

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

ANA PAULA CANDIDO GABRIEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2006

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

**ANA PAULA CANDIDO GABRIEL**

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2006

## AGRADECIMENTOS:

A Deus e a Nossa Senhora por todas as graças e proteção;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF – e ao curso de Produção Vegetal pelo bom curso oferecido e pela oportunidade de trabalho;

Ao CNPq pela concessão bolsa;

À FAPERJ, pelo financiamento do projeto;

Aos meus pais, por todo entusiasmo, dedicação e ensinamentos;

A minha vovó Lídia por toda ajuda e incentivo;

A minha irmã Mariana, que teve que superar minhas ausências em suas travessuras;

A uma pessoa muito especial, Sávio, por ter me incentivado a sair de uma pequena cidade do interior para o grande mundo da ciência e também por todo seu carinho, ajuda e companheirismo durante a minha vida acadêmica e científica. Sem a sua ajuda não teria alcançado esta vitória;

A professora Telma pelos ensinamentos, amizade e pela pessoa bacana que é;

Ao professor Gonçalo pela visão prática da biologia molecular e valiosas contribuições e sugestões para realização deste trabalho;

Aos professores do LMGV, em especial ao professor Alexandre Pio Viana pelas sugestões e ao professor Antônio Teixeira do Amaral Junior por todo apoio e pelas excelentes aulas de melhoramento genético vegetal;

Aos amigos e técnicos do LMGV: Rogério Daher (agora professor Rogério!) e Vitória, pelas valiosas ajudas, também aos bolsistas, em especial ao Wellington.

Em especial ao técnico agrícola Geraldo, muito obrigado pela sua dedicação e amizade, e também ao Eng<sup>o</sup>. Agro. Paulo Rogério pelo empenho durante os experimentos;

As técnicas do GENOMA-UENF, Valéria e Verônica, por toda ajuda e apoio;

As funcionárias da biblioteca do CCTA por toda ajuda e amizade;

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do CCTA: Fátima, Patrícia, Luciana e Daniel, sempre prontos a nos ajudar;

Aos especiais amigos Luciléa e Ramom, companheiros inseparáveis na luta quase diária no campo e nas disciplinas;

Aos alunos de pós-graduação do LMGV: Carol, Silvério, Fabrício (Baiano), Felipe (bagunceiro e gordo), Francisco (sonso), Francisco (222), Gustavo, Máskio, Edemir, Karina, Fabiane, Érica, Elaine, Yoná, Flávio, Carlos Ide, Elaine, Felipe magro.

A Keila, não só bolsista de IC, mas também amiga e companheira, sua ajuda foi de grande valia;

Ao professor Messias, não só pela brilhante orientação, mas por toda a atenção, apoio, respeito e dedicação dispensados a mim e ao trabalho e pelo exemplo de profissional que é;

A Patrícia Bordallo, grande culpada de tudo, obrigada pela confiança, ensinamentos e apoio;

Ao professor Salassier Bernado e sua esposa Elizabete, por toda a amizade, confiança e incentivo.

As amigas e companheiras de república Nélia Paula, Viviane, Janine e Elba (que não é a Ramalho), pelo maravilhoso convívio, companheirismo e amizade.

## SUMÁRIO

### 1. INTRODUÇÃO

### 2. OBJETIVOS

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A Cultura do milho

##### 3.1.1. Origem e classificação botânica

##### 3.1.2. Importância econômica

##### 3.1.3 Genética e melhoramento do milho

#### 3.2. Heterose

##### 3.2.1. Heterose em milho

#### 3.3. Variabilidade genética

##### 3.3.1. Variabilidade genética em milho

#### 3.4. Seleção recorrente

##### 3.4.1. Seleção recorrente recíproca

##### 3.4.2. Seleção recorrente recíproca em milho

#### 3.5. Marcadores moleculares

#### 3.6. Marcadores moleculares na seleção recorrente em milho

#### 3.7. Índice de seleção

### 4. TRABALHOS

#### 4.1. Estimação de parâmetros genéticos nas populações de milho CIMMYT x Piranão no 10<sup>o</sup> ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos

##### 4.1.1. RESUMO

##### 4.1.2. ABSTRACT

##### 4.1.3. INTRODUÇÃO

##### 4.1.4. MATERIAL E MÉTODO

###### 4.1.4.1. Material genético

- 4.1.4.2. Obtenção das famílias
- 4.1.4.3. Avaliação das progênes de irmãos completos
- 4.1.4.4. Análise estatística
- 4.1.4.5. Análise de variância
- 4.1.4.6. Parâmetros genéticos
- 4.1.4.7. Estimacão das correlacões entre pares de característias
- 4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
- 4.1.6. RESUMO E CONCLUSÕES
- 4.1.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- 4.2. Utilizacão de Índices de Seleção Estratificado aplicados em um programa de seleçao recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays L.*)
  - 4.2.1. RESUMO
  - 4.2.2. ABSTRACT
  - 4.2.3. INTRODUÇÃO
  - 4.2.4. MATERIAL E MÉTODO
    - 4.2.4.1. Material genético
    - 4.2.4.2. Obtenção das famílias
    - 4.2.4.3. Avaliação das progênes de irmãos completos
    - 4.2.4.4. Análise estatística
      - 4.2.4.4.1. Análise de variância
      - 4.2.4.5. Identificacão das progênes superiores
      - 4.2.4.6. Índices de seleçao
        - 4.2.4.6.1. Índice de Seleção de Smith (1936) e Hazel (1943)
        - 4.2.4.6.2. Índice baseado em soma de postos
        - 4.2.4.6.3. Índice de Williams
      - 4.2.4.7. Seleção direta
  - 4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
  - 4.2.6. RESUMO E CONCLUSÕES
  - 4.2.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- 4.3. Estudo da divergência genética via AFLP entre duas populações de milho no 10º ciclo de seleçao recorrente recíproca em famílias de irmãos completos
  - 4.3.1. RESUMO

4.3.2. ABSTRACT

4.3.3. INTRODUÇÃO

4.3.4. MATERIAL E MÉTODO

4.3.4.1. Material genético

4.3.4.2. Avaliação da diversidade genética (marcadores de DNA)

4.3.4.3. Extração do DNA

4.3.4.4. Análise molecular via AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados

4.3.4.4.1. Digestão do DNA genômico e ligação de adaptadores

4.3.4.4.2. Amplificação pré-seletiva

4.3.4.4.3 Amplificação seletiva

4.3.4.4.4. Resolução dos fragmentos em gel de poliacrilamida

4.3.4.5. Análise dos dados

4.3.4.6. Métodos de agrupamento

4.3.4.7 Recombinação das progênies selecionadas

4.3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.6. RESUMO E CONCLUSÕES

4.3.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. RESUMO E CONCLUÕES

6. REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS

## RESUMO

GABRIEL, Ana Paula Candido, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, fevereiro de 2006, Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.) assistida por marcadores moleculares. Orientador: Messias Gonzaga Pereira.

