions in Brazil in order to make available to farmers cultivars more productive and popping expansion. The program of recurrent selection with popcorn in the UENF is in the eighth cycle, has already provided the cultivar UENF-14 for the north and northwest regions of Rio de Janeiro State after sixth recurrent selection cycles. In the interests of maintaining the gains in successive cycles without exhaustion of genetic variability, aimed to assess the predicted gains of cycle C-8 compared to other cycles of recurrent selection program with popcorn of UENF and use gene microsatellite markers (ESTs-SSR) to estimate the genetic divergence between cycles. For that, were obtained 200 full-sib families, after recombination progenies selected in Cycle C-7. In the assessment of families, adopted the randomized block design with arrangements in sets in three repetitions, the total of eight sets, with each set contained 25 families and six witnesses (C4, C5, C6, C7 UENF-14 BRS Angela and IAC 125), in two different environments: in Campos dos Goytacazes and Itaocara, located in the North and Northwest of the State of Rio de Janeiro, respectively, in the harvest of the

agricultural year 2013/2014. In the selection of the 30 families higher for the Cycle C-8 was used selection index Mulamba and Mock, that providing gains of 4.60 and 3.61%, respectively, to grain yield and popping expansion and there was increase of 111.99 kg ha⁻¹ and 1.75 mL g⁻¹ per cycle in that order. The evolution of cycles revealed a cumulative genetic gain for the main characteristics of economic importance, enabling the successful preview in the continuity of recurrent selection. For the analysis of genetic diversity the genomic DNA was extracted from young leaves of 25 individuals from each cycle (C0, C1 C2, C3, C4, C5, C6, C7, and C8), totaling 225 samples from population UENF-14. Fifty ESTs-SSR markers were used, 16 of which revealed to be polymorphic. Thirty-four alleles were detected, with an average of 2.13 alleles per locus. Throughout the cycles, there was a reduction in observed and expected heterozygosity and in the Shannon Index of 61.90, 18.37, and 0.15%; and a 1.76% increase in inbreeding. Though constant, there was more sharing of alleles with lower variability in the final cycles, which also ensures genetic gains in the next selective cycles.

1. INTRODUÇÃO

O milho-pipoca vem despertando o interesse de melhoristas de instituições públicas do Brasil, visando à redução da importação de sementes de outros países (Ribeiro et al., 2016). Neste intento, a utilização da seleção recorrente torna-se vantajosa, por permitir a obtenção de sucessivos ganhos (Hallauer et al., 2010; Ramalho et al., 2012), oportunizando a geração de genótipos superiores a cada ciclo seletivo de forma que possa ser lançada uma variedade com melhores características agronômicas de interesse do que a registrada anteriormente. A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) possui um programa de Seleção Recorrente Intrapopulacional (Pereira e Amaral Júnior, 2001), como alternativa para incrementar o agronegócio das regiões Norte e Noroeste Fluminense, o que tornou possível o registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) da variedade de milho-pipoca UENF-14, após o sexto ciclo de seleção recorrente (Amaral Júnior et al., 2013).

É consabido que o êxito da seleção recorrente depende, necessariamente, da variabilidade genética da população envolvida. Isso porque, com o passar dos ciclos seletivos, são esperadas modificações nas estimativas de parâmetros populacionais dos caracteres sob seleção, tais como, médias e variâncias genéticas (Fehr, 1987). Portanto, é necessário monitorar a variação das estimativas desses parâmetros, uma vez que a redução da variabilidade

genética pode frear a eficiência da seleção e comprometer os ganhos do programa de melhoramento (Choudhary et al., 2012).

Para quantificar essa variabilidade genética, o uso dos marcadores moleculares tem sido uma alternativa vantajosa, por revelarem diferenças genéticas em nível de maior detalhamento e sem as interferências causadas pelo efeito ambiental (Arif et al., 2010; Leal et al., 2010; Zhang et al., 2014). Dentre os vários marcadores moleculares, os microssatélites (SSR- *Simple Sequence Repeats*) vêm sendo amplamente utilizados, devido serem multialélicos, co-dominantes e por revelarem altos níveis de polimorfismo (Eustice et al., 2008; Ramos et al., 2014).

Os marcadores microssatélites baseados em sequências expressas do genoma - EST's (*Expressed Sequence Tags*) - são poderosas ferramentas para avaliação de diversidade genética, bem como de estudos evolutivos, de mapeamento e análise de características quantitativas (Ramu et al., 2013; Sun et al., 2015). Em comparação aos marcadores microssatélites genômicos, os EST's oferecem a vantagem de estarem associados às sequências codificantes do genoma (Eujayl et al., 2002), fornecendo a possibilidade de serem desenvolvidos com base em regiões transcritas, o que aumenta a probabilidade de marcar características de interesse (Yu et al., 1999). Devido a essas vantagens, os marcadores SSR-ESTs estão sendo identificados e utilizados em estudos de diversidade genética em várias espécies de plantas, exemplificando-se a cultura do milho (Tang et al., 2006; Galvão et al., 2015) e do milho-pipoca (Franzoni et al., 2012; Pena et al., 2015).

Assim, devido a importância do uso da seleção recorrente em gerar genótipos superiores de milho-pipoca, no intuito de lançar nova variedade para o produtor rural no futuro com melhores características de interesse agrônômico, e a verificação da variabilidade ao longo dos ciclos, o presente estudo teve como objetivos: i) estimar os ganhos preditos no Ciclo C-8 de Seleção Recorrente com Milho-pipoca da UENF; ii) comparar a evolução dos ganhos no decorrer dos ciclos; e iii) averiguar a ocorrência de estreitamento genético na população UENF-14 por meio de marcadores SSR-ESTs.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais: Averiguar a evolução de ganhos genéticos comparados após oito ciclos de Seleção Recorrente do Programa de Melhoramento de Milho-pipoca da UENF e investigar o impacto da Seleção Recorrente no afinamento genético da população UENF-14.

2.2 Específicos: i) estimar os ganhos seletivos a partir da avaliação de 200 famílias de irmãos-completos oriundas do Ciclo C-7 de Seleção Recorrente de Milho-pipoca da UENF, pelo emprego de índice de seleção; ii) inferir sobre a magnitude da divergência genética de todos os ciclos; e, iii) averiguar como está a estrutura da população UENF-14 entre os ciclos de seleção recorrente, com o uso de marcadores microssatélites gênicos.

3. CAPÍTULOS

3.1 GANHOS GENÉTICOS E AVANÇOS SELETIVOS NA POPULAÇÃO UENF-14 DE MILHO-PIPOCA

3.1.1 INTRODUÇÃO

O milho-pipoca é um alimento bastante apreciado no Brasil. No entanto, sua produção está aquém do potencial de demanda, comprovado pelo grande volume de grãos importados (Ribeiro et al., 2012). Neste contexto, o desenvolvimento e lançamento de cultivares de milho-pipoca são de fundamental importância para mitigar a dependência por genótipos de países estrangeiros e atender a demanda dos produtores e consumidores do país.

Em milho-pipoca, apesar da reduzida influência do ambiente na expressão da principal característica da qualidade dos grãos - capacidade de expansão (Pereira e Amaral Junior, 2001; Lu et al., 2003) - acredita-se que é controlada por vários genes (Dofing et al., 1991), assim como ocorre com a produtividade de grãos (Ziegler e Arshman, 1994; Silva et al., 2010), o que dificulta o sucesso imediato na obtenção de cultivares superiores com a aplicação de programas de melhoramento. Dentre os métodos de melhoramento, a seleção recorrente é opção extremamente oportuna, por possibilitar o aumento na

frequência dos alelos favoráveis, elevando-se as médias das características sem exaurir a variabilidade genética (Fehr, 1987; Hallauer et al., 2010; Ramalho et al., 2012).

Uma dificuldade adicional com o melhoramento da cultura do milho-pipoca é a obtenção de ganhos simultâneos para capacidade de expansão e produtividade de grãos, por se tratar de características correlacionadas negativamente (Willier & Brunson, 1927; Pacheco et al., 1998; Hallauer, 2001; Rangel et al., 2011; Cabral et al., 2016), embora Daros et al. (2004b) tenham constatado acréscimo da correlação genotípica para estas características entre os dois primeiros ciclos de seleção na população UNB-2U de milho-pipoca. De todo modo, o acréscimo constatado por Daros et al. (2004b) ocorreu de forma não-significativa e em baixa magnitude.

Para sobrepujar tal inconveniente, uma alternativa viável é a utilização de índices de seleção, que permitem obter ganhos genéticos para os caracteres de interesse em conjunto com outros que o melhorista prioriza no processo seletivo (Cruz et al., 2012). Esses índices constituem uma técnica multivariada que associa as informações relativas aos caracteres de interesse agrônômico com as propriedades genéticas da população avaliada.

Nesse aspecto, Santos et al. (2007) e Freitas et al. (2013) constataram que o índice de Mulamba e Mock (1978) proporcionou ganhos superiores em ciclos de seleção recorrente para a população de milho-pipoca UNB-2U - designada UENF-14 quando do lançamento como nova cultivar (Amaral Junior et al., 2013) - em relação à capacidade de expansão e produção na comparação com os demais índices investigados. Segundo Cruz et al. (2012) esse índice se baseia na soma de postos e consiste em classificar os genótipos em relação a cada um dos caracteres em ordem favorável de melhoramento. Uma vez classificados são somadas as ordens de cada genótipo referente a cada caráter.

Com base nessas explicações, o objetivo deste estudo foi estimar o ganho genético na população UENF-14 em oitavo ciclo de seleção recorrente intrapopulacional, sobretudo para as características de interesse comercial - produtividade de grãos e capacidade de expansão -, por meio de índice de seleção, bem como averiguar a evolução dos ganhos nos sucessivos ciclos seletivos no intento de investigar o afinilamento genético.

3.1.2 REVISÃO

3.1.2.1 Aspectos evolutivos, botânicos e importância sócioeconômica do milho-pipoca

O milho-pipoca pertence à família Poaceae, uma gramínea da subfamília Panicoide, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L., var. *everta* (Sturtev) L.H. Bailey (Galinat, 1979; Paterniani e Campos, 2005). As plantas são anuais, monóicas e alógamas ($2n=2x=20$) (Gaut et al., 2000; Tenailon et al., 2004).

A origem genética do milho-pipoca, assim como a do milho comum é objeto de hipóteses. Erwin (1949) sugeriu que o milho-pipoca tenha surgido de uma mutação do milho comum do tipo duro. Outros pesquisadores defendem que essa hipótese é pouco provável, pois o mais antigo exemplar de milho encontrado é o milho-pipoca, tendo sido constatado que em tumbas peruanas pré-históricas, havia utensílios de barro supostamente utilizados para o preparo de pipoca. Além disso, a data mais remota da descoberta do milho-pipoca foi estimada de 2.500 a.C. no México (Zinsly e Machado, 1987), ao passo que em relação ao milho comum do tipo dentado, as descrições datam 1.700 a.C., nos Estados Unidos da América (Goodman, 1980; Wang et al., 1999).

Quanto a evolução do milho existem algumas hipóteses que persistem até os dias de hoje, como é o caso sobre o parentesco entre milho (*Zea mays* ssp. *mays*), teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana*) e *Tripsacum* (Engels et al., 2006). A primeira, sugerida por Weatherwax (1954), afirma que o milho, o teosinte e o *Tripsacum* spp. originaram-se de um ancestral comum. A segunda hipótese, defendida por Mangelsdorf (1974), sugere o milho como antepassado, ou seja, o teosinte se originou do milho. A terceira hipótese, a mais aceita, é defendida por Beadle (1978) e Galinat (1974,1977), sugere que o milho teria se originado unicamente do teosinte por intermédio de intensa seleção praticada pelo homem.

Em estudo com 52 acessos da coleção de germoplasma da UENF, incluindo milho-pipoca, milho comum, milho doce, teosinte e *Tripsacum*, Oliveira et al. (2010), utilizando marcadores ISSR, verificaram que o *Tripsacum* compartilhou maior número de marcas com o milho doce e o milho-pipoca do que com os demais tipos de milho comum, favorecendo a hipótese de Poggio et al.

(2005) de que o teosinte não é o único ancestral do milho-comum e que a introgressão de genes de *Tripsacum* no milho não deve ser desconsiderada.

Quanto aos aspectos botânicos, as plantas de milho-pipoca quando comparadas ao milho comum, normalmente possuem porte menor, colmo mais fino e fraco, maior suscetibilidade a pragas e doenças, maior prolificidade, menor número de folhas e tamanho reduzido do grão, que pode ser redondo, chato ou pontudo (Zinsly e Machado, 1987). Tais plantas possuem, geralmente, um sistema radicular fasciculado e superficial, o que lhes confere pouca tolerância à seca (Goodman e Smith, 1987). A principal diferença em relação ao milho comum é a capacidade de expansão do milho-pipoca, que compreende a razão entre o volume de pipoca expandida e o volume ou peso inicial dos grãos submetidos ao pipocamento (Guadagnin, 1996).

O pipocamento é descrito como uma explosão provocada pela expansão quando os grãos são submetidos a temperaturas acima de 180 °C e sob pressão. Com isso, ocorre perda de umidade contida nos grânulos de amido e extinção de toda a estrutura celular do endosperma (Weatherwax, 1922). As sementes quando bem armazenadas, conservam sua capacidade de expansão por um período de 15 a 20 anos, porém seu poder de germinação é perdido após dois a três anos de armazenamento (Zinsly e Machado, 1987; Guadagnin, 1996). Pela do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma cultivar comercial de milho-pipoca deve apresentar um valor de capacidade de expansão no mínimo de 30 mL g⁻¹, pois, abaixo deste índice, sobram muitos grãos sem estourar (MAPA, 2016).

Informações sobre área semeada, quantidade produzida e produtores de sementes de milho-pipoca são escassas (Anuário, 2016). Durante a década de 90, para o plantio no Brasil era necessário importar as sementes dos países como Estados Unidos da América e da Argentina (Galvão et al., 2000). Entretanto, esse cenário vem se modificando com o aumento de produção no Brasil. Segundo a Unidade Estadual do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE/MT), o Estado do Mato Grosso representou 80 % da produção nacional e, juntamente com o Estado do Rio Grande do Sul, hospedou grandes empresas empacotadoras que disponibilizaram as sementes e garantiram a compra da safra no ano agrícola de 2015 (IBGE, 2015; Anuário, 2016). De acordo com o Anuário Brasileiro do Milho/2016, a produção de milho-pipoca no Estado do Mato Grosso

em 2015 ocupou 35.939 mil hectares, com produtividade média de 4.038 Kg ha⁻¹ (Anuário, 2016).

A cultura do milho-pipoca possui elevada rentabilidade e seu produto final tem grande aceitação popular. Mundialmente, vem proporcionando elevados ganhos econômicos em estabelecimentos comerciais do ramo alimentício (Sweley et al., 2013). De acordo com informações do Agrianual (2015), em 2012, o preço médio de milho-pipoca teve valorização superior do que o milho comum, atingindo preço do quilo de R\$ 1,70, em comparação a R\$ 0,75 para o milho comum. A comercialização dos grãos de milho-pipoca pode ser realizada pelo produto final que é vendida pelo volume (pipoca), em entradas de cinemas, shows, escolas; e por peso, que é feita principalmente pelas empresas empacotadoras que detêm a maioria das cultivares registradas.

Quanto ao aspecto nutricional, a pipoca possui em sua composição uma fração rica de fibras e carboidratos (ambos encontrados na casca) e o amido (na parte macia) que tem sido associado à redução de células cancerosas (Sawazaki et al., 1986; Manarini, 2012). Estudos feitos pela Universidade de Scranton, localizada nos Estados Unidos, mostraram que a pipoca contém substâncias como polifenóis, que podem agir como antioxidantes (Bertolucci, 2016). Esses agem inibindo os radicais livres no organismo, diminuindo o envelhecimento precoce e riscos de doenças cardíacas (Krishnaswami e Raghuramulu, 1998). Nesse contexto, estudos na Embrapa Milho e Sorgo afirmam que a parte macia da pipoca é fonte de carotenóides, que são substâncias que atuam como antioxidantes importantes para a manutenção da visão e a prevenção da degeneração macular, doença que aflige especialmente os idosos, e que leva à cegueira (Manarini, 2012).

3.1.2.2 Melhoramento do milho-pipoca

O melhoramento do milho-pipoca no Brasil teve seu início no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 1932 e, em 1941, foi lançada a primeira variedade nacional, a qual se originou de ciclos de seleção massal na população-base *South American Mushroom* (SAM), derivada de *South American*, proveniente dos EUA. Mas, somente 47 anos depois é que os trabalhos foram retomados no país, resultando no lançamento do híbrido simples modificado IAC-

112, em 1988, proveniente da combinação de linhagens da variedade SAM com linhagens oriundas do híbrido intervarietal (Guarani x UFV Amarelo), e também o híbrido triplo Zélia, comercializado pela Pioneer (Sawazaki et al., 2001; Scapim et al., 2002).

Nos anos seguintes foram desenvolvidos os seguintes genótipos melhorados: IAC-125, um híbrido simples derivado do IAC-112, registrado em abril de 2006; a variedade de polinização aberta BRS Angela, oriunda de seleção recorrente no composto CMS-43; a variedade RS 20, desenvolvida pela FEPAGRO; a variedade UFVM2-Barão Viçosa; o híbrido triplo Jade, disponibilizado pela Pioneer; a variedade UENF-14 e o híbrido UENF/UEM 01, lançados pela UENF em 2013 (Pacheco et al., 2000; Sawazaki, 2001; Scapim et al., 2002; Amaral Junior et al., 2013).

Existe, atualmente, 75 cultivares registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2016) até setembro de 2016, sendo que 81 % destas foram desenvolvidas por alguma dessas grandes empresas: Yoki (19), Agristar (12), Pipolino (7), Sementes Boa Esperança (4), General Mills (7), Seedco (3), DSM/CATI (1), Feltrin (1) e ATS (1); sendo que apenas duas instituições de pesquisa têm aproximadamente 19 % dos registros: IAC (12) e UENF (2). Somente a UENF-14 é uma variedade de polinização aberta, que permite ao produtor replantar as sementes em sucessivos ciclos de cultivo.

Apesar de o Brasil atingir altos níveis de produção de sementes de milho-pipoca, ainda têm sido obtidas sementes importadas e utilizadas por empresas empacotadoras que estabelecem acesso restrito de uso com os produtores e parceiros das empresas. Tal fato dificulta o uso dessas sementes por pequenos produtores, sendo necessário, assim, o desenvolvimento de novas cultivares por instituições públicas.

Nesse contexto, atualmente, instituições públicas como a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a Universidade Federal de Viçosa (UFV), a Universidade Federal de Lavras (UFLA), Universidade Estadual de Maringá (UEM), a Universidade Estadual de Londrina (UEL), o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), e a Universidade Federal do Cariri (UFCA) têm mantido programas de melhoramento de milho-pipoca, visando diminuir a dependência de genótipos importados (Ribeiro et al., 2012; Pena, 2015).

Por conseguinte, conclui-se que o lançamento de cultivares superiores mais produtivas e com alta capacidade de expansão é de inequívoca importância para o país.

3.1.2.3 Seleção recorrente

Para o lançamento de novas cultivares, a seleção recorrente é alternativa exequível, sendo um procedimento cíclico de melhoramento que envolve as etapas: obtenção da população-base, avaliação e recombinação das famílias selecionadas para formar o ciclo seguinte (Hull, 1945; Fehr, 1987). Em consequência, é esperado aumento na expressão fenotípica de caracteres de interesse, possibilitando acúmulo na frequência dos alelos favoráveis, sem exaurir a variabilidade genética na população para ganhos futuros com a seleção (Hallauer et al., 2010).

A seleção recorrente pode ser empregada no melhoramento em duas categorias, em que a escolha vincula-se à característica-objeto do programa, do tipo de ação gênica que o melhorista deseja enfatizar e da finalidade das famílias selecionadas (nova variedade ou como fonte de linhagens superiores). Se o intuito é melhorar uma população *per se*, para dar origem uma nova variedade, com enfoque na ação gênica aditiva, recomendam-se os métodos intrapopulacionais (Pereira e Amaral Júnior, 2001). Caso a seleção visa à melhoria de duas populações, com o desenvolvimento de linhagens com alta capacidade de combinação para produção de híbridos, o melhoramento interpopulacional é o mais apropriado, pois capitaliza a heterose (Hallauer et al., 2010).

Comstock et al. (1949) iniciaram o melhoramento interpopulacional, chamado também de seleção recorrente recíproca. Nesse método, duas populações são utilizadas, sendo os genótipos de uma delas avaliados em cruzamentos com a outra população e vice-versa, ou seja, um processo de melhoramento de duas populações e do híbrido entre elas. Aqueles genótipos que apresentarem melhor capacidade de combinação com a população recíproca são recombinados entre si. Existem diferentes estratégias para o cruzamento entre as populações e recombinação, exemplificando-se: utilização de famílias de irmãos-completos interpopulacionais e recombinação de famílias S_1 (Lonquist e

Williams, 1967; Hallauer e Eberhart, 1970; Rademacher et al., 1999; Butron et al., 2000; Galvão et al., 2015) e uso de famílias de meios-irmãos interpopulacionais e recombinação de famílias de S_1 (Paterniani, 1967).

Os métodos intrapopulacionais relatados com o melhoramento de milho-pipoca têm basicamente as estratégias de seleção massal e seleção de famílias. A diferença entre essas estratégias é que seleção de famílias proporciona melhores estimativas dos valores genotípicos com maior frequência de alelos favoráveis, uma vez que essas famílias são avaliadas em experimentos com repetições e em um ou mais ambientes.

A seleção massal tem a vantagem de ser um método barato e simples, e eficiente para os caracteres de alta herdabilidade, pois, nesse caso, o fenótipo é um bom indicador do genótipo (Hallauer et al., 2010). Algumas adaptações foram realizadas para aumentar o ganho com a seleção, como a estratificação do ambiente. Esse método consiste em dividir a área experimental em partes homogêneas em que a seleção é feita dentro de cada parcela. Entretanto, não é possível eliminar genótipos inferiores que foram favorecidos por ambientes favoráveis (Hallauer et al., 2010).

A seleção de famílias é avaliada em experimentos com repetições em um ou mais ambientes, e na cultura do milho-pipoca tem sido reportadas a utilização de três tipos de cruzamentos que darão origem ao tipo família que será utilizada nos processos de recombinação, a saber: meios-irmãos, irmãos-completos e endogâmicos (S_1) (Pereira e Amaral Junior, 2001). As famílias de meios-irmãos são um processo de fácil execução, não exigindo polinizações manuais, em que se explora 0,25 de variância aditiva (Hallauer et al., 2010). Já, no procedimento em que se utilizam famílias de irmãos-completos, tem-se mais trabalho no processo de obtenção das famílias, porém há maior expressão de variância aditiva do que a opção de se utilizar meios-irmãos, no caso, com exploração da magnitude de 0,5 da variância aditiva, enquanto as famílias endogâmicas são recomendáveis para caracteres de baixa herdabilidade, pois permitem explorar 1,5 de variância aditiva (Hallauer et al., 2010).

Quanto às intensidades de seleção das famílias superiores, embora percentuais tenham sido recomendados, Vilela et al. (2008) confirmaram o propalado por Hallauer et al. (2010), de que o mais importante não é um valor percentual e, sim, um valor absoluto, para evitar estreitamento genético na

população sob seleção. Segundo estes autores, o ideal é selecionar entre 30 a 40 famílias.

O progresso genético com a seleção recorrente deve ser obtido periodicamente para que o melhorista possa interferir na melhor estratégia de seleção. Então, podem-se guardar sementes dos ciclos anteriores e fazer comparação desses ciclos seletivos em experimentos com repetições para averiguar o progresso genético, uma vez que a cada recombinação, espera-se que a população atinja o equilíbrio de Hardy-Weinberg, na qual as frequências alélicas e genotípicas não se alteram e uma amostra de sementes poderá representar a população (Falconer e Mackay, 1996; Ramalho et al., 2012).

A eficiência do uso da seleção recorrente já foi relatada por Lucas et al. (2013) em trabalhos conduzidos por Hopkins pela Universidade de Illinois (USA) iniciados em 1896 na variedade de milho de polinização aberta, “Branca de Burr”, objetivando alterar o teor de óleo e proteína na semente do milho. As seleções foram conduzidas separadamente no sentido de aumentar e também reduzir a manifestação do caráter e após 114 ciclos seletivos resultou um teor de proteína alto de 32 % e baixo de 4 %, enquanto para o teor de óleo foram de 20 % e 1 %, respectivamente para o alto e o baixo teor, comparando com a população inicial que continha 11 % do teor de proteína e 5 % do teor de óleo.

3.1.2.4 Seleção recorrente na população UENF-14

O Programa de Seleção Recorrente de Milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) teve início com a população UNB-2U, que é uma variedade de polinização aberta. Antes de chegar à UENF, esta se constituiu de um composto indígena doado à Universidade de Brasília (UNB) pela ESALQ/USP, que recebeu o nome de UNB-1. Posteriormente, a UNB-1 foi trazida para a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo Professor Joachim Friedrich Wilhelm Von Bülow no ano de 1993, a qual foi cruzada com a variedade de milho-pipoca SAM (*South American Mushroom*). Esta primeira geração filial foi, então, cruzada com uma variedade de milho-pipoca resistente a *Exserohilum turcicum* (helmintosporiose). Após dois ciclos de seleção massal, foram feitos três retrocruzamentos com a variedade SAM, originando, assim, a UNB-2. Esta, após dois ciclos de seleção massal,

tornou-se a população UNB-2U (Pereira e Amaral Júnior, 2001), que vem sendo melhorada via seleção recorrente intrapopulacional para as regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro.

Com o intuito de promover estratégias de obtenção de ganhos genéticos na população UNB-2U de milho-pipoca para as principais características - produtividade de grãos e capacidade de expansão - foi utilizado o Delineamento I de Comstock e Robinson (1948), que é apropriado para o estudo da estrutura genética de uma população. Em 1997, foram obtidas famílias de irmãos-completos e de meios-irmãos de UNB-2U, no qual uma planta com o genitor masculino foi cruzada com quatro plantas genitoras feminina, resultando em um conjunto de 20 famílias de irmãos-completos, desenvolvidas a partir de cinco genitores masculinos. No ano agrícola 1997/1998, 92 famílias de irmãos-completos foram avaliadas nas Regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, tendo sido estimados os ganhos genéticos de acordo com diferentes métodos de seleção recorrente intrapopulacional, utilizando o modelo preditivo de Eberhart (1970). Com base nos resultados, os maiores ganhos genéticos com a população UNB-2U, para produtividade de grãos e capacidade de expansão, respectivamente, foram: estratégia de famílias de irmãos-completos (9,42 % e 27,09 %); famílias endogâmicas S_1 (7,93 % e 19,54 %); meios-irmãos (6,26 % e 18,45 %); seleção massal estratificada (2,33 % e 12,13 %); e seleção massal (2,23 % e 11,77 %) (Pereira e Amaral Júnior, 2001).

Então, no ciclo C1 de UNB-2U, foram obtidas 75 famílias de irmãos-completos e suas respectivas plantas foram autofecundadas. A avaliação das famílias irmãos-completos foi realizada em dois ambientes, no Estado do Rio de Janeiro, no ano agrícola 1998/1999. Para estimar os ganhos genéticos, foram selecionadas as 30 famílias superiores obtidas de acordo com Falconer (1981), resultando em ganhos de 10,39 % para capacidade de expansão e 4,69 % produtividade de grãos (Daros et al., 2002). A recombinação destas 30 famílias superiores consistiu no plantio das 60 famílias S_1 correspondentes aos progenitores autofecundados.

Daros et al. (2004a) implementaram o ciclo C2 de seleção na população UNB-2U, fazendo uso de 222 famílias endogâmicas (S_1) avaliadas nos mesmos dois ambientes na safra de 2001/2002. A seleção das 40 famílias superiores foi utilizada para estimar os ganhos preditos por meio do uso do índice Smith (1936)

e Hazel (1943), que alcançaram 26,95 % para produtividade de grãos e 17,80 % para capacidade de expansão. Para recombinação, foram utilizadas sementes remanescentes das 40 famílias endogâmicas S_1 selecionadas.

No terceiro ciclo C3 de UNB-2U, Santos et al. (2007) obtiveram 192 famílias de meios-irmãos com suas respectivas plantas autofecundadas. Para a avaliação nos dois ambientes em 2004/2005 foram utilizadas as 192 famílias de meios-irmãos nas quais selecionaram as 30 superiores, por meio do índice de Mulamba e Mock (1978), obtendo ganhos genéticos de 7,16 % para capacidade de expansão e de 10,00 % para produtividade de grãos. A recombinação destas famílias superiores foi realizada por meio das respectivas famílias S_1 armazenadas.

Do ciclo C4 até o C7, foram utilizadas 200 famílias de irmãos-completos para avaliação nos dois ambientes e a seleção das 30 melhores famílias com base no índice Mulamba e Mock (1978) para a estimação dos ganhos genéticos de produtividade de grãos e capacidade de expansão dos grãos, proporcionaram, respectivamente, os seguintes ganhos: 8,50 % e 10,55 % (Freitas Júnior et al., 2009); 8,53 e 6,01% (Rangel et al., 2011); 15,30 % e 10,97 % (Ribeiro et al., 2012) e 7,78 % e 5,11 % (Freitas et al., 2014), sendo que as sementes remanescentes de cada ciclo foram utilizadas no processo de recombinação do ciclo sucessivo.

Um sumário do processo seletivo a que foi submetida à população UNB-2U, relacionando os métodos de seleção empregados e a evolução da produtividade e capacidade de expansão dos grãos, pode ser visto na Tabela 1.

De acordo com a progressiva evolução dos resultados obtidos após quatorze anos de pesquisa com a população inicialmente denominada UNB-2U, uma nova cultivar foi registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que passou a ser designada de UENF-14, após a população recombinada de sexto ciclo de seleção recorrente (Amaral Júnior et al., 2013).

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos do avanço dos processos seletivos da população de milho pipoca UNB-2U com os diferentes métodos adotados quanto às características produtividade e capacidade de expansão dos grãos.

Ciclo ^{1/}	Safrá	Nº famílias	PG (kg ha ⁻¹)		CE (mL g ⁻¹)	
			Obtidas/Selec.	Geral	Selec.	Geral
0 SM	-	-	-	-	-	-
1 FIC	1999/2000	75/30	1080,00	1140,00	11,04	12,52
2 FS1	2001/2002	222/40	670,74	950,70	13,41	16,30
3 FMI	2004/2005	192/30	1135,58	1361,92	23,30	26,74
4 FIC	2005/2006	200/30	2393,98	2772,50	25,06	28,00
5 FIC	2007/2008	200/30	2569,70	2920,93	26,27	29,30
6 FIC	2009/2010	200/30	2453,95	2987,84	27,69	31,13
7 FIC	2011/2012	200/30	3074,78	3503,20	32,68	35,73

^{1/}SM: seleção massal; FIC: família de irmãos-completos; FS1: famílias endogâmicas; FMI: família de meios-irmãos.

3.1.2.5. Índices de seleção

No melhoramento do milho-pipoca, selecionar os genótipos superiores que contenham uma série de atributos favoráveis que atendam as necessidades tanto do produtor quanto do consumidor, não é tarefa fácil. Isso porque as duas principais características – produtividade de grãos e capacidade de expansão – possuem associação negativa dificultando a seleção direta (Willier & Brunson, 1927; Pacheco et al., 1998; Hallauer, 2001; Rangel et al., 2011).

Para a minimização deste inconveniente, tem sido recomendada a utilização de índices de seleção, que se constituem em um caráter adicional, estabelecido pela combinação linear ótima de vários caracteres detentores, ou não, de correlações (Cruz et al., 2012). Diferentes índices têm sido propostos, originando, conseqüentemente, diferentes ganhos percentuais.

O índice de Smith (1936) e Hazel (1943) é também conhecido como índice Clássico. Primeiramente, Smith (1936) propôs o uso de índice no melhoramento de plantas como critério para selecionar duas ou mais características simultaneamente correlacionadas. Hazel (1943) adaptou para o melhoramento genético animal. Segundo esses autores, são necessários o valor

econômico, as variâncias genotípica e fenotípica de cada caráter e as covariâncias fenotípica e genotípica entre cada par de caracteres.

O índice Willians (1962), denominado também de índice-base, propõe a combinação linear dos valores fenotípicos médios das características, os quais são ponderados diretamente pelos seus respectivos pesos econômicos (Cruz et al., 2012), objetivando evitar a interferência de imprecisões das estimativas de variâncias e covariâncias genotípicas e fenotípicas.

O índice de Pesek e Baker (1969), ou índice baseado em ganhos genéticos desejados de características individuais, é utilizado para substituir os pesos econômicos relativos. É necessário o uso 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, e o ganho obtido será máximo para cada característica, de acordo com a importância relativa assumida pelo melhorista na especificação do ganho desejado.

O índice de Mulamba e Mock (1978), conhecido como soma de postos (ou “ranks”), possui a vantagem de não necessitar de pesos econômicos nem da estimação de parâmetros além das médias. Consiste na soma do número de ordem que o genótipo apresenta para o caráter mencionado em ordem favorável de melhoramento. Quanto menor o valor obtido, melhor a classificação. Assim, uma vez classificados são somadas as ordens de cada genótipo referente a cada caráter (Cruz et al., 2012).

Independentemente do índice considerado, sua utilização fornece um método objetivo, capaz de determinar o mérito relativo de uma série de genótipos, fornecendo uma base para diferenciá-los. Cada uma dessas metodologias pode ser utilizada, adotando um critério ou “peso” diferente para constituição do índice. Pelas dificuldades de estabelecer pesos econômicos, Cruz et al. (2012) propuseram que os pesos econômicos poderiam ser obtidos pelos estimadores dos parâmetros genéticos dos dados experimentais, como, por exemplo, a herdabilidade, o coeficiente de variação genotípico, o índice de variação das características avaliadas, além de pesos econômicos atribuídos arbitrariamente.

Todos esses índices vêm sendo usados com êxito na seleção de genótipos superiores na cultura do milho-pipoca. Porém, o índice de Mulamba e Mock (1978) têm-se mostrado o de melhor eficiência, conforme relatos de

Vilarinho et al. (2002), Freitas Júnior et al. (2009), Rangel et al. (2011), Ribeiro et al. (2012) e Freitas et al. (2014).

3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1 Locais de instalação dos experimentos

Os experimentos foram implementados em dois ambientes: Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes, região Norte do Estado do Rio de Janeiro, localizado a 21° 45' de latitude sul e 41° 20' de longitude e a 11 m de altitude, com uma precipitação média anual de 1023 mm e evapotranspiração potencial de 1601 mm anuais, como temperatura média anual de 23° C; e na Estação Experimental da PESAGRO-RIO, em Itaocara, Rio de Janeiro, localizada na Região Noroeste Fluminense, localizada a 21° 39' de latitude sul e 42° 04' de longitude, com 60 m de altitude, temperatura média anual de 22,5° C e precipitação média anual de 1041 mm. A distância entre as localidades é de 110 km.

3.1.3.2 Obtenção das famílias

A população de estudo consistiu de 200 famílias de irmãos-completos, obtidas do ciclo C7 de UENF-14. Para a obtenção dessas famílias, semearam-se 100 linhas de sementes recombinadas do ciclo C-7 de seleção recorrente de UENF-14 no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes, RJ, em abril de 2013. O tamanho das linhas foi de 5,00 m de comprimento, com espaçamento de 0,90 m entre linhas e 0,20 m entre plantas, utilizando três sementes por cova, à profundidade de 0,05 m. A adubação no plantio foi de 350 kg ha⁻¹ de N-P-K, da formulação 04-14-08, e aos 30 dias após a emergência, realizou-se a adubação de cobertura com 60 kg ha⁻¹ de nitrogênio, na forma de sulfato de amônio. Aos 21 dias após a emergência, realizou-se o desbaste, deixando uma planta de maior vigor por cova.

O seguinte procedimento foi adotado na obtenção de tais famílias: as fileiras e as plantas de cada fileira foram enumeradas para facilitar a identificação dos cruzamentos que foram feitos aos pares. As espigas foram cobertas com sacolas de plástico antes de liberar os estigmas, para evitar contaminação. Ao mesmo tempo foram verificados os pares que estavam aptos para fazer os cruzamentos. Os pendões, então, foram cobertos, considerando-se quando estavam com 1/3 ou menos das anteras abertas, identificando o número das linhas e o número de cada planta no saco de papel 'Kraft'. Esse cuidado de cobrir os pendões se faz necessário, visto que o pólen perde sua viabilidade após oito horas (Goodman e Smith, 1987). No outro dia, foram feitos os cruzamentos, dos quais, ao final, se obtiveram 200 famílias com duas espigas representando cada família. Para cada família, foram separadas dois lotes de sementes, um para ser avaliado em ensaio de competição e outro de sementes remanescentes para a recombinação das melhores famílias.

3.1.3.3 Avaliação e seleção entre famílias em ensaios de competição

Os ensaios de competição foram conduzidos no ano agrícola 2013/2014, em dois ambientes: Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, município de Campos dos Goytacazes, RJ e na estação experimental da PESAGRO-Rio, na Ilha Barra do Pomba, em Itaocara, RJ.

O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com arranjos em *sets* dentro de repetições nos dois ambientes. Foram utilizados oito *sets* sendo que cada *set* conteve 25 famílias de irmãos-completos e seis testemunhas (C4, C5, C6, C7 de UENF-14, BRS Angela e IAC 125), com três repetições.

A parcela constituiu-se por uma linha de três metros, com 0,90 m entre linhas e 0,20 m entre covas, contendo 16 plantas por parcela, totalizando 744 parcelas por ambiente. A adubação de semeadura foi de 800 kg ha⁻¹ de fertilizante mineral na formulação 04-14-08 (N-P₂O₅-K₂O). Aos 30 e 45 dias, após a semeadura, realizaram-se adubações de cobertura, utilizando-se 300 kg ha⁻¹ do fertilizante mineral na formulação 20-00-20 (N-P₂O₅-K₂O) e 200 kg ha⁻¹ de nitrogênio, na forma de ureia. O manejo de plantas daninhas, pragas e doenças

foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura (Sawazaki, 2001).

Avaliaram-se as seguintes características nos dois ciclos de seleção: i) altura média de planta (AP), em que foram utilizadas seis plantas por parcela, medindo-as do nível do solo à inserção da folha bandeira, e expressa em m; ii) prolificidade (PRF), que referiu-se ao número de espigas por planta; iii) massa de 100 grãos (M100G), quantificada em balança analítica, utilizando-se 100 grãos, aleatoriamente, e expressa em g; iv) peso de espiga (PE), expresso pela média do peso individual da espiga, em gramas e extrapolado para kg ha^{-1} ; v) produtividade de grãos (PG), obtida por meio da produção de grãos da parcela, em kg ha^{-1} ; e, vi) capacidade de expansão (CE), aferida por meio da massa de 30 g de grãos e levada ao micro-ondas em saco *kraft*, sem óleo, por 2 minutos, com o volume da pipoca quantificado em proveta de 2.000 mL, sendo o quociente do volume pipocado dividido por 30, e expresso em mL g^{-1} .

3.1.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.1.3.4.1 Análise de variância

Antes de efetuar a análise de variância dos dados, realizou-se a correção do efeito do *set* na classificação de todo o conjunto das famílias, em função da média das testemunhas comuns a todos os *sets*. Computou-se a média das testemunhas para cada *set* (MTS) e a média geral das testemunhas (MGT); e, pela relação MGT/MTS, obteve-se o fator de correção para cada *set*. Tal método foi adotado por Ribeiro et al. (2009) na correção do efeito de *set* das análises subsequentes.

A análise de variância foi realizada por ambiente e, posteriormente verificada a homogeneidade das variâncias residuais (QMRs), por meio da relação entre o maior e o menor QMR (Pimentel Gomes e Garcia, 2002). A seguir, após a correção dos efeitos *sets*, realizaram-se as análises de variância conjunta, considerando o delineamento de blocos casualizados, com base no seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + B/A_{jk} + F_i + A_j + FA_{ij} + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} = efeito do i-ésima família no j-ésimo ambiente e no k-ésimo bloco;

μ = constante geral;

B/A_{jk} = efeito do k-ésimo bloco dentro do j-ésimo ambiente;

F_i = efeito aleatório da i-ésima família ($i= 1, 2, \dots, 200$) \sim NID ($0, \sigma_F^2$);

A_j = efeito fixo do j-ésimo ambiente ($j= 1, 2$);

FA_{ij} = efeito da interação da i-ésima família com j-ésimo ambientes; e

e_{ijk} = efeito do erro experimental associado à observação Y_{ijk} , considerando $e_{ijk} \sim$ NID ($0, \sigma^2$).