Um dos procedimentos mais efetivos no melhoramento de plantas é a seleção recorrente, neste sentido a UENF vem conduzindo um programa de melhoramento de milho que já se encontra no 10º Ciclo de seleção recorrente recíproca. Considerando que cada ciclo de seleção recorrente envolve basicamente três etapas: 1- desenvolvimento de progênies; 2- avaliação e seleção das progênies; e 3- recombinação das progênies superiores, é importante que as progênies selecionadas e, portanto, a serem recombinadas, sejam suficientemente divergentes. Isso é importante para que o processo de recombinação restabeleça a variabilidade genética, assegurando a continuidade dos próximos ciclos. A identificação dos genitores a serem recombinados pode ser feita em duas etapas: a primeira constituída pelo ensaio de competição e a segunda, constituída pelo uso de marcadores de DNA. Assim, os progenitores da população a serem recombinados serão superiores, portadores de maior frequência de alelos favoráveis e divergentes o suficiente para a manutenção da variabilidade genética e maior exploração da heterose durante a condução de seleção recorrente. Para tanto, avaliou-se 100 famílias de irmãos completos em dois ambientes, Campos e Itaocara, e estimou-se as médias, a variabilidade genética, os parâmetros genéticos e também as correlações genéticas das



populações CIMMYT e Piranão, as quais deram origem aos irmãos completos. A etapa de seleção foi potencializada pela utilização do índice de seleção de Smith e Hazel estratificado, que selecionou as 40 famílias consideradas superiores. Tais famílias foram submetidas à genotipagem via marcadores AFLP, para que se pudesse avaliar a distância genética dos genótipos a serem recombinados. A análise de variância demonstrou uma significativa variabilidade genética nas populações, e ainda indicou que há possibilidade de recomendação simultânea de genótipos superiores para ambos os locais, e para a maioria dos pares de caracteres, verificou-se a existência de correlações positivas e favoráveis. A análise molecular das populações CIMMYT e Piranão indicou que, mesmo após 10 ciclos de seleção recorrente, ambas as populações possuem variabilidade genética intra e interpopulacional expressiva para a continuidade do programa e ainda possibilitou indicar que o marcador do tipo AFLP mostrou-se uma técnica eficiente para estudos de diversidade e na alocação dos genótipos nos seus devidos grupos heteróticos.

## ABSTRACT

GABRIEL, Ana Paula Candido, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February 2006, Reciprocal recurrent selection in full sibs families in corn (*Zea mays* L.) attended by molecular markers. Advisor: Messias Gonzaga Pereira.

One of the most effective procedures in the improvement of plants is the appealing selection, in this sense UENF is driving a program of corn improvement that already meets in the 10th Cycle of reciprocal appealing selection. Considering that each cycle of recurrent selection involves three stages basically: 1 - development of progenies; 2 - evaluation and selection of the progenies; and 3 - recombination of the superior progenies, is important that the selected progenies and, therefore, the they be recombinads, be sufficiently divergent. That is important so that the recombination process reestablishes the genetic variability, assuring the continuity of the next cycles. The identification of the genitors they be recombinados can be done in two stages: the first constituted by the competition rehearsal and the second, constituted by the use of markers of DNA. Like this, the progenitors they be recombinads will be superior, bearers adult frequency of favorable and divergent alelos enough for the maintenance of the genetic variability and larger exploration of the heterosis during the transport of appealing selection. For so much, it was evaluated 100 full sib families in two environment,

Campos and Itaocara, and was considered the averages, the genetic variability, the parameters genetic and also the genetic correlations of the populations CIMMYT and Piranão, which created the complete siblings. The selection stage was potentiated by the use of the index of selection of stratified Smith and Hazel, that it selected the 40 families considered superiors. Such families were submitted to the molecular analysis through markers AFLP, so that it could evaluate the genetic distance of the genotypes the they be recombinades. The variance analysis demonstrated a significant genetic variability in the populations, and it still indicated that there is possibility of simultaneous recommendation of superior genotypes to both places, and for most of the pairs of characters, the existence of positive and favorable correlations was verified. The molecular analysis of the populations CIMMYT and Piranão indicated that, even after 10 cycles of appealing selection, both populations possess expressive genetic variability intra and interpopulacional for the continuity of the program, and it still indicated that AFLP was shown an efficient technique for diversity studies and in the allocation of the genotypes in their owed heterotics groups.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho é extremamente rica em conhecimentos técnico-científicos, possuindo grande valor econômico e bom potencial para gerar renda a muitas famílias, principalmente a pequenos produtores. Em especial nas pequenas propriedades rurais do país, a cultura do milho é de grande importância, pois viabiliza o sistema produtivo pela agregação de valores ao produto e pela função do milho na alimentação humana e animal (Miranda, 2003).

O Brasil é o terceiro produtor mundial da cultura, a qual é plantada em todo território nacional, embora, seja na região Centro-Sul do país que se encontra a maior produção deste grão; cerca de 95% (CONAB, 2003).

Tal cultura tem sido o alimento de sustentação da população mundial (Von Pinho, 2003) e o melhoramento genético tem contribuído em larga escala para o aumento da produtividade das espécies e com o milho não é diferente, principalmente pelo fato desta cultura possuir características ideais para este propósito: ciclo de reprodução curto, planta alógama, mas que suporta a autofecundação, monoícia, fácil controle de polinização, dentre outras (Bull, 1993).

Dentre os vários métodos de melhoramento genético a Seleção Recorrente Recíproca se destaca, uma vez que é um método desenvolvido para aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis por meio de

repetidos ciclos de seleção em duas populações simultaneamente, e ainda sem perder a variabilidade genética de ambas as populações (Pinto, 1995).