3.1.3.4.2 Estimativas dos componentes de variância e dos parâmetros

Para a estimação dos parâmetros relacionados à análise conjunta, foram utilizados os estimadores:

a) Coeficiente de variação genético:

$$CV_g(\%) = 100 \left(\frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{\bar{X}} \right) = 100 \left(\frac{\sqrt{\frac{QMF - QMR}{ar}}}{\bar{X}} \right)$$

em que:

σ_g^2 = Variância genotípica entre famílias;

\bar{X} = média;

QMF = quadrado médio de famílias;

QMR = quadrado médio do resíduo;

a = número de ambientes; e,

r = número de repetições.

b) Coeficiente de variação experimental:

$$CV_e(\%) = 100 \left(\frac{\sqrt{\sigma_e^2}}{\bar{X}} \right) = 100 \left(\frac{\sqrt{QMR}}{\bar{X}} \right)$$

em que:

σ_e^2 = variância média residual; e,

QMR = quadrado médio residual.

c) Herdabilidade com base na média de famílias

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_f^2} = \frac{QMF - QMR}{QMF}$$

em que:

σ_g^2 = variância genotípica entre famílias; e

σ_f^2 = variância fenotípica entre famílias

d) Índice de variação

$$I_v(\%) = 100 \left(\frac{CV_g}{CV_e} \right)$$

em que:

CVg = Coeficiente de Variação Genético; e

CVe = Coeficiente de Variação Experimental.

3.1.3.4.3 Estimativas das correlações entre pares de características

As seguintes expressões foram utilizadas para o cálculo dos coeficientes de correlação fenotípica (r_F) e de genotípica (r_G) entre os pares de características relacionados à análise conjunta:

$$r_F = \frac{COVF(X,Y)}{\sqrt{\sigma_{FX}^2 \cdot \sigma_{FY}^2}}$$

$$r_G = \frac{COVG(X,Y)}{\sqrt{\sigma_{GX}^2 \cdot \sigma_{GY}^2}}$$

em que:

$COV_{F(X,Y)}$ e $COV_{G(X,Y)}$ correspondem, respectivamente, às estimativas das covariâncias fenotípicas e genotípicas entre as características x e y;

σ_{FX}^2 e σ_{GX}^2 , correspondem às estimativas das variâncias fenotípica e genotípica da característica x; e

σ_{FY}^2 e σ_{GY}^2 , correspondem às variâncias fenotípica e genotípica da característica y.

3.1.3.4.4 Estimativas de ganhos genéticos e seleção das famílias superiores

A seleção das famílias superiores foi realizada por meio da predição dos ganhos por diferentes pesos econômicos pelo Índice de Mulamba e Mock (1978). Procurou-se obter famílias com incrementos nas médias da produtividade e capacidade de expansão dos grãos. Quanto à característica altura média de plantas, buscou-se manter as médias estimadas mais baixas, devido à desnecessidade de incremento na mesma, em razão dos ventos fortes que ocorrem nas regiões de cultivo, o que podem ocasionar o tombamento das plantas.

Assim, foram selecionadas 30 famílias superiores de irmãos-completos, utilizando o índice de seleção Mulamba e Mock (1978), sendo adotados os seguintes pesos econômicos: desvio padrão genético (DPg), coeficiente de variação genético (CVg), índice de variação (Iv) e a estimativa da herdabilidade (h^2) de cada variável, bem como os pesos atribuídos por tentativas (PT): 0, 1, 1, 1, 5, 10 para AP, PRF, M100G, PE, PG, CE respectivamente. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio computacional do *software* GENES (Cruz, 2013).

3.3.4.5 Evolução dos ciclos seletivos

As médias das testemunhas da população UENF-14 e as médias previstas para o oitavo ciclo, dos valores médios nos dois ambientes, foram estimadas por meio da equação de regressão linear simples em que as variáveis produtividade e capacidade de expansão foram consideradas como dependentes, e os ciclos, como variável independente.

3.3.4.6 Recombinação das famílias selecionadas

As sementes remanescentes das 30 famílias de irmãos-completos selecionadas foram utilizadas para a recombinação e formação da população do Ciclo C-8 de Seleção Recorrente. O plantio aconteceu em setembro de 2014, na Escola Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes - RJ. A disposição das 60 linhas (duas espigas para cada família selecionada) ocorreu

em fileiras de 6,00 m de comprimento, espaçadas 1,00 m uma da outra, com 15 plantas distanciadas em 0,40 m entre si. Todos os tratamentos culturais foram realizados conforme a necessidade da cultura (Sawazaki, 2001).

O procedimento da recombinação foi o seguinte: as espigas foram previamente cobertas, antes de liberarem os estigmas, utilizando sacolas de plástico. Depois de observado que as espigas estavam aptas para o cruzamento, foi feita a preparação dos pendões, que consistiu-se em cobrir os mesmos que se encontravam em fase inicial de liberação de grãos de pólen com sacola 'kraft', considerando-se essa fase quando os pendões estavam com 1/3 ou menos das anteras abertas. No dia seguinte, foram colhidos os grãos de pólen de todos os pendões preparados anteriormente, que foram misturados, e formaram, assim, uma única amostra. Essa amostra foi utilizada para polinizar todas as espigas receptivas, excetuando-se aquelas cujas plantas forneceram os grãos de pólen.

Em cada fileira foram polinizadas no mínimo oito espigas, de modo que, no total, foram obtidas 180 espigas recombinadas, as quais foram debulhadas e as sementes misturadas, formando a população do Ciclo C-8 de seleção recorrente de UENF-14.

3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1.1 Análise de variância e estimativas dos parâmetros

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a fonte de variação Famílias, em todos os caracteres avaliados (Tabela 2), denotando existir suficiente variabilidade genética entre as famílias para obtenção de ganhos nos próximos ciclos de seleção.

Para a fonte de variação Ambiente, não houve efeito significativo ($p > 0,05$) apenas para capacidade de expansão, que embora seja um caráter poligênico (Ashman, 1983; Zeigler, 2001) não teve forte influência ambiental na sua expressão. Já, para os demais caracteres, os ambientes foram suficientemente distintos, corroborando com aqueles resultados obtidos por Ribeiro et al. (2012) e Freitas et al. (2014), que ratificaram a representatividade dos municípios de

Campos dos Goytacazes e Itaocara para a avaliação de famílias em seleção recorrente.

A não ocorrência de efeito significativo ($p > 0,05$) para a interação Famílias x Ambientes para a maioria dos caracteres avaliados (Tabela 2), com destaque para a capacidade de expansão, permite inferir que os ambientes não influenciaram de forma significativa o desempenho das famílias, conseqüentemente, para fins de seleção, pode-se considerar apenas um ambiente. Esta informação torna-se pertinente, pois a seleção praticada em um único ambiente permite a redução de custos para a condução do processo de seleção recorrente. Os resultados obtidos no presente estudo, são consentâneos com as pesquisas realizadas por Santos et al. (2008) e Freitas et al. (2014); entretanto, Freitas Júnior et al. (2009), Rangel et al. (2011) e Ribeiro et al. (2012) relataram ocorrência de interação significativa para capacidade de expansão na interação Famílias x Ambientes.

Tabela 2. Análise de variância e parâmetros de seis caracteres avaliados em dois ambientes, na população UENF-14 de milho-pipoca no oitavo ciclo de seleção recorrente, 2013/2014.

FV	GL	QM ^{1/}					
		AP	PRF	M100G	PE	PG	CE
Bloco/Ambiente	4	0,8	0,41	23,07	5595628,7	4031093	607,84
Família (F)	199	0,07**	0,16*	10,41*	947532,7**	618255,6**	37,97**
Ambiente (A)	1	72,7**	40,6**	5188**	1189805683**	824625915**	2562 ^{ns}
F x A	199	0,03 ^{ns}	0,08 ^{ns}	5,90 ^{ns}	630521,5*	443785,5*	20,61 ^{ns}
Resíduo	796	0,03	0,08	5,64	504655,6	328803,9	21,05
Média		1,65	1,27	11,64	3297,62	3095,95	33,20
Parâmetros ^{2/}							
CVg	-	5,02	9,33	7,65	8,23	7,09	5,05
CV _e	-	9,60	21,87	20,40	21,54	18,52	13,81
I _v	-	0,52	0,42	0,37	0,38	0,38	0,35
h ²	-	62,16	52,18	45,78	46,74	46,81	44,54

^{1/} AP = altura média de plantas (m); PRF = prolificidade; M100G = massa de 100 grãos (g); PE = peso de espigas (kg ha⁻¹); PG = produtividade de grãos (kg ha⁻¹); e CE = capacidade de expansão (mL g⁻¹).

^{2/} CVg = coeficiente de variação genético; CV_e = coeficiente de variação experimental; I_v = índice de variação; e h² = herdabilidade com base na média de famílias.

^{ns}, **, * = não significativo, significativo em $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente pelo teste F.

O conhecimento das estimativas dos parâmetros permite ao melhorista orientar a melhor estratégia de seleção no melhoramento de plantas (Cruz et al., 2012). Na Tabela 2, os valores de coeficiente de variação experimental (CVe) variaram de 9,60 a 21,87 %, sendo que os caracteres AP, PG e CE expressaram valores abaixo de 20 %, cujas magnitudes são consideradas como de boa precisão (Pimentel Gomes, 2000). No trabalho de Faria et al. (2008), em avaliação da eficiência da seleção recorrente recíproca em híbridos de milho-pipoca, os autores estimaram CVes superiores aos do presente estudo, tanto para PG (20,90 %), quanto para CE (16 %). Embora baixos, os valores de CVe foram superiores aos do CVg, consequenciando em estimativas de I_v abaixo de 1,0. As estimativas de herdabilidade foram de magnitude média para todos os caracteres, variando de 44,54 % para capacidade de expansão a 62,16 % para altura de plantas. Estimativas de herdabilidades (h^2) com magnitudes próximas têm sido relatadas por Faria et al. (2008), cujos valores foram de 50,37 % para produtividade de grãos e 60,48 % para capacidade de expansão. Considerando-se as magnitudes medianas das herdabilidades, conclui-se que a seleção recorrente é, de fato, a alternativa mais adequada para se obter ganhos superiores, em comparação com métodos mais simples de seleção.

3.1.4.1.2 Estimativas das correlações entre pares de características

Houve significância a 1% de probabilidade para as estimativas dos coeficientes de correlação fenotípica em todas as variáveis analisadas com o peso de espiga a produtividade de grãos (Tabela 3).

Observa-se ainda que, de forma geral, as correlações genotípicas foram superiores as fenotípicas, evidenciando que a associação linear entre esses pares de características é mais influenciada pelos componentes genéticos do que os ambientais (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas de correlações fenotípicas (r_F) e genotípicas (r_G) entre os seis caracteres agrônômicos avaliados nas 200 famílias de irmãos-completos no oitavo ciclo de seleção recorrente na população UENF-14, safra 2013/3014.

		PRF	M100G	PE	PG	CE
AP	r_F	0,06 ^{ns}	0,25**	0,36**	0,31**	0,14*
	r_G	-0,22 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,38 ^{ns}
PRL	r_F		-0,14 ^{ns}	0,41**	0,41**	-0,10 ^{ns}
	r_G		-0,33 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,49 ^{ns}	-0,15 ^{ns}
M100G	r_F			0,25**	0,23**	0,12 ^{ns}
	r_G			0,39 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,15 ^{ns}
PE	r_F				0,93**	0,03 ^{ns}
	r_G				0,95 ^{ns}	0,03 ^{ns}
PG	r_F					0,04 ^{ns}
	r_G					0,03 ^{ns}

AP = altura média de plantas; PRF = prolificidade; M100G = massa de 100 grãos; PE = peso de espigas; PG = produtividade de grãos; e, CE = capacidade de expansão.

^{ns, *, **} = não significativo, significativo em $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente pelo teste F.

Apesar da existência da correlação positiva entre PG e CE, ela não foi significativa e apresentou magnitude baixa (0,04) próxima de zero; e, na maioria dos casos a correlação entre essas duas características, geralmente, é nula ou negativa (Hallauer, 2001; Rangel et al., 2011; Cabral et al., 2016). Diferentemente de CE, a PG revelou elevadas estimativas de correlação positivas para com a maioria das variáveis, indicando que aumentos na altura de planta (AP), prolificidade (PRF), massa de 100 grãos (M100G) e peso de espiga (PE) podem proporcionar genótipos de milho-pipoca mais produtivos. Com a capacidade de expansão apresentando baixa correlação com todos os caracteres analisados, fundamenta a utilização do índice de seleção para que permitam obter ganhos genéticos simultâneos mesmo com características de efeitos adversos (Rangel et al., 2011; Cruz et al., 2012) para as duas principais características de interesse para o produtor e consumidor, produtividade de grãos e capacidade de expansão, respectivamente. Dessa forma, é possível separar genótipos superiores para um conjunto de caracteres, independentemente da existência ou não de correlações entre características (Amaral Júnior et al., 2010; Cruz et al., 2012).

3.1.4.1.3 Ganhos genéticos

Entre os pesos econômicos utilizados no índice de seleção Mulamba e Mock (1978) para a seleção de 30 famílias superiores (Tabela 4), observou-se que o emprego do desvio padrão genético (DPg) proporcionou os maiores ganhos percentuais para peso de espiga (9,33 %), produtividade de grãos (7,76 %) e altura média de plantas (2,03 %).

Tabela 4. Estimativas de ganhos percentuais obtidos por diferentes pesos econômicos pelo índice de seleção de Mulamba e Mock, considerando os caracteres aplicados na população UENF-14 de milho-pipoca no Ciclo C-8 de seleção recorrente, 2013/2014.

Características ^{1/}	Mulamba e Mock ^{2/} (%)				
	DPg	CVg	Iv	h ²	PT
AP	2,03	1,28	0,07	0,13	1,81
PRF	5,56	7,00	5,56	5,48	2,66
M100G	0,99	2,36	2,54	2,71	1,64
PE	9,33	8,01	4,84	4,78	5,34
PG	7,76	6,83	3,88	3,68	4,60
CE	0,44	1,30	1,46	1,93	3,61

^{1/} AP = altura média de plantas (m); PRF = prolificidade; M100G = massa de 100 grãos (g); PE = peso de espigas (kg ha⁻¹); PG = produtividade de grãos (kg ha⁻¹); e CE = capacidade de expansão (mL g⁻¹).

^{2/} DPg = desvio padrão genético; CVg = coeficiente de variação genético; Iv = índice de variação; h² = herdabilidade; e PT = pesos atribuídos por tentativas (0, 1, 1, 1, 5, 10 para AP, PRF, M100G, PE, PG, CE, respectivamente).

Todavia, o estimador DPG não deve ser selecionado devido ao ganho elevado que proporcionou para altura média de plantas, uma vez que não são desejáveis elevações nesse caractere na população, pois aumentos em AP favorecerão o tombamento, em decorrência dos fortes ventos que ocorrem nas regiões Norte e Noroeste Fluminense; ademais, o DPg proporcionou o menor ganho percentual para a capacidade de expansão, com magnitude de 0,44 %.

O uso de CVg poderia ser um bom referencial para a seleção das famílias superiores por estar relacionado absolutamente com a variância genética. Embora tenha proporcionado ganhos elevados para peso de espiga - 8,01 % -, prolificidade - 7,00 % -, e para produtividade de grãos - 6,83 % -, o CVg não foi

vantajoso para proporcionar ganhos consideráveis na capacidade de expansão, expressando a segunda menor estimativa (1,30 %), e portanto, não deve ser considerado como um parâmetro seletivo superior.

A estimativa dos pesos econômicos lv e h^2 resultaram em diminutos ganhos para a característica altura média de plantas de 0,07 % e 0,13 %, respectivamente, o que é de interesse para o Programa de Melhoramento de Milho-Pipoca da UENF, considerando-se o intento de favorecer a tolerância ao tombamento, em decorrência de fortes ventos que ocorrem no Norte e Noroeste Fluminense. Todavia, para os caracteres PE, PG e CE, os ganhos estimados foram inferiores aos proporcionados pelos valores atribuídos por tentativas - PT - quando também utilizados como pesos econômicos.

Com isso, PT proporcionou os maiores ganhos para capacidade de expansão (3,61 %), além de resultar em ganhos intermediários, porém, desejáveis, para os demais caracteres. Ao favorecer ganhos simultâneos em CE e PG, os pesos arbitrários sobrepujam a correlação negativa entre capacidade de expansão e produtividade, as principais características de importância econômica para a cultura. Considerando-se, pois, o rol de características, os pesos arbitrários foram os mais proveitosos para a seleção de 30 famílias fidedignamente superiores para recombinação, favorecendo ganhos sustentáveis para o próximo ciclo de seleção recorrente. Esse resultado soma-se de forma consonante às consequências das pesquisas desenvolvidas por Arnhold e Viana (2007), Rangel et al. (2011), Ribeiro et al. (2012) e Freitas et al. (2014).

3.1.4.1.4 Evolução dos ciclos seletivos

Ao se compararem as médias das testemunhas da população UENF-14 e as médias previstas para o ciclo C-8 de seleção recorrente intrapopulacional (Figuras 1a e 1b), observa-se um incremento de 111,99 kg ha⁻¹ e 1,75 mL g⁻¹, por ciclo, para produtividade de grãos e capacidade de expansão, respectivamente. Dessa forma comparada, nota-se que a produtividade de grãos, que foi de 2.999,24 kg ha⁻¹ para o ciclo C-4, poderá ser incrementada para 3.399,88 kg ha⁻¹ já no ciclo C-8; enquanto para a capacidade de expansão, a média obtida de 27,98 mL g⁻¹ no quarto ciclo, tende a expressar a estimativa de 35,89 mL g⁻¹, após a recombinação das famílias no ciclo C-8 de seleção recorrente.

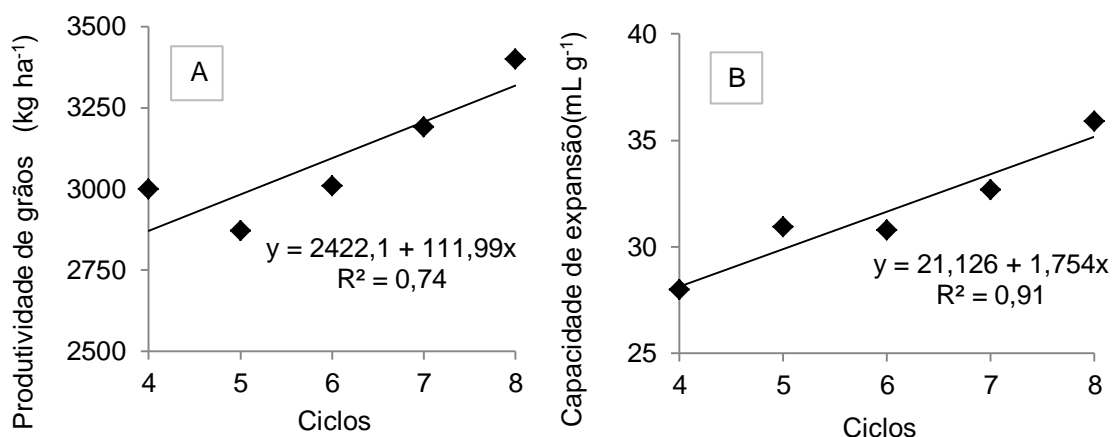


Figura 1. Médias obtidas nos ciclos C4, C5, C6, C7 e predita em C8 para as características: (a) produtividade de grãos (Kg ha⁻¹), e (b) capacidade de expansão (mL g⁻¹).

Isso demonstra a eficiência da seleção recorrente intrapopulacional em proporcionar aumentos gradativos na concentração de alelos favoráveis (Pereira e Amaral Júnior, 2001; Santos et al., 2007; Freitas Júnior et al., 2009; Hallauer et al., 2010; Rangel et al., 2011; Ramalho et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Freitas et al., 2014).

3.1.5 CONCLUSÕES

Pesos econômicos arbitrados por tentativas proporcionam ganhos genéticos mais substanciais para a produtividade de grãos (4,60 %) e capacidade de expansão (3,61 %) para o oitavo ciclo de seleção recorrente na população UENF-14.

Ganhos acumulados por ciclo para a produtividade de grãos e capacidade de expansão são possíveis com o emprego de seleção multivariada em milho-pipoca.

3.2 ESTRUTURA POPULACIONAL E IMPACTO DA SELEÇÃO RECORRENTE EM MILHO-PIPOCA POR MARCADORES SSR-ESTs

3.2.1 INTRODUÇÃO

O investimento no melhoramento do milho-pipoca no Brasil vem crescendo consideravelmente entre as instituições públicas, o que permite a redução de importação de sementes e o aumento do desenvolvimento de novas variedades adaptadas a diferentes regiões no país (Ribeiro et al., 2016). Apesar desses avanços, o número de cultivares é ainda bastante reduzido, o que remete à importância da utilização da seleção recorrente como metodologia empregada nos programas de melhoramento do milho-pipoca (Pereira e Amaral Junior, 2001; Hallauer et al., 2010). A seleção recorrente é um processo cíclico que visa à obtenção de variedades, no qual se aumenta a frequência de alelos favoráveis nas populações originais, permitindo, assim, sucessivos ganhos genéticos (Fehr 1987; Hallauer e Carena, 2009).

Pacheco et al. (2005) e Amaral Júnior et al. (2013) relataram a eficiência da seleção recorrente como metodologia empregada em programas de melhoramento de milho-pipoca que visam a recomendação de cultivares, principalmente quando se trata de variedades de polinização aberta. A variedade BRS Angela, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), foi lançada comercialmente em 2000 e é o resultado de seis ciclos de seleção recorrente intrapopulacional, a partir do composto de milho-

pipoca CMS 43. Porém, embora produtiva e com elevada qualidade da pipoca, apresenta grãos brancos, o que limita sua utilização devido à preferência do mercado por grãos amarelos (Pacheco et al., 2005). A variedade UENF-14, desenvolvida pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), foi obtida após seis ciclos de seleção recorrente intrapopulacional a partir da população de milho-pipoca UNB-2U, apresentando coloração dos grãos amarelo-laranjadas e vem sendo melhorada a cada ciclo de seleção recorrente para aumentar ainda mais a produtividade e a qualidade dos grãos, de modo a atender os produtores e consumidores das regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro (Amaral Júnior et al., 2013).

Todavia, o êxito de qualquer programa de melhoramento genético vegetal que utiliza a metodologia de seleção recorrente depende, necessariamente, da variabilidade genética da população envolvida. A variabilidade genética é utilizada para se referir à diversidade de alelos existentes nos vários locos gênicos (Cruz et al., 2011). Para compreender estas variações genéticas ao longo dos ciclos, a verificação da estimativa da proporção de heterozigotos nas populações é um fator importante para garantir o progresso das seleções de características de interesse para a cultura a ser trabalhada, já que as alterações nas frequências alélicas devido à seleção poderiam causar um viés nas estimativas, bem como, reduzir o grau de polimorfismo e a heterozigosidade esperada (Stephan e Langley, 1992). Portanto, o conhecimento da variabilidade e estrutura genética de uma população contribui para o sucesso, em longo prazo, de programas de melhoramento (Sarcevic et al., 2007; Choudhary et al., 2012).

Para estudos das alterações na estrutura genética de populações quando submetidas a vários ciclos seletivos, os marcadores moleculares têm proporcionado resultados satisfatórios (Solomon et al., 2010; Cruz et al., 2011). Dentre os vários tipos de marcadores moleculares, os microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) são os mais utilizados para determinar a estrutura genética de plantas, devido à sua natureza altamente polimórfica, por serem co-dominantes e de alta especificidade, sendo os iniciadores sintetizados a partir das regiões flangeadoras por sequências conservadas numa espécie ao longo das gerações (Pinto et al., 2003; Dandolini et al., 2008; Pena et al., 2016).

Os marcadores microssatélites podem ser gênicos (ESTs- *Expressed Sequence Tags*) ou genômicos. Os primeiros oferecem a vantagem sobre o

segundo por estarem associados às sequências codificantes do genoma (Eujayl et al., 2002), fornecendo a possibilidade de serem desenvolvidos com base em regiões transcritas, o que aumenta a probabilidade de marcar características de interesse (Yu et al., 1999).

Apesar da relevância do uso da seleção recorrente no lançamento de cultivares mais adaptadas, produtivas e com maior capacidade de expansão, o estudo do impacto da diversidade genética ao longo dos ciclos seletivos em nível de marcadores moleculares não tem sido amplamente explorado. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o impacto de nove ciclos de seleção recorrente no estreitamento da diversidade genética da população sob seleção, utilizando marcadores microssatélites gênicos (SSR-ESTs).

3.2.2 REVISÃO

3.2.2.1 Diversidade e variabilidade genética

No melhoramento de plantas, a metodologia de seleção recorrente intrapopulacional tem sido utilizada para o lançamento de novas cultivares no mercado (Fehr, 1987; Pereira e Amaral Júnior, 2001; Pacheco et al., 2005; Hallauer et al., 2010). Contudo, o êxito de qualquer programa de seleção recorrente depende, necessariamente, da variabilidade genética da população envolvida. A variabilidade genética é de essencial importância para o melhorista, pois sem ela não seria possível identificar genótipos superiores para a obtenção de progressos no melhoramento de plantas através da seleção artificial (Ramalho et al., 2012).

Para o ganho genético no futuro com o uso da seleção recorrente é necessário compreender as variações genéticas, já que as alterações nas frequências alélicas devido à seleção e à fixação aleatória dos alelos, atuante em populações finitas, poderia haver perda ou redução na variabilidade (Pereira e Vencovsky, 1988; Solomon et al., 2010).

Existem diversas formas de se quantificar a variabilidade genética, podendo ser realizada por meio de avaliações utilizando informações botânico-

agronômicas, morfológicas, bioquímicas, moleculares, dentre outras (Mohammadi e Prasanna, 2003; Sudré et al., 2007; Gonçalves et al., 2009). Entretanto, os marcadores moleculares são mais vantajosos por revelarem diferenças genéticas em nível de DNA e em maior detalhamento e sem as interferências causadas pelo efeito ambiental, proporcionando informações rápidas na discriminação da diversidade presente (Gonçalves et al., 2008; Arif et al., 2010; Leal et al., 2010; Oliveira et al., 2010).

Estudos vêm demonstrado a utilidade dos marcadores moleculares para compreender as alterações na estrutura das populações de milho comum sob seleção recorrente (Labate et al., 1999; Koeyer et al., 2001). Labate et al. (1997, 1999) usaram marcadores RFLP e encontraram alterações na frequência alélica e na diversidade genética em milho como resultado da seleção recorrente. Em milho-pipoca, Vilela et al. (2008) verificaram que não houve redução da variabilidade genética entre os três primeiros ciclos (C_0 , C_1 e C_2) de seleção recorrente intrapopulacional do programa de melhoramento da UENF, por meio de marcadores RAPD. Por sua vez, Pinto et al. (2003) e Franzoni et al. (2012) utilizando marcadores SSR para relatar efeitos da seleção recorrente interpopulacional de milho (tropical BR 105 e BR 106 com a sintéticos IG-3 e IG-4) e intrapopulacional em milho-pipoca (CMS-43) respectivamente, encontraram uma redução no número de alelos e uma mudança na frequência dos alelos ao longo dos ciclos, ocasionando um estreitamento genético das populações, porém com a diversidade genética total encontrada permitiu realizar ciclos posteriores com possíveis ganhos genéticos para as principais características.

3.2.2.2 Marcadores moleculares

Os marcadores de DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 80 (Soller e Beckmann, 1983). Agarwall et al. (2008) têm definido um marcador molecular como sendo um segmento particular de DNA que pode ser usado para comparar e representar diferenças em nível genômico. Esses marcadores podem ou não ser correlacionados com a expressão fenotípica de uma característica e ainda apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos porque fornecem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, não sendo

afetados pelos efeitos ambientais e de identificação precisa e precoce (Alzate-Marin et al., 2005).

Os marcadores moleculares podem ser baseados em hibridação, por amplificação de segmentos de DNA e por sequenciamento. Os principais podem ser exemplificados pelos RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Botstein et al., 1980), os minissatélites (VNTR- *Variable Number of Tandem Repeats*) (Jeffreys et al., 1985), os DarT (*diversity array technology*) (Kilian et al., 2005); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990), os AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995), os SCAR (*Sequence characterized amplified regions*) (Paran e Michelmore, 1993), os ISSR (*intersimple sequence repeats*) (Zietkiewicz et al., 1994), os SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Tautz, 1989) e os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Chen e Sullivan, 2003).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso em estudos filogenéticos, de sequenciamentos, de mapeamentos e de estimativas de diversidade genética (Agarwall et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Galvão et al., 2015; Franzoni et al., 2012; Pena et al., 2015). Esses tipos variados de marcadores moleculares se diferem quanto ao seu potencial para detectar diferenças entre indivíduos, o seu custo e as instalações necessárias (Schlötterer, 2004; Schulman, 2007; Bernardo, 2008).

3.2.2.3 Marcadores SSR

Os SSR (*Simple Sequence Repeat*), também conhecidos por microsatélites, constituem uma classe de marcadores moleculares baseada em PCR, e foi desenvolvida por Litt e Luty (1989) e, simultaneamente, por Weber e May (1989). Trata-se de regiões de DNA compostas por 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem* (sequência) no genoma. Nessas regiões ocorrem elevadas taxas de mutações que afetam o número de repetições o que é importante para detectar a variabilidade nos indivíduos em nível de DNA (Oliveira et al., 2006).

Esse marcador baseia-se no uso de pares de iniciadores (que são sequências de DNA que flanqueiam os SSRs) na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki et al., 1985; Mullis e Faloona, 1987) para detectar variações em locos de sequências repetitivas. A detecção do polimosfimo em um

par de iniciadores de vários indivíduos é observada na diferença de comprimento do segmento DNA produzido pela reação de amplificação (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989; Cruz et al., 2011) sendo que o produto da amplificação pode ser separado por meio de gel em eletroforese ou capilar (Kun-Sheng e Tanksley, 1993; Becker e Heun, 1995).

Marcadores SSRs possuem grande poder de resolução, alto nível de polimorfismo, alta reprodutibilidade (repetibilidade de resultados), custo relativamente baixo, são multialélicos, co-dominantes e são sítio-específicos (amplificam regiões específicas do DNA) (Borém e Caixeta, 2009). Têm aplicabilidade para separar populações segregantes, envolvidas em esquema de retrocruzamento por meio de seleção assistida por marcadores (Ribaut et al., 1997); identificação de indivíduos e para teste de paternidade (Ferreira e Gratapaglia, 1996); bem como em mapeamento genético (Yu et al., 1994).

Os marcadores SSR podem ser gênicos (EST's) ou genômicos. Os primeiros oferecem a vantagem sobre os segundos por terem influência na regulação gênica e associação física a regiões transcritas no genoma (Dutta et al., 2011), que podem estar diretamente envolvidas na variação fenotípica de uma dada característica (Varshney et al., 2005). Ainda, os marcadores SSR-EST's 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). Porém, uma restrição enfrentada pelos SSR-EST's refere-se ao seu potencial polimórfico. Dados da literatura têm mostrado que esses marcadores tendem a apresentar um menor grau de polimorfismo, quando comparados à sua contraparte genômica, devido à maior conservação de sequências de DNA localizadas em regiões transcritas (Chabane et al., 2005). Entretanto, alguns estudos têm divulgado um significativo grau de polimorfismo obtido a partir de análises com esses marcadores (Chagné et al., 2004; Fraser et al., 2004).

Os marcadores microssatélites EST's (*Expressed Sequence Tags*) vêm sendo utilizados em inúmeros projetos de sequenciamento, em que apenas os genes expressos pelo organismo são sequenciados (Pashley et al., 2006), em avaliação de diversidade genética, estudos evolutivos, mapeamento e análise de características quantitativas (Ramu et al., 2013; Sun et al., 2015). Outra vantagem dos marcadores SSR-EST's é a possibilidade de transferibilidade de uma dada

espécie para outra, ou de espécies filogeneticamente relacionadas, já que pode ser definida como a propriedade de determinados pares de iniciadores desenvolvidos em flaquearem regiões microssatélites (Kuleung et al., 2004), sendo o intercâmbio dessas informações decorrentes da conservação do conteúdo e da ordem dos genes entre as espécies (Zhu et al., 2005).

Cabe ressaltar, que no presente estudo, o uso dos marcadores SSR-EST's foi eficiente para o objetivo proposto, apesar de a literatura mencionar ser uma técnica relativamente simples e de custo relativamente baixo, percebeu-se que devido a grande quantidade das amostras utilizadas, o número termocicladores e de cubas utilizadas para analisar o gel de eletroforese, houve uma dificuldade durante o processo o que acarretou um custo considerável.

3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1 População de estudo e ganhos genéticos sob o uso da seleção recorrente em ciclos sucessivos

A população de estudo, UENF-14 é uma variedade de polinização aberta de milho-pipoca. Inicialmente, constituiu-se de um composto indígena doado à Universidade de Brasília (UNB) pela ESALQ/USP, que recebeu o nome de UNB-1. Posteriormente, a UNB-1 foi trazida para a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo Professor Joachim Friedrich Wilhelm Von Bülow no ano de 1993, a qual foi cruzada com a variedade de milho-pipoca SAM (*South American Mushroom*). Esta primeira geração filial foi então cruzada com uma variedade de milho-pipoca resistente a *Exserohilum turcicum* (helmintosporiose). Após dois ciclos de seleção massal, foram feitos três retrocruzamentos com a variedade SAM, originando, assim, a UNB-2. Esta, após dois ciclos de seleção massal, tornou-se a população UNB-2U (Pereira and Amaral Júnior 2001), que vem sendo melhorada via seleção recorrente intrapopulacional para as regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro.

Com o intuito de promover estratégias de obtenção de ganhos genéticos na população UNB-2U de milho-pipoca para as principais características -

produtividade de grãos e capacidade de expansão - foi utilizado o Delineamento I de Comstock and Robinson (1948), que é apropriado para o estudo da estrutura genética de uma população. Em 1997, foram obtidas progênes de irmãos-completos e meios-irmãos de UNB-2U, no qual uma planta como macho foi cruzada com quatro plantas fêmeas, resultando em um conjunto de 20 progênes de irmãos-completos, desenvolvidas a partir de cinco machos. No ano agrícola 1997/1998, 92 progênes de irmãos-completos foram avaliadas nas Regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro, tendo sido estimados os ganhos genéticos de acordo com diferentes métodos de seleção recorrente intrapopulacional, utilizando o modelo preditivo segundo Eberhart (1970). Com base nos resultados, os maiores ganhos genéticos com a população UNB-2U, para produtividade de grãos e capacidade de expansão, respectivamente, foram: estratégia de famílias de irmãos-completos (9,42 % e 27,09 %); famílias endogâmicas S_1 (7,93 % e 19,54 %); meios-irmãos (6,26 % e 18,45 %); seleção massal estratificada (2,33 % e 12,13 %); e seleção massal (2,23 % e 11,77 %) (Pereira e Amaral Júnior 2001).

Então, no primeiro ciclo (C1) da UNB-2U foram obtidas 75 famílias de irmãos-completos e suas respectivas plantas foram autofecundadas. A avaliação das famílias irmãos-completos foi realizada em dois ambientes, no Estado do Rio de Janeiro, no ano agrícola 1998/1999. Para estimar os ganhos genéticos selecionaram-se as 30 famílias superiores, resultando em ganhos de 10,39 % para capacidade de expansão e 4,69 % para produtividade de grãos (Daros et al. 2002). A recombinação destas 30 famílias superiores de irmãos-completos consistiu no plantio das 60 progênes S_1 correspondentes aos progenitores autofecundados.

Daros et al. (2004) implementaram o segundo ciclo (C2) de seleção recorrente na população UNB-2U, fazendo uso de 222 famílias endogâmicas (S_1) avaliadas nos mesmos dois ambientes na safra de 2001/2002. Selecionaram-se 40 famílias superiores, utilizadas para estimar os ganhos preditos, que alcançaram 26,95 % para produtividade de grãos e 17,8 % para capacidade de expansão. Para recombinação foram utilizadas sementes remanescentes das 40 famílias endogâmicas S_1 selecionadas.

No terceiro ciclo (C3) da UNB-2U, Santos et al. (2007) obtiveram 192 famílias de meios-irmãos, com suas respectivas plantas autofecundadas. Para a

avaliação nos dois ambientes em 2004/2005, foram utilizadas 192 famílias de meios-irmãos, das quais foram selecionadas as 30 superiores, obtendo ganhos genéticos de 7,16 % para capacidade de expansão e 10,00 % para produtividade de grãos. A recombinação das progênes superiores foi realizada por meio das respectivas sementes autofecundadas.

Por conseguinte, do quarto ciclo (C4) até o oitavo ciclo (C8) foram utilizadas 200 famílias de irmãos-completos para a avaliação nos dois ambientes e a seleção foi realizada com base nas 30 melhores famílias para a estimação dos ganhos genéticos para produtividade de grãos e capacidade de expansão, sendo, respectivamente: 8,50 % e 10,55 % no C4 (Freitas Júnior et al. 2009); 8,53 e 6,01 % no C5 (Rangel et al. 2011); 15,30 e 10,97 % no C6 (Ribeiro et al. 2012); 7,78 e 5,11 % no C7 (Freitas et al. 2014) e 4,60 % e 3,61 % no C8 (Guimaraes et al. 2016), sendo que as sementes remanescentes de cada ciclo foram utilizadas no processo de recombinação do ciclo respectivo.

3.2.3.2 Extração de DNA

Para a avaliação da diversidade e da estrutura genética da população UENF-14, em nível de marcadores moleculares SSR-ESTs entre nove ciclos de seleção recorrente, foram utilizadas 25 sementes de cada ciclo (C0, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8), totalizando 225 amostras, as quais foram germinadas em bandejas de isopor contendo substrato Brasplant® e mantidas em casa de vegetação.

A extração de DNA foi realizada a partir de folhas jovens das 225 amostras, utilizando o método CTAB padrão com modificações (Doyle e Doyle, 1990). Em seguida, o DNA foi quantificado por análise em gel de agarose a 1 % com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0), utilizando o marcador Lambda (λ) de 100 pb ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Invitrogen, USA) por meio de comparação das bandas. Para esse procedimento, as amostras foram coradas utilizando a mistura de Gel Red™ e Blue Juice (1:1) e a imagem capturada pelo sistema de fotodocumentação MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems). Posteriormente, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de trabalho de $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para serem usadas nas reações de amplificação (PCR).

3.2.3.3 Marcadores microssatélites e reação em cadeia da polimerase

Os marcadores microssatélites (SSR-ESTs) foram identificados com base nas sequências desenvolvidas para o milho (*Zea mays*) localizadas no banco de dados do *MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org.php>). Foram selecionados 50 iniciadores SSR-ESTs com a intenção de cobrir os dez grupos de ligação do milho-pipoca. Subsequentemente, os iniciadores foram testados para verificar quais apresentariam bandas polimórficas, através de um *bulk* de DNA composto de cinco amostras de cada ciclo totalizando 45 amostras. O *bulk* foi utilizado para testar as condições da reação em cadeia da polimerase (PCR), com os gradientes de temperatura de 59, 61 e 63 °C, a fim de definir as temperaturas ótimas de anelamento, fornecidas pelo fabricante, para cada um dos iniciadores sintetizados. Posteriormente, foi feito um *screening* com a finalidade de selecionar os iniciadores com base no grau de polimorfismo e na qualidade das ampliações.

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores da *Applied Biosystems/Veriti 96 well*, em um programa de 35 ciclos, obedecendo às seguintes temperaturas e tempo: 94 °C durante 5 minutos (desnaturação inicial); 94 °C por 1 minuto (desnaturação cíclica); temperatura específica de cada iniciador, em °C, por 1 minuto (anelamento); 72 °C por 2 minutos (extensão cíclica); 72 °C por 10 minutos (extensão final); e 4 °C *forever*. O volume final foi de 11 µL de cada amostra, sendo: 2 µL de DNA (5 ng/µL), 1,30 µL de Tampão 10X (NH₄SO₄), 1 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,5 µL de dNTP_s (2 mM), 1 µL de iniciador (R+F) (5 µM) e 0,12 µL de Taq-DNA polimerase (5 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose *MetaPhor* 4 %, imerso em tampão TAE [Tris-Acetato 90 mM (pH8,0) + EDTA 10 mM], corado com Gel RedTM e Blue Juice (1:1), visualizado pelo sistema de fotodocumentação MiniBis Pro (*Bio-Imaging Systems*) e comparado com o marcador *High DNA Mass Ladder* de 100 pb (0.5 ng.µL⁻¹) (Invitrogen, USA) durante as corridas para determinar os fragmentos amplificados.