A tendência geral dos programas de melhoramento genético é a integração das técnicas clássicas com aquelas mais modernas da biotecnologia. Deste modo, a tecnologia dos marcadores moleculares pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado e ainda para a obtenção de espécies melhoradas (Ferreira e Gratapaglia, 1998).

Propõe-se então a tecnologia de marcadores moleculares, que permite acessar e selecionar a variabilidade a nível de DNA, tendo portanto várias aplicações no melhoramento genético.

Considerando que cada ciclo de seleção recorrente envolve basicamente três etapas: 1- desenvolvimento de progênies; 2- avaliação e seleção das progênies; e 3- recombinação das progênies superiores, é fundamental que as progênies selecionadas e, portanto, a serem recombinadas, sejam suficientemente divergentes. Isso é importante para que o processo de recombinação restabeleça a variabilidade genética, assegurando a continuidade dos próximos ciclos.

Na etapa de seleção é que se propõe o uso dos marcadores de DNA. Os mesmos serão utilizados para avaliar a diversidade dos progenitores, identificados como superiores, na avaliação clássica.

A identificação dos genitores a serem recombinados pode ser feita em duas etapas: a primeira constituída pelo ensaio de competição e a segunda, constituída pelo uso dos marcadores de DNA. Assim, os progenitores a serem recombinados serão superiores, portadores de maior frequência de alelos favoráveis e divergentes o suficiente para a manutenção da variabilidade genética e maior exploração da heterose durante a condução de ciclos de seleção recorrente.

## 2. OBJETIVOS

- 1- Conduzir o 10<sup>o</sup> ciclo de Seleção Recorrente Recíproca e melhorar simultaneamente as populações de milho CIMMYT e Piranão;
- 2-Desenvolver novas cultivares híbridas de milho (híbridos interpopulacionais;
- 3- desenvolver linhagens derivadas das populações melhoradas;
- 4- Incrementar o ganho genético por ciclo de seleção recorrente;
- 5- Estudar a divergência genética intra e interpopulacional dos genótipos superiores.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A cultura do milho

##### 3.1.1. Origem e classificação botânica

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

O milho é uma das culturas mais antigas do Continente Americano tendo sido originado no México (Hallauer, 1985), sendo, portanto um cereal essencialmente americano, uma vez que é nesse Continente que se encontram seus parentes silvestres mais próximos: o teosinte e o tripsacum. E ainda pelo fato de até hoje não terem sido encontrados nenhuma evidência, como por exemplo, fósseis, em nenhum outro local do mundo a não ser no Continente Americano (Bull, 1993).

São três as hipóteses mais discutidas em relação a origem do milho: Weatherwax, propôs em 1954, que o milho, o tripsacum e o teosinte são descendentes de um ancestral comum. A segunda hipótese defendida por Longley, Beadle (1977, 1978) e Galinat (1973, 1977) é que o milho é derivado do teosinte, A terceira hipótese é defendida por Mangelsdorf, em 1974, que sugere ao contrário, ou seja, que o teosinte tenha sido originário do milho.

Goloubinoff et al. (1993) sugerem que o milho moderno é o resultado da domesticação de diversos genomas do teosinte. Segundo este autor, isto pode ter ocorrido através de alguns eventos de domesticação, ou por um único evento de

domesticação, seguido por repetidas introgressões com espécies do teosinte, ou pela domesticação a partir de uma população de teosinte bem diversificada.

De acordo com Dobley et al. (1990) em termos de arquitetura da planta, o milho e o teosinte são bem diferentes um do outro. Segundo ele, essa diferença fenotípica vem de uma ampla divergência genética entre as duas espécies. No entanto, milho e teosinte possuem o mesmo número de cromossomos ( $n = 10$ ), os quais são homólogos, cruzando-se facilmente e gerando descendentes férteis (Paterniani e Campos, 1999).

### 3.1.2. Importância econômica

No passado, o cultivo de milho era relacionado à subsistência. Hoje, a produção desse cereal está voltada a cultivos comerciais baseados na utilização de tecnologias modernas, de forma que esse produto conseguiu se destacar entre as demais culturas, revelando uma importância econômica e social inquestionável (Souza e Braga, 2004).

Sendo uma das plantas mais eficientes na conversão de energia solar em alimentos, o milho participa como matéria – prima em vários produtos, e ainda é o cereal mais consumido no mundo, pois embora ele seja de origem tropical, pode ser cultivado em praticamente todas as latitudes (Miranda, 2003).

O milho tem sido o alimento de sustentação do crescimento mundial da população, sendo considerado juntamente com o arroz e o trigo as três principais culturas de cereais do mundo. Entretanto, o milho tem mostrado números crescentes de produção, que chegam a avançar 30 milhões de toneladas por ano, enquanto o arroz e o trigo seguem com pequena estabilidade (Von Pinho, 2003).

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil, com uma produção média nos últimos dois anos, de 34,8 milhões de toneladas, correspondendo a aproximadamente 40% do total de grãos produzidos, ocupando uma área de cerca de 13 milhões de hectares sendo superado apenas pela soja (CONAB, 2005).

Grande parte da explicação para o crescimento da produção do milho decorre do melhoramento genético de um passado recente. Considerando que Colombo há 509 anos atrás, verificou a existência de milho na costa Norte de



Cuba, o qual era um capim que produzia espigas com 5 a 10 grãos, porém através de trabalhos de melhoramento, a partir desta planta, o homem conseguiu que hoje seja possível produzir espigas com cerca de 1000 grãos (Von Pinho, 2003).

### 3.1.3. Genética e melhoramento do milho

A agricultura se originou da domesticação de plantas e animais e começou em vários locais simultaneamente há cerca de dez mil anos atrás, promovendo uma mudança notável na maneira como o homem obtinha seu alimento. O homem domesticou somente cerca de cem a duzentas, de milhares de espécies vegetais (Pinto, 1995).

O milho é uma planta panmítica, e mesmo sendo monóica é uma planta alógama com praticamente 100% de reprodução cruzada, mas que também suporta autofecundação (Borém, 1999).

Em especial com a cultura do milho, o melhoramento tem sido responsável por incrementos espetaculares de rendimento, principalmente pela exploração do fenômeno da heterose, fator este, bastante expressivo nas plantas alógamas (Silva, 2003).