3.2.3.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS DAS INFORMAÇÕES ORIUNDAS DOS MARCADORES MOLECULARES

3.2.3.4.1 Estimação da diversidade genética dos marcadores SSR-ESTs

A partir das variáveis moleculares estimou-se a diversidade genética entre os ciclos de seleção recorrente da população UENF-14 de milho-pipoca com o auxílio do programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2009). Para isso, foram estimados: o número de alelos por loco (NA), o coeficiente de endogamia (FIS), o déficit de heterozigotos (FIT), a proporção da diversidade gênica entre os ciclos (FST), as heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e), o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o Índice de Shannon (IS), o Índice de Fixação (F) e as frequências dos alelos. A variância genética entre ciclos em relação ao loco (V_g) e o coeficiente de determinação genotípico (H^2), que quantifica a proporção da variação total entre os ciclos atribuída ao componente genético, foram obtidas com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2013).

3.2.3.4.2 Análise da estrutura e agrupamento entre os ciclos de seleção recorrente

Com base nas informações obtidas dos iniciadores polimórficos, foi realizada a análise da variância molecular (AMOVA), para avaliar as diferenças entre e dentro dos ciclos, sendo a diferenciação "entre" determinada pelo valor de ϕ_{PT} (análogo ao FST) com o auxílio do programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2009) e representada com a figura do tipo *heatmap*, por meio do uso do *software* R (R Development Core-Team, 2011). A partir da matriz das informações moleculares dos marcadores SSR-ESTs, foram estimadas as distâncias genéticas entre pares de ciclos, constituindo-se a matriz de dissimilaridade pelo índice de Nei (Nei, 1972). A partir de então, foi construído um dendrograma, utilizando-se o procedimento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*) e, para a dispersão gráfica, utilizou-se da Análise de Coordenadas Principais (PCA), com o auxílio do programa R (R Development Core-Team, 2011). O ajuste entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC) (Sokal e Rolf, 1962). As 25 amostras de cada ciclo

da população UENF-14 de milho-pipoca foram avaliadas quanto à estruturação genética, através do método baseado em algoritmos de agrupamentos bayesianos, com o uso do *software STRUCTURE* versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para tanto, empregou-se o modelo “*no admixture model*” e frequências alélicas correlacionadas, usando-se um “*Burnin Period*” de 10.000, seguido de uma extensão (*Markov Chain Monte Carlo*) de 50.000 repetições, e o número de subpopulações (*k*) variando de 1 a 10.

3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.4.1 Polimorfismo dos Marcadores SSR-ESTs

Na análise de diversidade genética entre os ciclos de seleção recorrente da população UENF-14 em nível de marcadores SSR-ESTs, de 50 iniciadores testados, 34 produziram fragmentos de DNA amplificados, dos quais somente 16 foram polimórficos. Os 16 *primers* SSR-ESTs cobriram 9 dos 10 grupos de ligação do milho-pipoca, com a posição no mapa genético (*MaizeGDB*) e temperaturas de anelamento obtidas pela reação de PCR proposta para a população UENF-14 (Tabela 5).

Tabela 5. Sequência de 16 pares de iniciadores microssatélites, sequência (Motif), localização do cromossomo (Cr), temperatura de anelamento (T °C), posição no mapa genético em centimorgan (cM) e Função*.

Locos	Sequência (5' □ 3')	Motif	Cr	T°C	cM	Função*
<i>umc1948</i>	<u>TGTTGAAATAATGGAACACCTCCC</u> <u>ATCTATCTGGTTTCACGATCTCGC</u>	-	1	63,0	82,6	Não caracterizada
<i>umc1071</i>	<u>AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG</u> <u>GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT</u>	(TACGA)5	1	61,0	78,7	<i>Glutathione S-transferase12</i>
<i>umc1448</i>	<u>ATCCTCTCATCTTTAGGTCCACCG</u> <u>CATATACAGTCTCTTCTGGCTGCTCA</u>	(GCT)5	2	59,0	232,5	Não caracterizada
<i>umc2174</i>	<u>GTACGTACGCAGCCACTTGTCAG</u> <u>ACATAAATAAAACGTGTGCCGCAG</u>	(CGA)4	3	61,0	566,2	Não caracterizada
<i>umc1389</i>	<u>AAAACACAACGCTGGACATCAAC</u> <u>GGTCGTTTTGCTTAGCCCATTTTA</u>	(TGAC)4	5	59,0	252,2	<i>brassinosteroid biosynthesis-like protein</i>

Tabela 5 cont.

Locos	Sequência (5' □ 3')	Motif	Cr	T°C	cM	Função*
<i>umc1155</i>	<u>TCTTTTATTGTGCCCGTTGAGATT</u> <u>CCTGAGGGTGATTTGTCTGTCTCT</u>	(AG)20	5	61,0	370,9	Não caracterizada
<i>umc1680</i>	<u>TTAATAAAGGAGAGGGTGGGAACC</u> <u>GGGGCTTATATGTCCCTTGAACTC</u>	(TC)7	5	59,0	434,1	Não caracterizada
<i>umc1221</i>	<u>AAACAGGCACAAAGCATGGATAG</u> <u>GCAACAGCAACTGGCAACAG</u>	(CT)7	5	59,0	329,5	Não caracterizada
<i>umc1336</i>	<u>GTACAAATGATAAGCAAGGGGCAG</u> <u>CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTTGG</u>	(ACCAG)5	5	59,0	95,3	Não caracterizada
<i>y1</i>	<u>CAAGAAGAGGAGAGGCCGGA</u> <u>TTGAGCAGGGTGGAGCACTG</u>	(CCA)3	6	61,0	99,4	<i>Chloroplast phytoene synthase</i>
<i>umc1393</i>	<u>CCTTCTTCTTATTGTCACCGAACG</u> <u>GCCGATGAGATCTTTAACAACCTG</u>	(GTC)4	7	59,0	212	Não caracterizada
<i>umc1327</i>	<u>AGGGTTTTGCTCTTGGAAATCTCTC</u> <u>GAGGAAGGAGGAGGTCGTATCGT</u>	(GCC)4	8	59,0	55,2	Não caracterizada
<i>umc1415</i>	<u>GTGAGATATATCCCCGCCTTCC</u> <u>AGACTTCCTGAAGCTCGGTCCTA</u>	(GAC)10	8	61,0	119,5	Não caracterizada
<i>umc1714</i>	<u>CAAGGGCTCTTGCTCTTGAACATA</u> <u>CGACGACCTTAATTGTGTTCCCTT</u>	(AGG)8	9	63,0	514,1	Não caracterizada
<i>umc1196</i>	<u>CGTGCTACTACTGCTACAAAGCGA</u> <u>AGTCGTTTCGTGTCTTCCGAAACT</u>	CACACG	10	61,0	387,4	Não caracterizada
<i>umc1506</i>	<u>AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG</u> <u>ATAAAGGTTGGCAAAACGTAGCCT</u>	(AACA)4	10	61,0	287,5	Não caracterizada

**Zea mays*

Desses 16 iniciadores, seis estão associados aos locos para características quantitativas (QTL) importantes para a pipoca: *Umc1948*, *Umc1155*, *Umc1196*, *Umc1389*, *Umc1327* e *Umc1714* (Babu et al., 2006; Li et al., 2007; Dong et al., 2015). As descrições desses QTL's referentes a esses iniciadores estão resumidos na Tabela 6. Esta informação é relevante, pois ao longo dos ciclos de seleção recorrente de milho-pipoca houve priorização de seleção de uma das características de maior interesse - capacidade de expansão.

Tabela 6. Iniciadores que estão associados com os locos de caracteres quantitativos (QTL) detectados para a pipoca encontrados na literatura.

Iniciadores	^a R ² (%)	^b A	Função	Referência
<i>umc1948</i>	13,0	22,1	Capacidade de expansão	Li et al. (2007)
<i>umc1155</i>	10,0	22,6	Capacidade de expansão	Babu et al. (2006)
<i>umc1196</i>	7,2	0,03	Teor de óleo	Dong et al. (2015)
<i>umc1389</i>	4,6	0,16	Teor de proteína	Dong et al. (2015)
	13,4	-0,62	Teor de amido	
<i>umc1327</i>	6,5	-0,01	Teor de Lisina	Dong et al. (2015)
<i>umc1714</i>	0,1	1,30	Teor de proteína	Dong et al. (2015)

^aR² percentagem de variância fenotípica explicada por cada QTL

^bA média do efeito aditivo estimado de QTL

Apenas dois iniciadores apresentaram três alelos (*Umc1393* e *Umc1448*), enquanto os demais apresentaram dois alelos (Tabela 7). Foram identificados um total de 34 alelos, com média de 2,13 alelos por loco.

Tabela 7. Número de alelos (NA), coeficiente de endogamia (FIS), déficit de heterozigotos (FIT), proporção da diversidade gênica entre os ciclos testados (FST), variância genética entre ciclos (Vg) e o coeficiente de determinação genotípico (H²) de 16 iniciadores avaliados em nove ciclos de seleção (C0 – C8) recorrente na população UENF-14 de milho-pipoca.

Locos	NA	FIS	FIT	FST	Vg	H ²
<i>umc1948</i>	2	0,19	0,23	0,05	1,20	45,97
<i>umc1071</i>	2	0,23	0,30	0,09	2,94	67,42
<i>umc1448</i>	3	-0,25	-0,22	0,02	5,96	68,50
<i>umc2174</i>	2	0,40	0,43	0,06	0,61	28,42
<i>umc1389</i>	2	-0,33	-0,31	0,02	1,13	36,27
<i>umc1155</i>	2	-0,23	-0,21	0,02	3,77	69,22
<i>umc1680</i>	2	-0,05	0,04	0,09	0,00	0,00
<i>umc1221</i>	2	0,02	0,11	0,09	1,98	56,93
<i>umc1336</i>	2	-0,02	0,03	0,04	1,62	42,29
<i>y1</i>	2	-0,28	-0,25	0,02	0,00	0,00
<i>umc1393</i>	3	-0,18	0,07	0,21	12,32	81,79
<i>umc1327</i>	2	0,14	0,19	0,06	0,35	23,75
<i>umc1415</i>	2	0,25	0,34	0,12	7,20	84,28
<i>umc1714</i>	2	-0,11	-0,06	0,04	1,17	57,13
<i>umc1196</i>	2	0,18	0,22	0,05	0,77	51,55
<i>umc1506</i>	2	0,17	0,27	0,12	0,41	34,06
Média	2,13	0,01	0,10	0,07	2,59	46,72

De acordo com relatos investigados na literatura, o número médio de alelos observados por loco no presente trabalho (2,13) (Tabela 7) foi menor que outros para a cultura do milho comum e de milho-pipoca (Dandolini et al., 2008, Trindade et al., 2010; Eloi et al., 2012; Franzoni et al., 2012). Franzoni et al. (2012), analisando oito ciclos de seleção recorrente intrapopulacional na população CMS-43 de milho-pipoca, encontraram 72 alelos, utilizando 20 locos de SSRs, com média de 3,6 alelos por loco. Eloi et al. (2012), em estudos de divergência genética em oito diferentes variedades de milho-pipoca, utilizando 15 marcadores SSRs, encontraram 57 alelos, com média de 3,7 alelos por loco. Dandolini et al. (2008) e Trindade et al. (2010) encontraram 3,35 e 3,0 alelos por loco, respectivamente, utilizando 14 e 15 iniciadores em 10 e 8 linhagens de milho-pipoca. Isso pode ser devido ao tipo de iniciador de SSR-ESTs utilizado, já que representam regiões expressas de milho comum e não especificamente de milho-pipoca, além do que o processo de repetição de ciclos seletivos na cultura do milho-pipoca prioriza, sobretudo, a seleção de apenas duas características principais, produtividade de grãos e capacidade de expansão (Liu et al., 2003; Franzoni et al., 2012).

Os locos, em média, apontam para o coeficiente de endogamia (FIS) e déficit de heterozigotos (FIT) com valores positivos e baixos - 0,01 e 0,10 -, sugerindo baixa endogamia e predominância de heterozigotos (Tabela 7), principalmente nos ciclos iniciais de seleção recorrente. Um nível moderado de diferenciação entre os ciclos de seleção recorrente foi detectado nas amostras da população UENF-14 ($F_{ST} = 0,07$) com F_{ST} variando de 0,02 a 0,21. O valor médio de F_{ST} indicou que 7 % da variância total das frequências alélicas nos locos SSR-ESTs deveu-se a diferenças genéticas entre os ciclos de seleção recorrente. Os iniciadores considerados de alto nível de informação na diferenciação dos ciclos de seleção recorrente foram *Umc1393* e *Umc1415*, devido aos maiores valores de variância genética, coeficiente de determinação genotípico e diferenciação gênica entre os ciclos (*Umc1393*: $F_{ST} = 0,21$, $V_g = 12,32$, $H^2 = 81,79$; e *Umc1415*: $F_{ST} = 0,12$, $V_g = 7,20$, $H^2 = 84,28$), enquanto os iniciadores *y1* e *Umc1680* foram os menos informativos, com estimativas nulas de variância genética e o coeficiente de determinação genotípico.

A análise da diversidade por meio da estatística F, de Wright, é útil para determinar o quanto cada loco influencia nos ciclos da população estudada (Cruz

et al., 2011). Os valores mais altos de déficit de heterozigotos e de endogamia foram verificados nos locos *Umc2174* (FIT = 0,43 e FIS = 0,40) e *Umc1415* (FIT = 0,34 e FIS = 0,25), que embora ainda apresentem valores abaixo de 0,50, apontam para uma possível tendência de fixação de determinados alelos nos referidos locos, o que pode estar sendo alvo da seleção direcionada, juntamente com os locos para as características de interesse. Porém, esta hipótese de que os locos podem estar ligados com locos de características quantitativas, requer uma investigação mais detalhada em trabalhos futuros. A moderada diferenciação entre os ciclos (FST = 0,07) sugere a formação de grupos divergentes, já que de acordo com Wright (1978), valores de FST entre 0,05-0,015 são de moderada divergência entre os ciclos. Os locos *y1* e *Umc1680* não foram suficientemente informativos, por apresentarem variância genética e proporção da variância genética nulas, inferindo que possuem frequências próximas de alelos idênticas, portanto, não pressupondo existência de diferenças genéticas (Wright, 1978).

3.2.4.2 Redução da heterozigosidade e aumento da endogamia na população UENF-14 ao longo dos ciclos de seleção recorrente

Valores de diversidade genética com base na heterozigosidade observada (H_o) referem-se à proporção de frequência de heterozigotos nas amostras da população de cada ciclo, enquanto a heterozigosidade esperada (H_e) corresponde proporção da frequência de heterozigotos numa população supostamente em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Cruz et al., 2011). A diversidade genética entre os ciclos de seleção recorrente da população UENF-14 de milho-pipoca com o uso dos 16 iniciadores SSR-ESTs, em média, indicou uma perda de 61,90 % de heterozigosidade observada (H_o), do ciclo inicial (C0) ao ciclo final (C8), o que pode ser considerada relativamente grande em comparação à heterozigosidade esperada (H_e), que reduziu em 18,37 % (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros de diversidade genética avaliados para nove ciclos de seleção recorrente (C0-C8) na população UENF-14 de milho-pipoca: Número de alelos (Na), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), Índice de fixação (F) e Índice de Shannon (IS).

Ciclos	N (a)	Ho	He	F	IS
C0	2,06	0,63	0,49	-0,29	0,69
C1	2,13	0,56	0,47	-0,19	0,68
C2	2,13	0,51	0,47	-0,11	0,68
C3	2,06	0,47	0,47	-0,02	0,67
C4	2,13	0,43	0,47	0,07	0,68
C5	2,06	0,40	0,43	0,07	0,63
C6	2,06	0,35	0,43	0,19	0,63
C7	2,06	0,31	0,41	0,19	0,60
C8	2,06	0,24	0,40	0,22	0,59
Média	2,08	0,43	0,45	0,34	0,65

Considerando o milho, uma espécie tipicamente panmítica, o esperado é que a proporção de heterozigotos observados fosse próxima à de heterozigotos esperados, correspondendo a uma panmixia igual a um e conseqüentemente, com endogamia próxima a zero. Mas, o que se verificou ao longo dos ciclos é um distanciamento destas proporções, sendo que nos ciclos iniciais se observa inclusive um excesso de heterozigotos e nos ciclos mais avançados, uma deficiência de heterozigotos. O excesso de heterozigotos nos ciclos iniciais pode ser interpretado como indicativo de sobredominância, o que poderia estar relacionado com a origem da população UNB-2U, sendo composta através de cruzamentos a partir de três populações (UNB-1, SAM e uma variedade resistente a *Exserohilum turcicum*). Por sua vez, a deficiência de heterozigotos pode ser devido à deriva genética, provavelmente resultante da recombinação de número limitado de indivíduos selecionados ao longo dos ciclos, favorecendo o cruzamento entre indivíduos aparentados e conseqüente incremento de endogamia. Em concordância com esta variação entre os ciclos sucessivos, Franzoni et al. (2012), em estudo com 20 locos SSRs em oito ciclos de seleção recorrente de milho-pipoca no composto CMS-43, observaram também uma redução das heterozigosidades observadas e esperadas ao longo dos ciclos, de 31 % e 25,67 % dos ciclos C0 a CVIB, respectivamente.

Os níveis da frequência de Ho de cada loco, ao longo dos ciclos, apresentaram-se todos significativos ($p < 0,01$) (Figura 2). A frequência de He teve menor oscilação que a frequência de Ho. A frequência de Ho no ciclo inicial foi maior para os locos *Umc1071*, *Umc1393* e *Umc1680*; e os locos de baixos níveis de Ho no oitavo ciclo, foram: *Umc2174*, *Umc1327*, *Umc1196*, *Umc1393* e *Umc1336*.

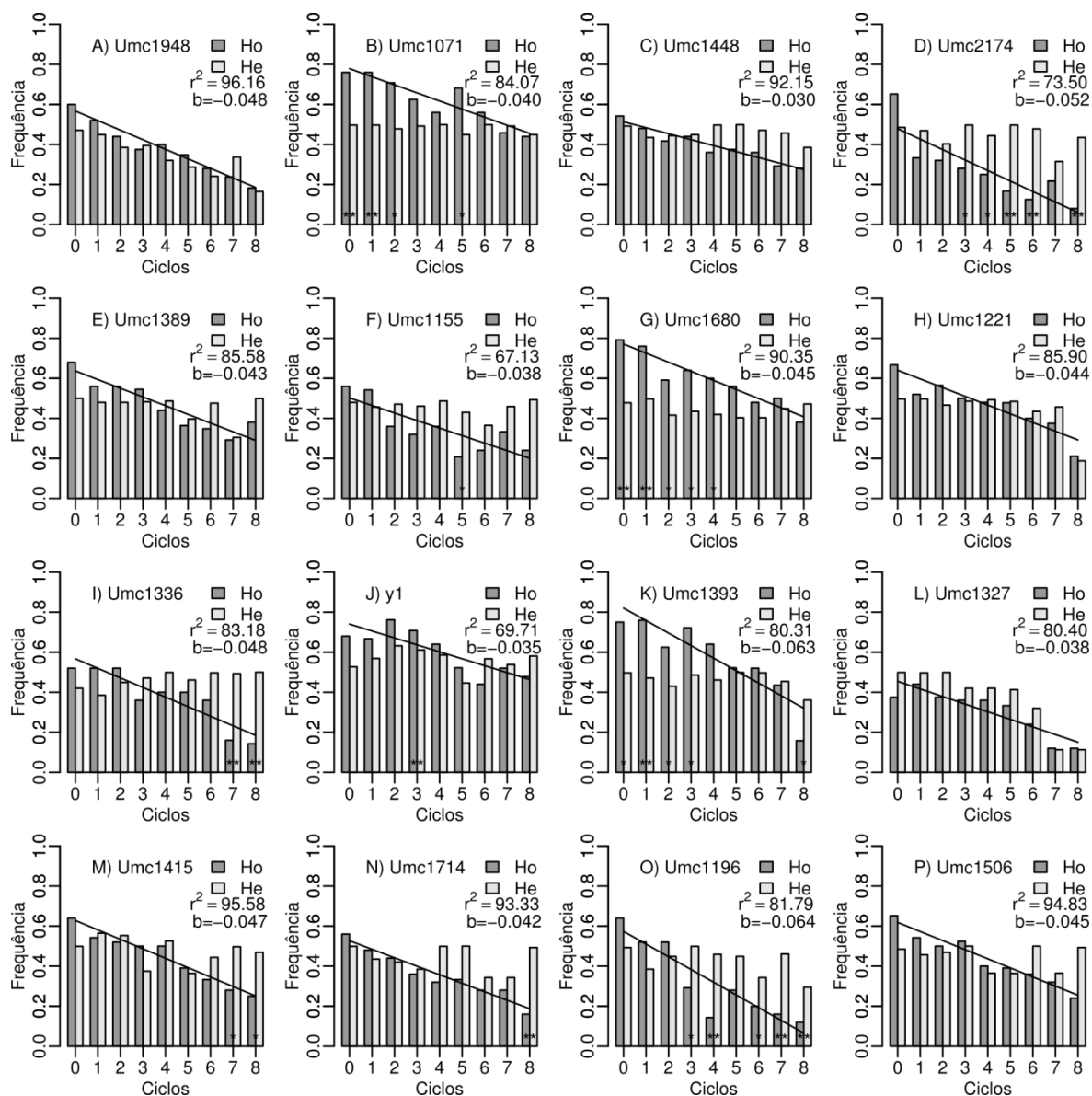


Figura 2. Frequência da heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW- ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) de 16 locos SSR-ESTs avaliados em nove ciclos de seleção recorrente (C0-C8) na população UENF-14 de milho-pipoca.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado por meio do teste χ^2 entre os 16 locos de SSR-ESTs avaliados ao longo dos ciclos de seleção da população UENF-14 (Figura 2). Seis locos (*Umc1948*, *Umc1389*, *Umc1506*, *Umc1327*, *Umc1221* e *Umc1448*) apresentaram-se em EHW em todos os ciclos. Os locos que não estavam em EHW no ciclo inicial, foram: *Umc1071*, *Umc1393* e *Umc1680*; e, no oitavo ciclo, foram: *Umc1196*, *Umc2174*, *Umc1393*, *Umc1415* e *Umc1714*.

O teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na base genética da população é de fundamental importância para estudos iniciais e gerações sequenciais, pois permite ao melhorista conhecer as frequências alélicas e genotípicas que ocorrerão nas gerações futuras, bem como a manipulação da população e sua dinâmica evolutiva (Cruz et al., 2011). Entretanto, o EHW constantemente é alterado no processo de seleção, visando ao melhoramento da população, mas posteriormente é restabelecido, recuperando, assim, a homogeneidade e a estabilidade da população para fins comerciais. Espera-se que na população de estudo (UENF-14) todos os locos se encontrem em EHW, já que as famílias selecionadas dão origem às plantas que serão recombinadas para formar uma população subsequente melhorada. Porém, a maioria dos locos não apresentaram EHW em todos os ciclos, ratificando o potencial efeito da deriva genética. Somente seis locos exibiram EHW em todos os ciclos, sendo três desses (*Umc1948*, *Umc1327* e *Umc1389*) relacionados a caracteres quantitativos (QTL) para a pipoca (Li et al., 2007; Dong et al., 2015).

As estimativas do Índice de Fixação (F) tiveram valores crescentes de F ao longo dos ciclos, sendo que o Ciclo C8 expressou a maior magnitude (F = 0,22) (Tabela 8). O Índice de Fixação (F) é uma estimativa que permite inferir a respeito de informações sobre o nível de homozigose da população. O valor negativo da estimativa de F nos ciclos iniciais pode ser interpretado como uma estimativa de endogamia nula com predominância de indivíduos mais heterozigotos, e na medida em que os ciclos avançam, o valor de F vai aumentando, indicando que alguns alelos dos locos SSR-ESTs identificados entre os ciclos, tendem a se tornarem homozigotos devido à redução da frequência dos heterozigotos.

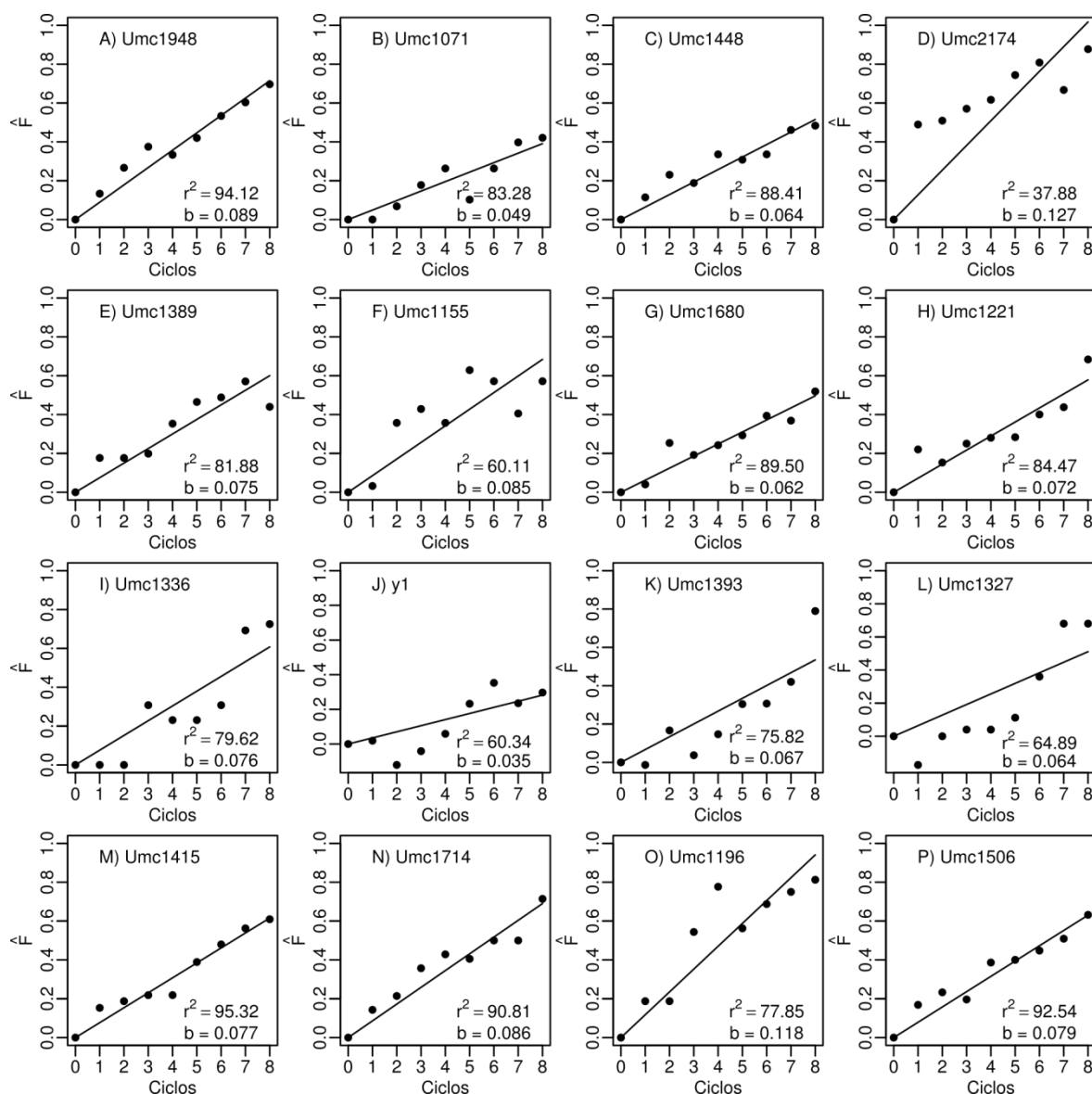


Figura 3. Índice de Fixação para 16 iniciadores de SSR-ESTs avaliados em nove ciclos de seleção (C0-C8) na população UENF-14 de milho-pipoca.

A variação ao longo dos ciclos para o Índice de Fixação foi observada em todos os locos ($p < 0,01$), o que revela que os alelos dos locos estão tendendo a um aumento da endogamia a cada ciclo (Figura 3).

Os locos que apresentaram maiores valores no último ciclo foram *Umc2174* e *Umc1196* (Figura 3). No Ciclo C8, os iniciadores com frequências alélicas mais elevadas, foram: *Umc2174* e *Umc1196*, sendo que o primeiro loco foi, também, o que teve maior valor de coeficiente de endogamia ($FIT = 0,40$); e o

segundo loco está relacionado com os caracteres quantitativos (QTL) para a qualidade nutricional da pipoca.

Com base nas estimativas do Índice de Shannon (IS), em média, houve reduzida variação genotípica na magnitude de 0,15 %, entre o ciclo inicial (C0, IS = 0,69) e o ciclo final (C8, IS = 0,59) (Tabela 8). A variabilidade ou riqueza em termos de variação genotípica dentro dos ciclos é estudada por meio do Índice de Shannon (IS), o qual define que a diversidade será tanto maior quanto mais próximos da unidade forem os valores estimados. O maior valor de IS no ciclo inicial (C0: IS = 0,69) já era esperado ocorrer, pois, além das plantas não passarem por forte pressão de seleção no início, reforça a origem da população UNB-2U relatada anteriormente e, com isso, uma maior variabilidade foi verificada. O valor médio do Índice de Shannon em todos os ciclos (0,65) pressupõe a existência de moderada variabilidade nessa população, o que é suficiente para a continuidade do Programa de Melhoramento de Milho-Pipoca da UENF.

Em contrapartida, Ribeiro et al. (2016) analisando as variações significativas em termos de genética quantitativa quanto as respostas fenotípicas entre programas de seleção recorrente na população UENF-14 após seis ciclos seletivos, encontraram que tanto para as características produtividade de grãos e capacidade de expansão, a magnitude da variabilidade permanece, sem evidência de diminuição nos ciclos.

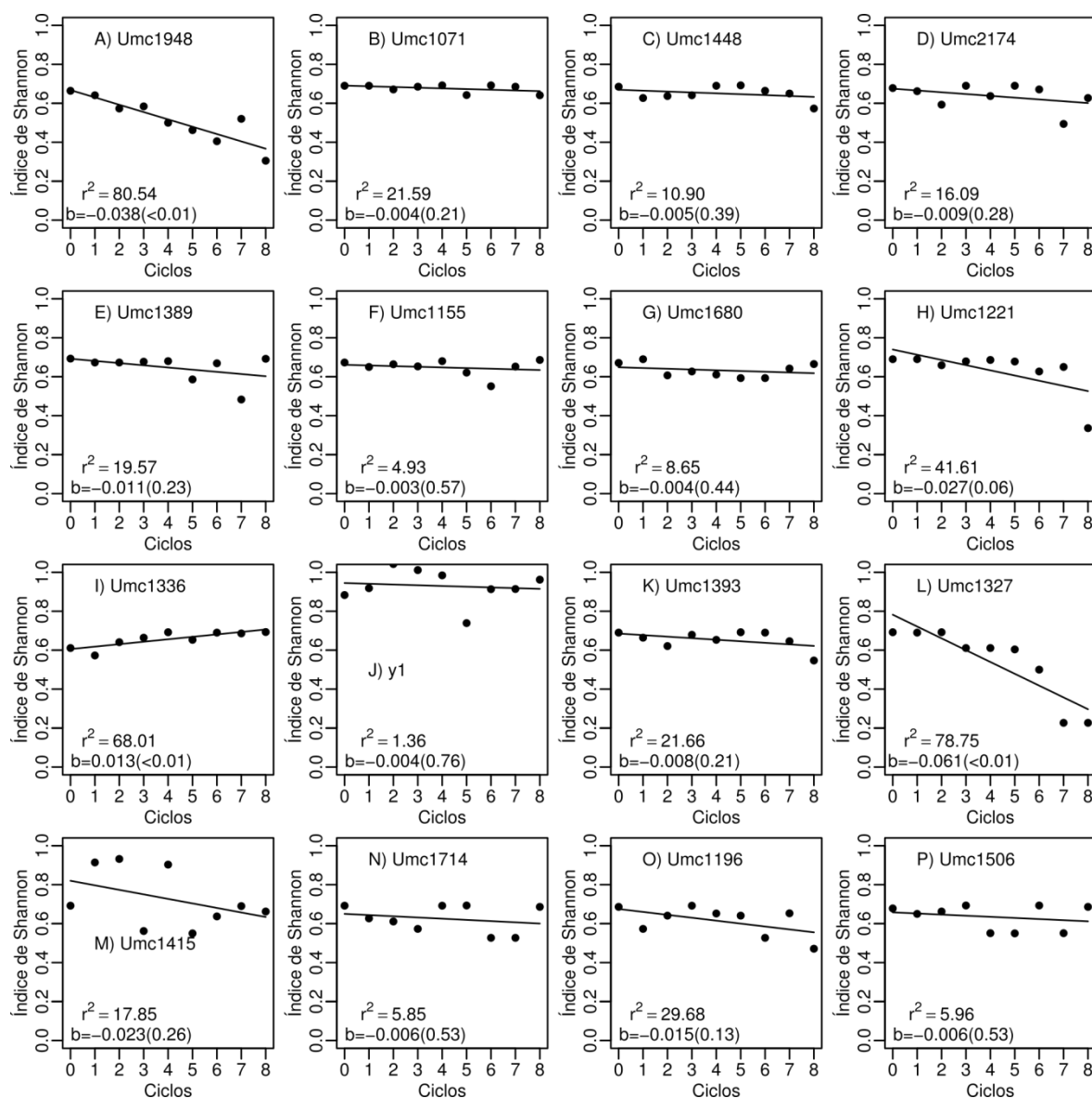


Figura 4. Índice de Shannon para 16 iniciadores SSR-ESTs avaliados em nove ciclos de seleção recorrente (C0-C8) na população UENF-14 de milho-pipoca.

O Índice de Shannon ao longo dos ciclos mostrou-se significativo somente em quatro locos: *Umc1948*, *Umc1327*, *Umc1221* e *Umc1336* (Figura 4), dos quais, os dois primeiros estão relacionados com os caracteres quantitativos (QTL) para a pipoca, a capacidade de expansão e nutricional, respectivamente, indicando um decréscimo da variação genotípica ao longo dos ciclos de seleção, o que já era de se esperar, devido à ocorrência sistemática do processo seletivo de plantas para maior capacidade de expansão. Ao se realizar uma análise ao longo dos ciclos, nota-se que os locos *Umc1680* e *y1*, que apresentaram variação

nula ($V_g = 0$) (Tabela 5), também não demonstraram variação significativa pelo Índice de Shannon.

A representação gráfica da frequência alélica ao longo dos ciclos foi realizada somente para um alelo por loco, devido a não-significância dos demais alelos (Figura 5); e, no loco *Umc1393*, o terceiro alelo apareceu somente em quatro ciclos: C1, C2, C3 e C4 (dados não apresentados). Com o uso da seleção recorrente espera-se que os alelos favoráveis à seleção aumentem ao longo dos ciclos. Porém, apenas três alelos (8,82 %) pertencentes aos locos *Umc1714* ($p < 0,01$), *Umc1506* ($p < 0,01$) e *Umc1071* ($p < 0,10$) apresentaram significância atribuída à mudança da frequência dos alelos ao longo dos ciclos, sendo que nos dois primeiros locos obteve-se frequência próxima de 0,90, com aumento de 0,03 e 0,06 na frequência alélica por ciclo, respectivamente; ainda, o alelo representado no loco *Umc1714* é associado aos locos de QTL's para a qualidade nutricional da pipoca (Dong et al., 2015).

Observou-se que houve uma oscilação na frequência de cada alelo na maioria dos 16 locos de SSR-ESTs em cada um dos ciclos de seleção recorrente. As oscilações na frequência alélica da maioria dos locos, durante os ciclos seletivos, podem ser explicadas pelo fato de que os marcadores SSR-ESTs utilizados podem estar se ligando a outros locos que estão sofrendo pressão de seleção para as características de interesse (Heath et al., 1993; Labate et al., 2003).

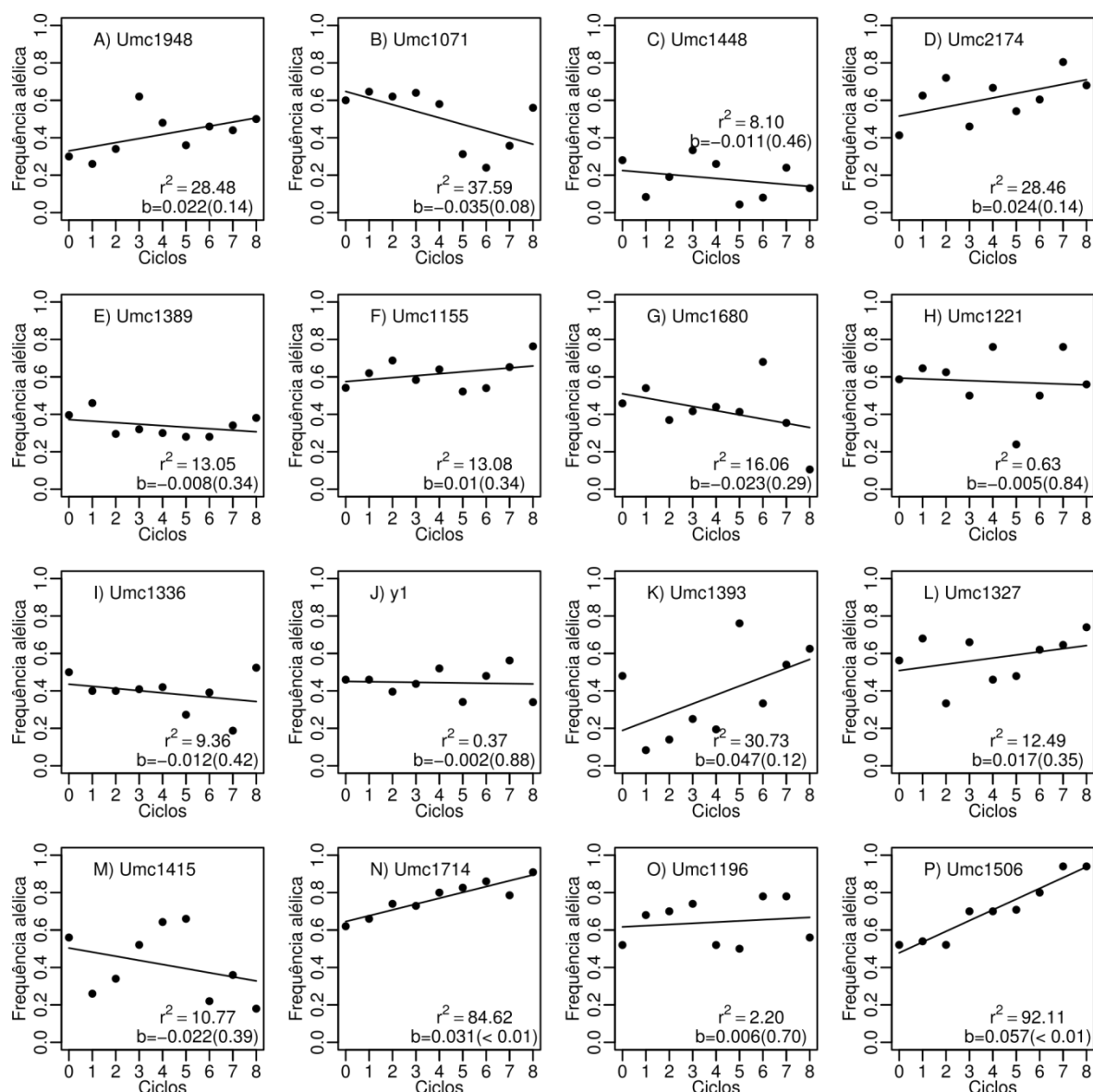


Figura 5. Frequência dos alelos de 16 iniciadores SSR-ESTs avaliados em nove ciclos de seleção recorrente (C0-C8) na população UENF-14 de milho-pipoca.

Outro fator responsável pela alteração dispersiva na frequência alélica, pode ser a deriva genética, que é um fenômeno que se dá inteiramente ao acaso, sendo um dos maiores problemas de amostragens representativas de uma população, e que devido ao número pequeno de famílias selecionadas e recombinadas para dar origem às populações melhoradas, pode promover o aumento da probabilidade de se eliminar determinados genótipos, e conseqüentemente, contribuir para a predominância de certas combinações genóticas na população (Souza Júnior et al., 2000; Cruz et al., 2011). Da mesma forma, Pinto et al. (2003) e Franzoni et al. (2012) encontraram uma

mudança na frequência alélica ao longo dos ciclos de seleção recorrente interpopulacional de milho e intrapopulacional em milho-pipoca, utilizando 30 e 20 locos SSRs, respectivamente.