De acordo com Borém (2001), o Brasil foi o segundo país a utilizar híbridos, comercialmente, o que causou um aumento de 75% na produtividade de grãos em relação a cultivares utilizadas anteriormente. O país vem ocupando o 3º lugar na produção mundial de milho com produtividade média de 2,5 t/ha de milho (CONAB, 2003).

Além de incrementar o rendimento da cultura, a obtenção de plantas de milho de porte baixo, mantendo-se as demais características de vigor e produtividade, tem sido uma preocupação para os melhoristas, pois variedades braquíticas ( $br_2br_2$ ), apresentam boa resistência ao acamamento e quebramento das plantas, além de melhor adaptação à colheita mecanizada (Santos, 1991).

Tal característica deve ser visada principalmente em programas de melhoramento para regiões onde há predominância de clima quente e ocorrência de ventos fortes, o que favorece o aumento na proporção de plantas acamadas e, ou quebradas, prejudicando a colheita mecanizada (Daros et al., 2004).

Para a obtenção de novas cultivares, por meio da seleção, o melhorista tenta identificar os indivíduos geneticamente superiores ou mais adaptados. A seleção, por sua vez, é mais efetiva quando age sobre caracteres de alta herdabilidade e que tenham alguma associação com a produção ou outro caráter de importância econômica. Daí a relevância de se realizarem trabalhos no sentido

de estimar parâmetros genéticos como herdabilidade, correlação e ganhos genéticos (Pereira, 1985).

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

### 3.2. Heterose

O sucesso dos programas de melhoramento depende da eficiência de linhagens, que quando cruzadas, produzam híbridos superiores, de modo que o uso de linhagens pertencentes a grupo heteróticos distintos evita a obtenção e a avaliação de cruzamentos pouco promissores, pois desta forma pode-se explorar a heterose (Borém, 2001).

O termo heterose foi empregado por Shull, em 1909, para expressar os efeitos benéficos da hibridação, ou seja, o maior vigor da geração  $F_1$  em relação a média dos pais ou do melhor pai (Pinto, 1995).

Do ponto de vista biométrico, a heterose ( $h$ ) em relação a média dos pais é expressa por:  $h = \sum_{i=1}^n (p_i - r_i)^2 \cdot d_i$ , onde  $p$  e  $r$  são freqüências dos alelos favoráveis de um mesmo loco, em duas populações, respectivamente, e  $d$  é o efeito da dominância. Em suma, a heterose é uma função direta do somatório do produto do quadrado da distância genética com os respectivos desvios de dominância (Hallauer e Miranda Filho, 1988). Percebe-se pela fórmula da heterose que fica fácil entender o porquê da heterose ser diretamente relacionada com a divergência genética (diferenças de freqüências gênicas) entre duas populações (Falconer, 1987).

Em linhas gerais, a heterose é o aumento do vigor híbrido, da altura da planta, do conteúdo de carboidrato, da produtividade e de outros fenômenos fisiológicos decorrentes do cruzamento de indivíduos contrastantes (Amaral Júnior e Thièbaut, 1999).

A base genética da heterose não está totalmente elucidada, mas estudos têm revelado que quanto maiores os contrastes genéticos entre os genitores escolhidos para as hibridações, maiores são as chances de aparecerem efeitos heteróticos nos descendentes (Ronzelli Júnior, 1996).

Níveis altos de heterose têm sido observados para produção em cruzamentos entre diferentes populações de milho: Hallauer e Miranda Filho (1995) obtiveram como resultado do cruzamento entre 1394 variedades de milho uma taxa de heterose que variou de 4,2 a 72,0%. Paterniani e Lonquist (1963) também obtiveram heterose variando de -11,0% a 101% no cruzamento entre 10 raças brasileiras de milho.

Silva e Miranda (2003) trabalhando em esquema de cruzamento dialélico para a variável peso de espiga, encontraram os efeitos de heterose total variando de -4,3 a 17,3% em relação a média dos pais, com heterose média de 3,37%.

Hallauer e Miranda Filho (1988) relacionam uma série de trabalhos com seleção inter e intrapopulacional e suas respectivas alterações na heterose via seleção. Em alguns trabalhos de seleção recorrente recíproca, a seleção fez com que a heterose diminuísse (Gevers, 1974; Hallauer, 1977) e em outros, aumentasse (Eberhart et al., 1973; Gevers, 1974; Paterniani e Vencovsky, 1977).

Na cultura do milho, a idéia sugerida por Shull para obtenção de linhas puras e sua utilização na produção de sementes híbridas expressando a heterose é válida até hoje (Gomes, 1999).

### 3.2.1. Heterose em milho

A introdução do milho híbrido na década de 1920 constitui-se em um dos maiores impulsos à agricultura moderna. O progresso do milho híbrido aliado a melhoria das práticas culturais contribuiu e contribui cada vez mais para o aumento não só da produtividade mas também da qualidade da cultura (Borém, 1999).

O uso do vigor híbrido ou heterose é sem dúvida um exemplo marcante e favorável na genética aplicada, que foi primeiramente desenvolvido com o milho, e depois estendido a outras culturas (Gomes, 1999).

O milho encaixa-se de forma quase perfeita entre as espécies para as quais a hibridação é recomendada como método de melhoramento, dada a relativa facilidade de produção de sementes e de se obter níveis heteróticos apreciáveis (Borém, 1999).

Estabelecer e melhorar novos grupos heteróticos pode ser de grande ajuda para melhorar o desempenho agrônomico e sua adaptação a novas regiões de produção, pois o sucesso do desempenho dos híbridos de milho é resultado do efeito heterótico alcançado pelo cruzamento de linhagens que possuem boa capacidade combinatória (Gomes, 1999).

### 3.3. Variabilidade genética

O avanço genético pode ser alcançado a partir do momento em que existe variabilidade genética, e que o efeito ambiental não mascare por completo esta variabilidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

De acordo com Tardin (2001) a divergência genética pode ser definida como a amplitude de variação genética existente para uma determinada espécie. Sendo assim, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e diversidade genética das espécies para uma obtenção eficiente do material genético a ser utilizado em programas de melhoramento, pois sem o conhecimento da variabilidade e da sua interação com o ambiente fica difícil a obtenção de genótipos superiores (Milach, 1998).

Atualmente, a grande importância dos estudos de divergência genética está no conhecimento do grau de variabilidade genética das populações, em função da preocupação que ocorre com a erosão genética, que diminui a variabilidade genética das populações, decorrente da substituição das antigas variedades por formas genotípicas uniformes (Amaral e Thiébaud, 1999).

As análises de divergência visam à identificação de genitores para a formação de populações com variabilidade e conseqüente ganho genético em ciclos sucessivos de seleção. E por estar associada à heterose, as análises de divergência podem ser úteis para a predição preliminar de cruzamentos que

aperfeiçoem tal fenômeno. Segundo Falconer (1987), a divergência genética expressa a diferença existente nas frequências alélicas da população.

Vários métodos são utilizados para quantificar a divergência genética, como, por exemplo, as análises multivariadas e as análises moleculares, mas de acordo com Cruz e Regazzi (2001), a escolha do método depende da precisão desejada pelo pesquisador, da facilidade de análise e da forma como os dados são obtidos.

A escolha adequada de genitores pode ser baseada em informações de relacionamento genético estimado por marcadores, que permite um estudo seguro de divergência genética (Milach, 1998).

### 3.3.1. Variabilidade Genética em milho

Além da diversidade explorada entre as espécies, existe também a variabilidade dentro de cada espécie, que pode ser de caráter genético ou ambiental (Borém, 2001).

O milho possui uma enorme variabilidade genética disponível, mas que ainda necessita de uma adequada avaliação e estudos para sua efetiva utilização no melhoramento (Paterniani, 1980).

O conhecimento da variabilidade genética entre os materiais do programa de melhoramento proporciona com maior segurança o trabalho com grupos heteróticos (Padilha, 2002), que de acordo com Hallauer podem ser definidos como: “germoplasmas que, quando avaliados em combinações híbridas exibem superioridade consistente, geralmente resultante da heterose,” a qual depende diretamente da variabilidade genética. (Hallauer e Miranda Filho, 1988).

Pinto et al. (2002) trabalhando com 18 linhagens obtidas por meio de seleção recorrente recíproca entre duas populações de milho tropical para fazer uma comparação entre divergência genética molecular e capacidade específica de combinação chegaram à conclusão de que, em média, a produção dos híbridos simples entre grupos ( $6,86 \text{ tha}^{-1}$ ) foi significativamente maior que a dos híbridos simples dentro dos grupos ( $5,46 \text{ tha}^{-1}$ ).

No Brasil um dos padrões heteróticos mais explorados em programas de melhoramento de milho tem sido o cruzamento entre materiais de endosperma do tipo dentado com materiais de endosperma do tipo duro (Padilha, 2002).

### 3.4. Seleção recorrente

A taxa de elevação das frequências gênicas favoráveis como efeito da seleção depende de muitos fatores, entre os quais podem-se mencionar: a variabilidade genética, o método de seleção empregado, o tamanho da população, a influência do ambiente e outros (Paterniani, 1980).

Segundo Linares (1987) os pesquisadores East e Jones (1919) e Hayes e Garber (1919) foram os pioneiros em sugerir o inter cruzamento entre indivíduos selecionados como um método para concentrar genes com efeitos desejáveis.

No entanto a seleção recorrente foi primeiramente empregada por Hull em 1945, como sendo uma re-seleção, geração após geração, com inter cruzamento entre os tipos selecionados, para obter a recombinação gênica, de modo que se pode elevar a frequência de alelos favoráveis e manter a endogamia a baixo nível, a ponto de assegurar um alto grau de variabilidade genética (Pinto, 1995).

A seleção recorrente é um método cíclico de seleção de genótipos de uma população que envolve 3 etapas: obtenção de progênies, avaliação das progênies e recombinação das progênies selecionadas. Com este método, a cada ciclo de seleção recorrente ocorre uma maior concentração de alelos favoráveis nas populações trabalhadas, com o conseqüente aumento da média populacional (Hallauer e Miranda Filho, 1988).

De acordo com Borém (2001) a população inicial à qual será aplicada a seleção recorrente, pode ser uma variedade de polinização aberta, variedade sintética, híbrido ou clone, mas é de fundamental importância que tais populações possuam um elevado comportamento médio e variabilidade genética suficiente para assegurar um progresso contínuo durante os ciclos de seleção.

#### 3.4.1. Seleção Recorrente Recíproca

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

Com a seleção recorrente recíproca, teoricamente, se tira vantagem tanto dos efeitos aditivos por meio da concentração dos alelos favoráveis em ambas as populações, bem como dos desvios de dominância, uma vez que se mantém a

distância entre as populações permitindo explorar o fenômeno da heterose por meio do cruzamento entre as populações e/ou de linhagens oriundas das mesmas (Santos, 2003).

Neste método os genótipos que apresentarem melhor capacidade de combinação com a população recíproca são recombinados entre si, assim pode-se avaliar tanto a capacidade geral quanto a capacidade específica de combinação, aumentando a resposta heterótica entre as duas populações (Pinto, 1995).

Segundo Hallauer e Miranda Filho (1988), o sucesso da seleção recorrente recíproca depende da complexidade da característica sob seleção, da técnica experimental de avaliação das progênes e do efeito ambiente. Isso significa que pode ocorrer melhoria para a maioria das características, no entanto, algumas apresentam maior expectativa de ganhos do que outras.

De acordo com Santos (1991), o método de melhoramento de seleção recorrente recíproca com base em famílias de irmãos completos parece ser uma boa opção para a cultura do milho, pois, ao final do processo, pode-se optar por utilizar populações melhoradas para a obtenção de linhagens ou para a formação de um híbrido intervarietal entre tais populações.

#### 3.4.2. Seleção Recorrente Recíproca em milho

Dentre os métodos de melhoramento aplicáveis à cultura do milho, merece destaque o procedimento denominado seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos, proposto por Hallauer e Ebehart (1970).

Esta metodologia permite, ao mesmo tempo, assegurar ganhos genéticos diretos (nas populações per si) e indiretos (nas populações em cruzamento). Tal método consiste em se cruzar plantas  $S_0$  aos pares (plantas da população A com plantas da população B), autofecundando-se simultaneamente os indivíduos selecionados. Para tanto há necessidade de que as plantas selecionadas sejam prolíficas (Hallauer e Miranda Filho, 1981).