3.4.4.3 Estrutura e agrupamento entre os ciclos de seleção recorrente da população UENF-14

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a menor parte da diferenciação genética ocorreu entre os ciclos (10 %) do que dentro dos ciclos (90 %). Os valores ϕ_iPT entre os pares dos ciclos de seleção recorrente foram estimados na figura do *heatmap* (Figura 6).

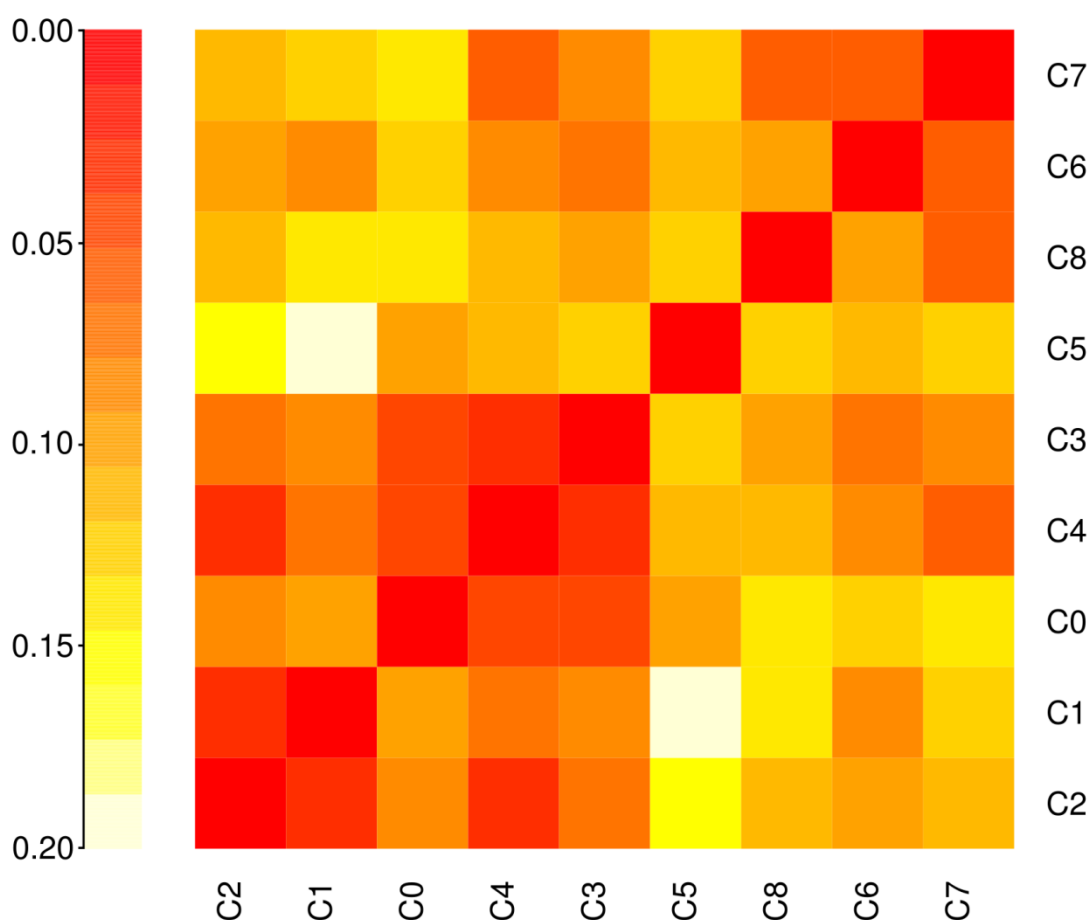


Figura 6. Diferenciação genética aos pares de ϕ_iPT entre ciclos de seleção recorrente: $d < 0,05$ = vermelho; $0,05 < d < 0,15$ = escores alaranjado a amarelos; e $d > 0,20$ = brancas.

As menores distâncias foram observadas entre os ciclos C0 e C3 (0,045), C0 e C4 (0,042), C1 e C2 (0,029), C2 e C4 (0,028) e C3 e C4 (0,027), sendo representadas pelos escores de cor vermelha ($d < 0,05$) (Figura 6). Por outro lado, entre o par C1 e C5 (0,200) houve a maior distância – escores de cor branca ($d > 0,20$) –, sendo que os demais pares entre os ciclos – representados pelos escores de cor alaranjados a amarelo ($0,05 < d < 0,20$) – tiveram distâncias intermediárias.

Estas diferenciações genéticas entre os ciclos de seleção recorrente podem ser observadas também com base nos valores da matriz de dissimilaridade, pelo índice de Nei e na análise PCA (Figura 7a), além do agrupamento UPGMA (Figura 7b). Os valores próprios obtidos a partir do PCA mostraram que as duas primeiras coordenadas explicaram 72,43 % da variação total dos dados (PC1: 47,34 %; PC2: 25,09 %) e que houve grande distância genética entre os ciclos C1 e C5, comprovada pela análise phiPT.

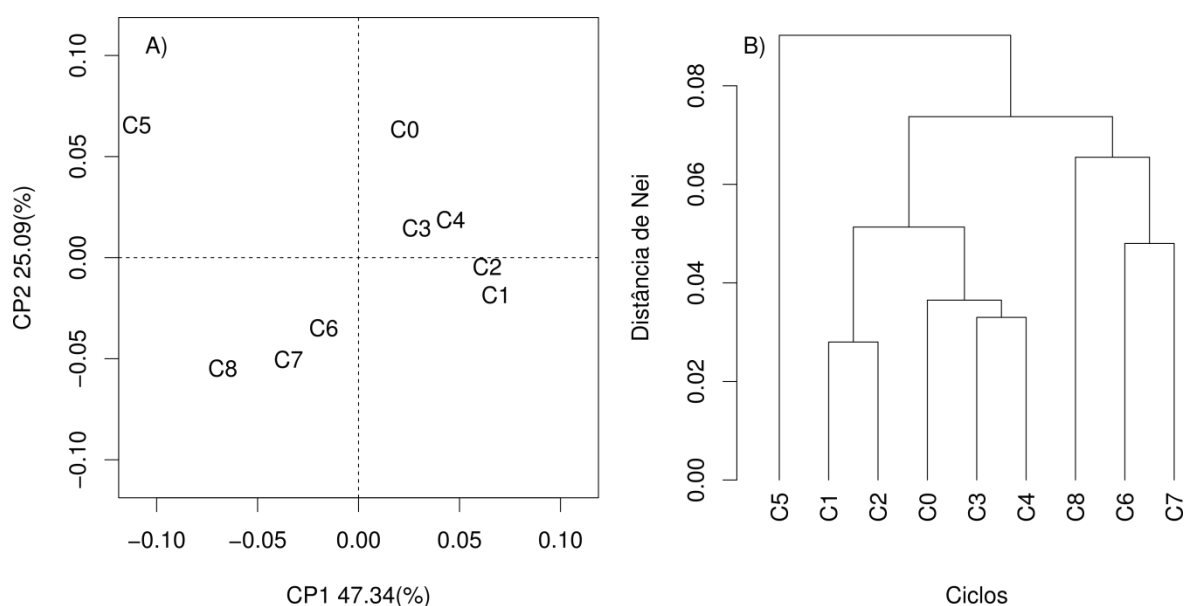


Figura 7: a) Análise de Coordenadas Principais; b) Dendrograma obtido pelo método UPGMA, com base na distância estabelecida pelo índice de Nei entre nove ciclos de seleção recorrente intrapopulacional para a população UENF-14, com base em 16 iniciadores SSR-ESTs, CCC= 81 %.

Por meio de um corte feito na mudança mais abrupta de nível no dendrograma – distância de 0,07 – foram constituídos três grupos: C0, C1, C2, C3 e C4; C5; e C6, C7 e C8; sendo que o primeiro reuniu os ciclos de menores distâncias pela análise aos pares de phiPT (Figura 6). O valor do coeficiente de correlação cofenético obtido, 0,81, indica que houve uma boa concordância entre a disposição gráfica da distância genética a partir do dendrograma pelo agrupamento de UPGMA e a matriz original obtida entre as medidas de dissimilaridade pelo índice de Nei. O estudo do agrupamento e a estrutura da população ao longo dos ciclos são de grande importância para averiguar se a população UENF-14 de milho-pipoca está mantendo a variabilidade genética e se os ciclos de seleção recorrente compartilham os alelos analisados no estudo. Embora dos 16 marcadores SSR-ESTs somente seis estejam relacionados com a pipoca para capacidade de expansão e qualidade nutricional, foi possível separar os ciclos de seleção recorrente em três grupos, de acordo com o dendrograma da Figura 7b. Um grupo reuniu os ciclos iniciais (C0, C1, C2, C3 e C4) e outro grupo, os ciclos finais (C6, C7 e C8), o que pode inferir a existência de um conjunto específico de alelos em comum para cada grupo formado.

Os 34 alelos obtidos foram utilizados para inferir sobre a estrutura genética da população UENF-14 de milho-pipoca ao longo dos ciclos. A análise da estrutura genética com abordagem bayesiana mostrou que $K = 3$ foi o número ideal de grupos genéticos (K) que melhor ajustou, por apresentar o maior valor de ΔK (10,37) consonante com a inferência de Evanno et al. (2005) (Figura 8a). Assim, foi possível distinguir os três subgrupos, com base no compartilhamento de alelos nos indivíduos de cada ciclo. Nos ciclos iniciais (C0, C1 e C2) observou-se maior variabilidade devido a uma melhor distribuição das frequências de cada subgrupo; e uma menor variabilidade, embora aparentemente constante, nos ciclos finais (Figura 8b). Nota-se que a partir do C3 em diante houve um maior compartilhamento de alguns alelos com maior frequência, os quais foram representados pelo subgrupo azul.

É sabido que a seleção recorrente proporciona um aumento gradativo da frequência dos alelos favoráveis para as características de interesse agrônomo, mantendo a variabilidade genética ao longo dos ciclos, garantindo, assim, o progresso com a seleção. Assim, a estrutura da população UENF-14, observada

ao longo dos ciclos, apresentou um incremento no compartilhamento dos alelos do subgrupo azul, resultando em aumento da sua probabilidade.

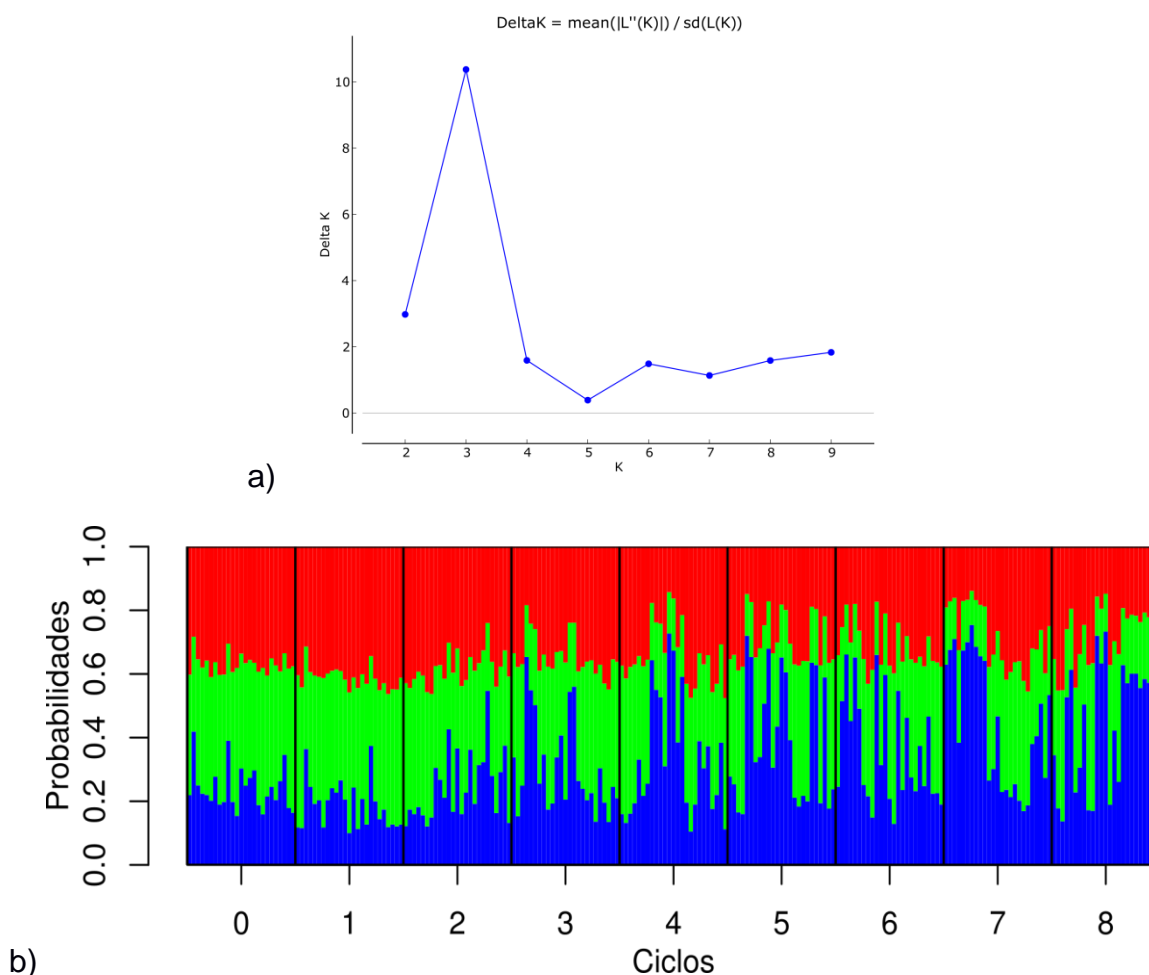


Figura 8. Análise da estruturação genética pela inferência bayesiana de nove ciclos de seleção recorrente (C0-C8) da população UENF-14 de milho-pipoca, representado por 25 amostras de cada ciclo de seleção para 16 iniciadores SSR-ESTs; **a)** Valor do delta K com o respectivo número de grupos (K); **b)** Probabilidade dos subgrupos para cada ciclo de seleção recorrente.

Entretanto, a maior variabilidade dos subgrupos foi observada nos ciclos iniciais, e, embora menor nos ciclos finais, aparentemente permaneceu constante (Figura 8b), o que garante ainda ganhos genéticos nos próximos ciclos seletivos. Esse resultado corrobora com os de Vilela et al. (2008), estudando os ciclos iniciais (C0, C1 e C2) nessa mesma população de estudo (ainda designada UNB-

2U), que verificaram a não redução da base genética por meio de marcadores RAPD. Já, os trabalhos conduzidos por Pinto et al. (2003) e Franzoni et al. (2012) utilizando marcadores SSR para relatar efeitos da seleção recorrente interpopulacional de milho (tropical BR 105 e BR 106 com a sintéticos IG-3 e IG-4) e intrapopulacional em milho-pipoca (CMS-43) respectivamente, encontraram uma redução no número de alelos e uma mudança na frequência do alelo ao longo dos ciclos, ocasionando o funilamento genético das populações, porém, com a diversidade genética total encontrada permitiu realizar ciclos posteriores com possíveis ganhos genéticos para as principais características. Essa é uma das principais preocupações do melhorista, ou seja, manter a variabilidade sem estreitar a base genética da população de estudo. Uma sugestão importante, para que não ocorra tal estreitamento, é verificar se o tamanho efetivo da população (N_e) que irá compor a etapa de recombinação da seleção recorrente, está sendo suficiente para garantir o progresso com a seleção (Falconer, 1981).

3.2.5 CONCLUSÕES

O uso de 16 iniciadores SSR-ESTs em nove ciclos de seleção recorrente da população de milho-pipoca UENF-14 expressou ocorrência de diversidade genética entre os ciclos seletivos.

Ao longo dos ciclos de seleção recorrente, houve uma redução na heterozigosidade observada, esperada e do Índice de Shannon, além de aumento da endogamia.

Houve maior compartilhamento dos alelos com menor variabilidade, embora constante, nos ciclos finais, o que garante ainda ganhos genéticos nos próximos ciclos seletivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwall, M., Shrivastava, N., Padh, H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27:617-631.
- Agriannual (2015). *Anuário da Agricultura Brasileira*. FNP consultoria & comércio, M&S Mendes & Scotini. Editora FNP, 521p.
- Alzate-Marin, A.L., Cervigni, G.D.L., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2005) Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. *Fitopatologia Brasileira*, 30:333-342.
- Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S.P., Rangel, R.M., Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Moraes, R.C., Schuelter, A.R. (2010) Improvement of a popcorn population using selection indexes from a fourth cycle of recurrent selection program carried out in two different environments. *Genetics and Molecular Research*, 9:340-370.
- Amaral Junior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Freitas Júnior, S.P., Candido, L.S., Vittorazzi, C., Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Silva, T.R.C., Pereira, M.G., Scapim,

C.A., Viana, A.P., Carvalho, G.F. (2013) UENF 14: a new popcorn cultivar. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13:218-220.

Anuário Brasileiro do Milho (2016). Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 96p.

Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al Sadoon, M., Shobrak, M. (2010) A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Science*, 11:2079-2096.

Arnhold, E., Viana, J. M. S. (2007) Eficiência da seleção dentro de famílias S4 de milho-pipoca, visando à obtenção de linhagens. *Revista Ceres*, 54:107-111.

Ashman, R.B. (1983) *Popcorn*, Purdue University, Cooperative Extension Service, Plant Disease Control, Bulletin BP-4.

Becker, J., Heun, M. (1995) Barley microsatellites: Allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology*, 27:835-845.7

Babu, R., Nair, S.K., Kumar, A., Rao, H.S., Verma, P., Gahalain, A., Singh, I.S., Gupta, H.S. (2006) Mapping QTLs for popping ability in a popcornx flint corn cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:1392-1399.

Beadle, G.W. (1978) Teosinte and the origin of maize. *In: Walden, D.B. (ed.) Maize breeding and genetics*. 8 ed. New York: Jhon Wiley & Sons, p. 113-141.

Bernardo, R. (2008) Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science*, 48:1649-1664.

Bertolucci, P. Pipoca proporciona saciedade e tem ação antioxidante: <http://www.minhavidade.com.br/alimentacao/materias/17301-pipoca-proporciona-saciedade-e-tem-acao-antioxidante>. Acesso em 23 de janeiro de 2016.

- Borém, A., Caixeta, E.T. (2009) *Marcadores moleculares*. 2. ed. Viçosa: UFV, 532p.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32:314-333.
- Butron, A., Widstrom, N.W., Snook, M.E., Wiseman, B.R. (2000) Recurrent selection for corn earworm resistance in three corn synthetics. *Maydica*, 45:295-300.
- Cabral, P.D.S., Amaral Júnior, A.T., Freitas, I.L.J., Ribeiro, R.M., Silva, T.R.C. (2016) Relação de causa e efeito de caracteres quantitativos sobre a capacidade de expansão do grão em milho-pipoca. *Revista Ciência Agronômica*, 47:108-117.
- Chabane, K., Ablett, G.A., Cordeiro, G.M., Valkoun, J., Henry, R.J. (2005) EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52:903-909.
- Chagné, D., Chaumeil, P., Ramboer, A., Collada, C., Guevara, A., Cervera, M.T., Vendramin, G.G., Garcia, V., Frigerio, J.M., Echt, C., Richardson, T., Plomion, C. (2004) Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1204-1214.
- Chen, X., Sullivan, P.F. (2003) Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The Pharmacogenomics Journal*, 3:77-96.
- Choudhary, P., Khanna, S.M., Jain, P.K., Bharadwaj, C., Kumar, J., Lakhera, P.C., Srinivasan, S. (2012) Genetic structure and diversity analysis of the primary gene pool of chickpea using SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 11:891-905.

- 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.
- Comstock, R.E., Robinson, H.F., Harvey, P.H. (1949) Abreeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agronomy Journal*, 41:360-367.
- Cruz, C. D., Ferreira, F. M., Pessoni, L. A. (2011) *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Visconde do Rio Branco: Suprema, 620p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J.; Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 514p.
- Cruz, C.D. (2013) Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35:271-276.
- Dandolini T.S., Scapim, C.A., Amaral Junior, A.T., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P.S., Mott, A.S., Lopes, A.D. (2008) Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8: 313-320.
- Daros, M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G. (2002) Genetic gain for grain yield and popping expansion in full-sib recurrent selection in popcorn. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2:339-344.
- Daros, M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G., Santos, F.S., Gabriel, A.P.C., Scapim, C.A., Freitas Júnior, S.P, Silvério, L. (2004a) Recurrent selection in inbred popcorn families. *Science Agricola*, 61:609-614.
- Daros, M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G., Santos, F.S., Scapim, C.A., Freitas Júnior, S.P., Daher, R.F., Ávila, M.R. (2004b) Correlações entre caracteres agrônômicos em dois ciclos de seleção recorrente em milho-pipoca. *Ciência Rural*, 34:1389-1394.