Em milho, usualmente procede-se a autofecundação da segunda espiga de cada uma das plantas. A primeira espiga (superior) de cada planta é fecundada com pólen de outra planta (Paterniani, 1999). As sementes dessas espigas correspondem às progênes de irmãos completos (A x B), que são



avaliados em ensaios de competição, os quais permitem identificar as combinações (progênies) mais promissoras.

Cada ciclo se completa quando as progênies  $S_1$  de cada população, correspondentes aos melhores cruzamentos, são recombinadas em lote isolado, produzindo assim as populações melhoradas  $A_1$  e  $B_1$ .

O método apresenta a vantagem de possibilitar o desenvolvimento simultâneo de híbridos de linhagens, tornando-se então um método combinado de múltiplos propósitos (Paterniani e Miranda Filho, 1981). Assim depois de avaliadas as progênies de irmãos completos, as sementes  $S_1$  correspondentes às melhores progênies são plantadas, efetuando-se a autofecundação das plantas envolvidas nos cruzamentos, gerando, após algumas gerações de autofecundação, linhagens potenciais para híbridos de alta produção.

Dentre os métodos interpopulacionais, Borém (2001), destaca que a seleção recorrente entre famílias de irmãos completos tem sido pouco utilizada, provavelmente devido ao maior tempo requerido na realização das etapas, principalmente nas etapas de polinizações manuais. No entanto, Linares (1987) preconiza que este método permite aproveitar todos os tipos de ação gênica.

### 3.5. Marcadores moleculares

Até início dos anos 60, os estudos genéticos eram baseados em marcadores morfológicos, os quais são de fácil identificação no indivíduo. Desta forma, esses marcadores contribuíram em larga escala para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica. No entanto, os marcadores morfológicos apresentam uma série de limitações, quais sejam, número limitado de marcas, normalmente são restritos a poucas espécies cultivadas e são muito influenciados pelo ambiente (Martins, 2000).

Desde a descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA por Watson e Crick em 1953, as informações sobre tal molécula e as técnicas para sua manipulação progrediram e continuam a progredir a uma velocidade sem precedentes. A rapidez e o dinamismo com que as novas descobertas são divulgadas garantem o acúmulo de informações num período de tempo muito curto, permitindo que metodologias que usam o DNA estejam em contínuo aperfeiçoamento (Guimarães, 2003).

A tendência geral do melhoramento genético de plantas é a interação das técnicas clássicas com aquelas mais modernas da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O uso de marcadores em genética e melhoramento remonta ao início do século passado, quando Batson e Punnet, estudando ervilhas, indicaram a existência de ligação entre genes que controlam os caracteres cor de pétala e forma de grãos de pólen. Tempos depois, Thomas H. Morgan demonstrou claramente que nem todos os genes têm segregação independente. Pelo contrário, genes estão ligados em grupos pelo mesmo filamento de material em que residem, os cromossomos. Stutervant em 1913 expandiu estas idéias e foi o pioneiro no desenvolvimento do primeiro mapa genético da mosca *Drosophila* (Ferreira e Grattapaglia 1998).

Desta forma, estava lançada a base para a utilização de marcadores no melhoramento. Pois se um determinado marcador, de fácil identificação fenotípica, estiver fisicamente ligado, a uma pequena distância de um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção deste marcador resulta na seleção indireta do gene de interesse (Milach, 1998).

Os marcadores de DNA são ferramentas moleculares poderosas por atuarem diretamente em nível de DNA. Sendo, portanto, isentos da influência ambiental, são potencialmente ilimitados, independem da idade da planta e são passíveis de utilização em uma série de procedimentos relacionados ao melhoramento de plantas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os mesmos podem ser utilizados para estudos de diversidade genética, para "fingerprinting" de genótipos, para mapeamento e análise de genes, etc (Milach, 1998).

De uma maneira bem didática os marcadores moleculares podem ser definidos como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos, e são herdados geneticamente (Milach, 1998). Porém, Ferreira e Grattapaglia (1998), em um conceito mais clássico, definem marcador molecular como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA.

A variabilidade genética é a base de todo melhoramento de plantas, e o uso de técnicas moleculares permite identificar o polimorfismo diretamente do DNA, havendo diferentes técnicas com este propósito (Milach, 1998). A

possibilidade de marcar genes de importância, sejam eles qualitativos ou quantitativos, através de marcadores moleculares permite a localização destes genes (mapeamento) nos diferentes cromossomos possibilitando o desenvolvimento de mapas detalhados da variabilidade genética das diferentes espécies (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Existem diferentes classes de marcadores moleculares disponíveis para serem aplicados no melhoramento genético vegetal, entre eles estão os marcadores baseados em PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). Essa tecnologia foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esta técnica é poderosa e envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores “primers” que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Dentre as diferentes classes de marcadores, temos a técnica do AFLP (‘Amplified Fragment Length Polymorphism’), que se baseia na amplificação seletiva via PCR, de fragmentos de DNA genômico total, gerados pela clivagem com enzimas de restrição (Vos et al., 1995).

A técnica envolve a digestão de DNA com enzima de restrição, conforme requer uma análise de RFLP. Neste caso, porém, o DNA é digerido com dois tipos de endonucleases (corte raro e corte freqüente), gerando fragmentos de diferentes tamanhos.

A análise de AFLP, consiste basicamente de quatro etapas:

A- O DNA genômico do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição.

B- Adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem.

C- Uma fração dos fragmentos gerados é amplificado seletivamente via PCR utilizando ‘primers’ específicos, desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Uma ação seletiva ocorre, portanto, no momento que é realizada a PCR e somente uma sub-população de fragmentos é amplificada.

D- Na última etapa fragmentos amplificados são separados em gel de alta resolução.

Um dos grandes atributos da técnica de AFLP é o grande número de locos que pode ser amostrado em um único gel AFLP, gerando assim um grande número de fragmentos, o que o torna muito eficiente na amostragem do genoma. O grande poder de detecção de variabilidade genética advém da exploração simultânea da presença e ausência de sítios de restrição, a exemplo dos marcadores RFLP, e a ocorrência de amplificação de seqüências arbitrárias, como os marcadores RAPD (Ferreira e Gratapaglia, 2001).

A principal limitação dos marcadores AFLP, é que estes, assim como os marcadores do tipo RAPD, são do tipo dominante, permitindo que apenas um alelo seja detectado, ou seja, o que é amplificado e visualizado no gel. Sendo assim, os genótipos homozigotos não podem ser diferenciados dos heterozigotos e o padrão de marcas se caracteriza por fornecer dados binários, ou seja, presença e ausência de marcas ou bandas (Ferreira e Gratapaglia, 2001).

Porém, segundo Gerber et al.. (2000), citado por Garcia et al.. (2004) o alto número de polimorfismo obtido por AFLPs contrabalança a perda de informação pela incapacidade de tal marcador não distinguir heterozigotos de homozigotos.

Outros aspectos que podem limitar as análises de AFLP, segundo Ramalho et al.. (2000), são: o maior numero de etapas que envolvem as análises, o maior número de reagentes e equipamentos de biologia molecular necessários, a alta qualidade e pureza do DNA utilizado nas reações e o cuidado com interpretações equivocadas do polimorfismo, que pode ser gerado por uma digestão parcial ou pela má qualidade do DNA.

A análise de AFLP tem sido empregada de forma crescente com o propósito de estudos de diversidade genética, de DNA 'fingerprint', mapeamento genético e construção de mapas genéticos, independente da espécie e da complexidade do genoma (Araújo, 2002; Cattaneo, 2001; Ferreira, 2001).

### 3.5.1. Marcadores moleculares na seleção recorrente em milho

A escolha de genitores e o planejamento de cruzamentos constituem a etapa inicial de um programa de melhoramento. Avaliações da diversidade genética dos potenciais genitores por meio de marcadores moleculares são, muitas vezes, correlacionadas com resposta heterótica (Pinto, 2002).

A escolha de genitores mais divergentes pode aumentar o desempenho dos híbridos obtidos ou simplesmente aumentar a chance de obter diferentes combinações gênicas de interesse (Hallauer e Miranda Filho, 1988).

Considerando todas as aplicações da seleção assistida ou auxiliada pelos marcadores moleculares é difícil imaginar uma cultura ou um programa de melhoramento genético que não possa ser beneficiado com o uso de tal tecnologia.

A diversidade genética também é empregada para escolha de genitores. O milho é a espécie na qual ela foi mais empregada e o objetivo principal era desenvolver um procedimento de predição de híbrido que eliminasse os testes de milhares de híbridos simples no campo. Inicialmente em alguns estudos utilizaram-se isoenzimas, quando se verificou a ineficiência do procedimento pela baixa correlação com a produtividade dos híbridos (Pinto et al., 2003).

Gabriel (2004), utilizando a técnica de RAPD identificou uma variabilidade genética bastante ampla entre e dentro das populações de milho Cimmyt e Piranão, as quais já tinham sido submetidas a oito ciclos de seleção recorrente recíproca, de forma que pôde-se dar continuidade aos procedimentos de seleção nas populações, porque os marcadores indicaram a presença de uma variabilidade suficiente para tal propósito.

As populações de milhos tropicais, são usualmente, originadas de compostos com alta variabilidade genética, e na maioria das vezes, é difícil alocar essas populações em grupos heteróticos bem definidos apenas pela avaliação fenotípica. Desta forma, os marcadores moleculares têm sido muito úteis em avaliações genéticas e, ainda estão sendo muito utilizados para a identificação de grupos heteróticos (Garcia, 2004).

Benchimol et al. (2000), a partir de distâncias genéticas baseadas em RFLP puderam avaliar, por meio de análise de agrupamento, linhagens de duas populações de milho tropical e alocá-las em grupos heteróticos.

### 3.6. Índice de seleção

O melhoramento genético tem permitido o desenvolvimento de novas variedades nas mais diversas culturas, tais variedades se destacam devido suas características superiores, seus níveis de produtividade e também de qualidade, pois o mercado consumidor passou a ser mais exigente com a qualidade do produto que está sendo consumido.

De acordo com Cruz e Regazzi (2001), a seleção com base em uma ou poucas características tem-se mostrado inadequada, pois normalmente conduz a um produto final superior para alguns caracteres e inferior para outros.

Ainda segundo Cruz e Regazzi (2002), para se obter um material genético realmente superior, é necessário que o material selecionado reúna, simultaneamente, uma série de atributos favoráveis que lhe confira não só rendimento, mas também satisfação às exigências do consumidor.

Assim sendo, uma estratégia importante em um programa de melhoramento, é a utilização simultânea de um conjunto de características de importância econômica. Para tal objetivo, a utilização de índices de seleção é uma alternativa eficiente, pois o Índice funciona como um super - caráter que permite combinar as múltiplas informações contidas na análise experimental, de modo que seja possível a seleção com base em um complexo de variáveis que reúna vários atributos de interesse econômico (Cruz et al., 2004).

De uma forma mais direta, Granate et al. (2002) definem os índices de seleção como uma técnica multivariada que associa informações relativas a vários caracteres de interesse agrônomo com as propriedades genéticas da população avaliada.

Diferentes índices representam diferentes alternativas de seleção, e conseqüentemente de ganhos, eles identificam de maneira, rápida e eficiente, materiais genotípicos que podem ser mais ou menos adequados para os propósitos do melhorista (Cruz e Regazzi, 2001).

Com o avanço dos recursos computacionais, tornou-se extremamente simples a avaliação dos resultados obtidos com os mais variados índices, e dentro de cada um, com o uso de diversos pesos econômicos (Vilarinho, 2001).

Smith (1936) propôs o uso de índice de seleção nos programas de melhoramento de plantas como critério de seleção simultânea de duas ou mais características correlacionadas. Este procedimento foi adaptado ao ramo animal por Hazel (1943). Segundo esses autores, para se estabelecer o índice de seleção são necessários o valor econômico relativo de cada característica, as variâncias genotípica e fenotípica de cada característica e as covariâncias fenotípica e genotípica entre cada par de características. Tal índice passou a ser reconhecido como Índice Clássico.

Pesek e Baker (1969) sugeriram o uso de 'ganhos genéticos desejados' de características individuais num programa de seleção, para substituir os pesos econômicos relativos no cálculo dos índices de seleção. Para se usar a modificação proposta, necessita-se da matriz de variância e covariância genética e o vetor dos 'ganhos genéticos desejados' para as características.

Assim, é possível calcular os coeficientes dos índices sem designar pesos econômicos relativos para as características, como requer a teoria convencional de índice de seleção. Dessa forma, o índice obtido resultará em um ganho máximo para cada característica, de acordo com a importância relativa assumida pelo melhorista na especificação do ganho desejado, e sujeito a restrições impostas pela constituição fenotípica e genotípica da população original.