- Doffing, S.M, D'croz-Mason, N., Buck, J.S. (1991) Inheritance of expansion volume and yield in two popcorn × dent corn crosses. *Crop Science*, 31:715-718.
- Dong, Y., Zhang, Z., Shi, Q., Wang, Q., Zhou, Q., Li, Y. (2015) QTL identification and meta-analysis for kernel composition traits across three generations in popcorn. *Euphytica*, 204: 649-660.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Dutta, S., Kumawat, G., Singh, B.P., Gupta, D.K., Singh, S., Dogra, V., Gaikwad, K., Sharma, T.R., Raje, R.S., Bandhopadhyaya, T.K., Datta, S., Singh, M.N., Bashasab, F., Kulwal, P., Wanjari, K.B., Varshney, R.K., Cook, D.R., Singh, N.K. (2011) Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *BMC Plant Biology*, 11:1-13.
- Ebehart, S.A. (1970) Factors affecting efficiencies of breeding methods. *African Soils*. 15:669-680.
- Eloi, I.B., Mangolin, C.A., Scapim, C.A., Gonçalves, C.S., Machado, M.F. (2012) Selection of high heterozygosity popcorn varieties in Brazil based on SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 11:1851-1860.
- Engels, J.M.M., Ebert, A.W., Thormoann, I., Vicente M.C. (2006) Centre of crop diversity and/or origin, genetically modified crops and implications for plant genetic resources conservation. *Genetic Resources and Crop Evolutions*, 53:1675-1688.
- Erwin, A.T. (1949) The origin and history of popcorn, *Zea mays* L. var. *indurata* (Sturt) Bailey mut. *Everta* (Sturt) Erwin. *Agronomy Journal*, 41:53-56.

- 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 104:399-407.
- 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 & Genomes*, 4:333-341.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Falconer, D.S. (1981) *Introduction to Quantitative Genetics*. 2 ed. London, New York: Longmans Green.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*, 4. ed. New York: Pearson, 480p.
- Faria, V.R., Viana, J.M.S., Sobreira, F.M., Silva, A.C. (2008) Seleção recorrente recíproca na obtenção de híbridos interpopulacionais de milho-pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:1749-1755.
- Fehr, W.R. (1987) *Principles of cultivar development*. New York: MacMillan.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1996) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-Cenargem, 220p.
- Franzoni, J., Scapim, C. A., Beviláqua, M. R., Pacheco, C. A., & Mangolin, C. A. (2012) Application of microsatellite markers to evaluate the heterozygosity from the popcorn composite CMS-43 (*Zea mays* L.) during eight cycles of selection. *Plant breeding*, 131:479-485.

- Fraser, L.G., Harvey, C.F., Crowhurst, R.N., Silva, H.N. (2004) EST-derived microsatellites from Actinidia species and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:1010-1016.
- Freitas Junior, S.P., Amaral Junior, A.T., Rangel, R.M., Viana, A.P. (2009) Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9:1-7.
- Freitas, I.L.J., Amaral Junior, A. T., Viana, A. P., Pena, G. F., Cabral, P.S., Vittorazzi, C., Silva, T.R.C. (2013) Ganho genético avaliado com índices de seleção e com REML/Blup em milho-pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48:1464-1471.
- Freitas, I.L.J., Amaral Junior, A.T., Freitas Júnior, S P., Cabral, P.D.S., Ribeiro, R.M., Goncalves, L.S.A. (2014) Genetic gains in the UENF-14 popcorn population with recurrent selection. *Genetics and Molecular Research*, 13:518-527.
- 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*. New York: Academic Press, 48p.
- Galinat, W.C (1979) *Ciba-Geigy Agrochemicals: Maize*. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy Agrochemicals, 105p.
- Galvão, J.C.C., Sawazaki, E., Miranda, G.V. (2000) Comportamento de híbridos de milho pipoca em Coimbra. *Revista Ceres*, 47:201-218.
- Galvão, K.S.C., Ramos, H.C.C., Santos, P.H.A.D., Entringer, G.C., Vettorazzi, J.C.F., Pereira, M.G. (2015) Functional molecular markers (EST-SSR) in the full-sib reciprocal recurrent selection program of maize (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Research*, 14:7344-7355.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:7008-7015.
- Gonçalves, L.S., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Karasawa, M., Sudré, C.P. (2009) Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. *Genetics and Molecular Research*, 8:364-374.
- Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Bento, C.S., Moulin, M.M., Araújo, M.L., Daher, R.F., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G. (2008) Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. *Horticultura Brasileira*, 26:364-370.
- Goodman, M.M. (1980) *Melhoramento e produção do milho no Brasil: Botânica*. Piracicaba: ESALQ, 650p.
- Goodman, M.M., Smith, J.S.C. (1987) Botânica *In: Paterniani, E., Viegas, G.P. (ed.)*. *Melhoramento e produção de milho*. Piracicaba: Fundação Cargil, p. 41-78.
- Guadagnin, J.P. (1996) *Milho pipoca*. Porto Alegre: Fepagro, 11p.
- Guimaraes, A.G., Amaral Junior, A.T., Lima, V.J., Leite, J.T., Scapim, C.A., Vivas, M. (2016) Ganhos genéticos e avanços seletivos na população UENF-14 de milho-pipoca. *Revista Caatinga* (dados não publicados)
- IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>. Acesso em 03 de março de 2015.
- Jeffreys, A.J.V., Wilson, R., Thein S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314:67-73.
- Kilian, A., Huttner, E., Wenzl, P., Jaccoud, D., Carling, J., Caig, V., Evers, M., Heller-Uszynska, Cayla, C., Patarapuwadol, S., Xia, L., Yang, S., Thomson, B.

- (2005) The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome proWling for crop improvement. *In: Tuberosa, R., Phillips, R.L., Gale, M. (eds) Proceedings of the international congress "In the wake of the double helix: from the green revolution to the gene revolution"*. Bologna: Avenue Media, p. 443-461.
- Krishnaswamy, K., Raghuramulu, N. (1998) Bioactive phytochemicals with emphasis on dietary practices. *Indian Journal of Medical Research*, 108:167-181.
- 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.
- Kuleung, C., Baezinger, P.S., Dweikat, I. (2004) Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:1147-1150.
- Kun-Sheng, W., Tanksley, S.D. (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics*, 241:225-235.
- Hallauer, A.R.; Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Science*, 10:315-316.
- Hallauer, A.R. (2001) *Specialty corns*. 2. ed. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 469p.
- Hallauer, R., Carena, M.J. (2009) Maize Breeding. *In: Carena, M.J. (ed) Cereals: Handbook of Plant Breeding*. New York: Springer, p. 3-98.
- Hallauer, A.R., Carena, M.J., Miranda Filho, J.B. (2010) *Quantitative Genetics in Maize Breeding*, 3. ed. New York: Springer, 663p.

- Hazel, L.N. (1943) The genetic basis for constructing selection indices. *Genetics*, 28:476-490.
- Heath, D.D., Iwama, G.K., Devlin, R.H. (1993) PCR rimed with VNTR core sequences yields species-specific patterns and hyper variable probes. *Nucleic Acids Research*, 21:5782-5785.
- Hull, F.H. (1945) Recurrent selection and specific combining ability in corn. *Journal of the American Society of Agronomy*, 37:134-145.
- 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.
- Labate, J.A., Lamkey, K.R., Lee, M., Woodman, W.L. (1999) Temporal changes in allele frequencies in two reciprocally selected maize populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:1166-1178.
- Labate, J.A., Lamkey, K.R., Mitchell, S.H., Kresovich, S., Sullivan, H., Smich, J.S.C. (2003) Molecular and historical aspects of Corn Belt dent diversity. *Crop Science*, 43:80-91.
- Leal, A.A., Mangolin, C.A., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Scapim, C.A., Mott, A.S., Eloi, I.B.O, Cordovés, V., Silva, M.F.P. (2010) Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genetics and Molecular Research*, 9:9-18.
- Li, Y.L., Dong, Y.B., Niu, S.Z., Cui, D.Q. (2007) QTL for popping characteristics in popcorn. *Plant breeding*, 126:509-514.
- Liu, K.J., Goodman, M., Muse, S., Smith, J.S., Buckler, E., Doebley, J. (2003) Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 165:2117-2128.

- Litt, M., Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetic*, 44:398-401.
- Lonquist, J.H., Williams, N.E. (1967) Development of maize hybrids through selection among full-sib families. *Crop Science*, 7:369-370.
- Lucas, C.J., Zhao, H., Schneerman, M., Moose, S.P. (2013) Genomic Changes in Response to 110 Cycles of Selection for Seed Protein and Oil Concentration in Maize. *Seed Genomics*, 217.
- Lu, H.J., Bernardo, R., Ohm, H. (2003) Mapping QTL for popping expansion volume in popcorn with simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:423-427.
- Manarini, T. (2012) Pipoca: ela arrebenta! *Saúde é Vital*, p. 46-49.
- Mangesdorf, P.C. (1974) *Corn its origin, evolution and improvement*. Cambridge: Harvard University Press, 262p.
- Mapa. *MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA)*. Registro nacional de cultivares–RNC. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em 16 de setembro de 2016.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- Mulamba, N.N., Mock, J.J. (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 7:40-51.

- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350.
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-92.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29:294- 307.
- Oliveira, E.C., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Pena, G.F., Freitas Júnior, S.P., Ribeiro, R.M. , Pereira, M.G. (2010) Optimizing the efficiency of the touchdown technique in ISSR markers in corn (*Zea mays L.*). *Genetics and Molecular Research*, 9:835-842.
- Pacheco, C.A.P., Gama, E.P., Guimarães, P.E.O., Santos, M.X., Ferreira, A.S. (1998) Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e CMS-43 de milho de pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33:1995-2001.
- Pacheco, C.A.P., Gama, E.E.G., Parentoni, S.N., Santos, M.S., Lopes, M.A., Ferreira, A.S., Fernandes, F.T., Guimarães, P.E.O., Correa, L.A., Meirelles, W.F., Feldman, R.O., Magnavaca, R. (2000) BRS ANGELA: Variedade de milho pipoca. *Comunicado Técnico*, EMBRAPA/CNPMS, p. 1-6.
- Pacheco, C.A.P., Gama, E.E.G.E., Parentoni, S.N., Santos, M.X., Guimarães, P.E.D.O. (2005) Avanços no processo seletivo da variedade de milho pipoca BRS ANGELA. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 4:436-444.
- Paran, I., Michelmore, R.W. (1993) Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetic*, 85:985-993.

- Pashley, C.H., Ellis, J.R., McCauley, D.E., Burke, J.M. (2006) EST databases as a source for molecular markers: Lessons from the *Helianthus*. *Journal of Heredity*, 97:381-388.
- Paterniani, E. (1967) Selection among and within half-sib families in a Brazilian population of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*, 7:212-216.
- Paterniani, E., Campos, M.S. (2005) Melhoramento de milho. *In*: Borém, A. (Ed). *Melhoramento de espécies cultivadas*. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 491-552.
- Peakall, R., Smouse, P. (2009) GenAIEx Tutorials – Part 1: Introduction to Population Genetic Analysis. Australia: Australian National University.
- Pena, G.F. (2015) *Progêniees parcialmente endogâmicas no melhoramento do milho-pipoca: análise biométrica de topcrosses e divergência genética funcional por marcadores SSR-EST*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 128p.
- Pena, G.F., Amaral Junior, A.T., Ribeiro, R.M., Ramos, H.C., Boechat, M.S., Santos, J.S., Mafra, G.S., Kamphorst, S.H., Lima, V.J., Vivas, M., Souza, F.G. (2015) Inference of genetic diversity in popcorn S3 progenies. *Genetics and Molecular Research*, 15: gmr.15028456.
- Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T. (2001). Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1:3-10.
- Pereira, M.B., Vencovsky, R. (1988) Limites da seleção recorrente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 23:769-780.
- Pesek, J., Baker, R.J. (1969) Desired improvement in relation to selection indices. *Canadian Journal of Plant Science*, 49:803-804.

- Pimentel Gomes, F. (ed.) (2000) *Curso de Estatística Experimental*. Piracicaba: Degaspari, 477p.
- Pimentel Gomes, F., Garcia C.A. (eds.) (2002) *Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais*. Piracicaba: Editora FEALQ, 309p.
- Pinto, L.R., Vieira, M.L.C., Souza Júnior. C.L., Souza, A.P. (2003) Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. *Genetics and Molecular Biology*, 26:355-364.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multiloco genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Poggio, L., Gonzales, G., Confalonieri, V., Naranjo, C.A. (2005) The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and Fish-Gish cytogenetic analysis. *Cytogenetic and Genome Research*, 109:259-267.
- Rademacher, M.A.M., Hallauer, A.R., Russell, W.A. (1999) Comparative response of two reciprocal recurrent selection methods in BS21 and BS22 maize populations. *Crop Science*, 39:89-97.
- Ramalho, M.A.P., Santos, J.B., Pinto, C.A.B.P., Souza, E.A., Gonçalves, F.M.A., Souza, J.C. (2012) *Genética na Agropecuária*. 5. ed. Lavras: UFLA, 566p.
- Ramos, H.C.C., Pereira, M.G., Pereira, T.N.S., Barros, G.B.A., Ferregueti, G.A. (2014) Genetic-molecular characterization of backcross generations for sexual conversion in papaya (*Carica papaya* L.). *Genetics and molecular research*, 13:10367-10381.
- Ramu, P., Billot, C., Rami, J.F., Senthilvel, S., Upadhyaya, H.D., Ananda, R. L., Hash, C.T. (2013) Assessment of genetic diversity in the sorghum reference

set using EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 126:2051-2064.

Rangel, R.M., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Freitas Júnior, S.P., Candido, L.S. (2011) Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. *Revista Ciência Agronômica*, 42:473-481.

R Core Team. (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ribaut, J.M., Jiang, C., Gonzalez-de-Leon, D., Edmeades, G.O., Hoisington, D.A. (1997) Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theoretical and Applied Genetics*, 94:887-896.

Ribeiro, E.H., Pereira, M.G., Coelho, K.S., Freitas Júnior, S.P. (2009) Estimativas de parâmetros genéticos e seleção de linhagens endogâmicas recombinantes. *Revista Ceres*, 56:580-590.

Ribeiro, R.M., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves L.S.A., Cândido, L.S., Silva, T.R.C., Pena, G.F. (2012) Genetic progress in the UNB-2U population of popcorn under recurrent selection in Rio de Janeiro. *Genetics and Molecular Research*, 11:1417-1423.

Ribeiro R.M., Amaral Júnior, A.T., Pena, G.F., Vivas, M., Kurosawa, R.F.N., Goncalves, L.S.A. (2016) Effect of recurrent selection on the variability of the UENF-14 popcorn population. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16:123-131.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.

- Santos, F.S., Amaral Junior, A.T., Freitas Junior, S.P., Rangel, R.M., Pereira, M.G. (2007) Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. *Bragantia*, 66:389-396.
- Sarcevic, H., Pejic, I., Baric, M., Kozumplik, V. (2007) Originality of M3S maize population and changes in allele frequencies revealed by SSR markers after two cycles of selfed progeny recurrent selection. *Euphytica*, 161:97-105.
- Sawazaki, E., Morais, J.F. de Lago, A.A (1986). Influência do tamanho e umidade do grão na expansão da pipoca South American Mushroom. *Bragantia*, 45:363-370.
- Sawazaki, E. (2001) A cultura do milho pipoca no Brasil. *O Agrônomo*, 53:11-13.
- Scapim, C.A., Pacheco, C.A.P., Tonet, A., Braccini, A.L., Pinto, R.J.B. (2002) Análise dialélica e heterose de populações de milho pipoca. *Bragantia*, 61:219-230.
- Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5:63-69.
- Schulman, A.H. (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158:313-321.
- Silva, V.Q.R., Amaral Junior, A.T., Scapim, C. A., Freitas Júnior, S.P., Goncalves, L.S.A. (2010) Inheritance for Economically Important Traits in Popcorn from Distinct Heterotic Groups by Hayman's Diallel. *Cereal Research Communications*, 38:273-285.
- Smith, H.F. (1936) A discriminant function for plant selection. *Annals of Eugenics*, 7:240-250.

- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, 11:33-40.
- Soller, M., Beckmann, J.S. (1983) Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 67:25-33.
- Solomon, K.F., Martin, I., Zeppa, A. (2010) Temporal genetic structure patterns in tropical maize populations under reciprocal recurrent selection. *Euphytica*, 176:239-249.
- Souza Júnior, C.L.D., Geraldi, I.O., Vencovsky, R. (2000) Response to recurrent selection under small effective population size. *Genetics and Molecular Biology*, 23:841-846.
- Stephan, W., Langley, C.H. (1992) Evolutionary consequences of DNA mismatch inhibited repair opportunity. *Genetics*, 136:333-341.
- Sudré, C.P., Leonardecz, E., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Moura, M.C.L., Gonçalves, L.S.A. (2007) Genetic resources of vegetable crops: a survey in the Brazilian germplasm collections pictured through papers published in the journals of the Brazilian Society for Horticultural Science. *Horticultura Brasileira*, 25:496-503.
- Sun, X., Du, Z., Ren, J., Amombo, E., Hu, T., Fu, J. (2015) Association of SSR markers with functional traits from heat stress in diverse tall fescue accessions. *Plant Biology*, 15:1-13.
- Sweley, J.C., Rose, D.J., Jackson, D.S. (2013) Quality Traits and Popping performance Considerations for Popcorn (*Zea mays* Everta). *Food Reviews International*, 29:157-177.
- Tang, J., Gao, L., Cao, Y., Jia, J. (2006) Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. *Euphytica*, 151: 87-93.

- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17:6463-6471.
- Tenaillon, M.J., U'Ren, J., Tenaillon, O., Gaut, B.S. (2004) Selection versus demography: a multilocus investigation of the domestication process in maize. *Molecular Biology and Evolution*, 21:1214-1225.
- Trindade, A.P.R., Pinto, R.J.B., Amaral Junior, A.T., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P.S., Scapim, C.A. (2010) Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13:1-9.
- Varshney, R.K., Grander, A., Sorrels, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23:48-55.
- Vilarinho, A.A., Viana, J.M.S., Câmara, T.M.M., Santos, J.F. (2002) Seleção de progênes endogâmicas S1 e S2 em um programa de melhoramento intrapopulacional de milho pipoca. *Acta Scientiarum Agronomy*, 24:1419-1425.
- Vilela, F.O., Amaral Junior, A.T., Pereira, M.G., Scapim, C.A., Viana, A.P., Freitas Junior, S.P.F. (2008) Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. *Acta Scientiarum Agronomy*, 30:25-30.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414.
- Wang, R.L., Steca, J., Lukens, L., Doebley, J. (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398:236-239.
- Weatherwax, P. (1922) The popping of corn. *Proceedings of the Indiana Academy Science*, 31:149-153.
- Weatherwax, P. (1954) *Indian corn in old America*. New York: The MacMilan Co, 253p.

- Weber, J.L., May, P.E. (1989) An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal Human Genetics*, 44:388-396.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Willians, J.S. (1962) The evaluation of a selection index. *Biometrics*, 18:375–393.
- Willier, J.G., Brunson, A.M. (1927) Factors affecting the popping quality of pop Corn. *Journal of Agricultural Research*, 35:615-624.
- Wright, S. (1978) Evolution and the genetics of populations: variability within and among populations. Chicago: University of Chicago Press, 590p.
- Yu, K., Park, S.J., Poysa, V. (1999) Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in bean (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome*, 42:27-34.
- Yu, Y.G., Shagai Maroof, M.A., Buss, G.R., Maughan, P.J., Tolin, S.A. (1994) RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopatology*, 84:60-64.
- 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: e94881.
- Zeigler, K.E. (2001) Popcorn. *In: Hallauer, A.R. Specialty Corns*. 2. ed. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, p. 199-234.
- Ziegler, K.E., Ashman, B. (1994) Popcorn. *In: Hallauer, A.R. (ed.), Specialty Corns*. New York: CRC Press, p. 189-223.

- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.
- Zinsly, J.R., Machado, J.A. (1987) Milho-pipoca. *In*: Paterniani, E., Viegas, G.P. (Ed.). *Melhoramento e Produção de Milho*. 2. ed. Piracicaba: Fundação Cargil, 413-421.
- Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., Schoemaker, C. (2005) Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiology*, 137:1189-1196.