Segundo Cruz e Regazzi (1997), uma crítica apresentada ao estabelecimento do índice de 'ganhos desejados' refere-se ao fato de que características secundárias, para as quais o melhoramento não é tão importante, não possam ser incluídas para auxiliar no melhoramento de características principais.

Willians (1962) propôs o denominado índice-base, objetivando evitar a interferência de imprecisões das matrizes de covariâncias fenotípicas e genotípicas na estimação dos coeficientes que constituem o índice. Segundo Cruz e Regazzi (2004), esse método propõe o estabelecimento de índices, mediante a combinação linear dos valores fenotípicos médios das características, os quais são ponderados diretamente pelos seus respectivos pesos econômicos.

De acordo com os autores, este índice tem apresentado larga aceitação pelos melhoristas, em razão de dispensar as estimativas de variâncias e covariâncias fenotípicas e genotípicas e de ter revelado resultado satisfatório, quando utilizado como critério de seleção em vários trabalhos de pesquisa. Os

autores relatam ainda que o índice base será equivalente ao índice clássico proposto por Smith (1936) e Hazel (1943), quando as variâncias e covariâncias fenotípicas foram determinadas predominantemente por causas genéticas.

Mulamba e Mock (1978) propuseram o índice com base em soma de postos (ou “ranks”), que consiste em classificar os materiais genotípicos em relação a cada uma das características, em ordem favorável ao melhoramento. Uma vez classificadas, são somadas as ordens de cada material genético referente a cada caráter, resultando uma medida adicional tomada como índice de seleção.

Daros (2003) ressalta que, apesar de diversos índices de seleção, razoável quantidade de melhoristas tem utilizado, em seus programas de melhoramento, o índice de Smith (1936) e Hazel (1943), sobretudo quando os experimentos são bem conduzidos, os quais proporcionam estimativas adequadas das matrizes de variâncias e covariâncias fenotípicas e genotípicas. Nestes casos, a possibilidade de variação nas magnitudes dos pesos econômicos torna bastante hábeis as estimativas de ganhos.

Este fato foi observado por Tardin et al. (2003), que utilizando o índice clássico de Smith (1936) e Hazel (1943), após várias tentativas de atribuição de pesos econômicos a oito características avaliadas em famílias de irmãos completos de milho, num programa de seleção recorrente recíproca, conseguiram obter pesos econômicos que forneceram estimativas de ganhos satisfatórios nas diversas características, de acordo com o interesse do programa de melhoramento em questão.



## 4. TRABALHOS

### 4.1. ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS NAS POPULAÇÕES DE MILHO CIMMYT X PIRANÃO NO 10º CICLO DE SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA ENTRE FAMÍLIAS DE IRMÃOS COMPLETOS.

#### 4.1.1. RESUMO

Com a implementação do 10º ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos de milho, este trabalho teve como objetivo estimar a predição de ganhos, bem como as estimativas de parâmetros genéticos e suas correlações genéticas associadas aos caracteres quantitativos. Para tanto foram obtidas 100 famílias de irmãos completos, as quais foram avaliadas com delineamento em blocos ao acaso com duas repetições dentro de “set's” em dois ambientes distintos: Campos e Itaocara. A análise de variância revelou que a população apresenta variabilidade genética significativa para dar continuidade ao programa, e a ausência de significância da interação genótipo por ambiente para a maioria das características avaliadas, sugere que há possibilidade de recomendação simultânea de genótipos superiores para ambos os locais. Para a característica produção, verificou-se que existe alta possibilidade de identificação de genótipos superiores, pois apresentaram significância pela

análise de variância ( $P < 0,01$ ), alta herdabilidade (78,79%), alto coeficiente de variação genético (20,96) e índice de variação próximo a unidade (0,96). As outras características assumiram valores de coeficiente de herdabilidade entre 16,75%, e 78,79%, indicando, portanto, a possibilidade de se obter ganhos genéticos com a seleção. Os valores das estimativas dos índices de variação também foram satisfatórios para as características avaliadas. Para a maioria dos pares de caracteres, verificou-se a existência de correlações genéticas positivas significativas.

#### 4.1.2. ABSTRACT

Considering the development of the 10<sup>th</sup> cycle of reciprocal recurrente selection in full sib corn families, this work has aimed to assess the prediction of gains, as well as the genetic parameter estimates and their genetic correlations, associated with quantitative characters. In order to do this, 100 full sib families were obtained which were appraised by randomized block design with two recurrences within sets in two distinct environments: Campos e Itaocara. Variance analysis has revealed that the populations presented sufficient genetic variability to continue with the program, whereas the fact – there is no significance for genotype interaction as to the environment for most of the estimated characteristics – suggests that simultaneous recommendation of superior genotypes for both locales, should be possible. As to the characteristic production (t/ha), it was found out that there is high probability to identify superior genotypes, once they have shown significance by variance analysis ( $P < 0,01\%$ ), high degree of heritability (78,79%), high coefficient of genetic variation (20,96%) and variation rate next to the unit (0,96). The other characteristics assumed coefficient of heritability values between 16,75 and 78,79, thus indicating the possibility to get genetic gains through selection. The estimate values of variation rates have also been satisfactory for the evaluated characteristics. The existence of positive genetic correlations for most pairs of characters was verified.

### 4.1.3. INTRODUÇÃO

A cultura do milho é extremamente rica em conhecimentos técnico-científicos, possuindo um importante valor econômico e um bom potencial para gerar renda a muitas famílias, pois esta cultura viabiliza o sistema produtivo pela agregação de valores ao produto e pela função do milho na alimentação humana e animal (Miranda, 2003).

O melhoramento genético tem contribuído em larga escala para o aumento da produtividade das espécies e com o milho não é diferente, principalmente pelo fato desta cultura possuir características ideais para este propósito: ciclo de reprodução curto, planta alógama, mas que suporta a autofecundação, monoicia, fácil controle de polinização, dentre outras (Bull, 1993).

Sabe-se que hibridações de materiais genéticos contrastantes aumentam as chances de aparecerem os efeitos heteróticos nos descendentes, de modo que a variabilidade genética é de fundamental importância para o bom êxito de um programa de melhoramento (Silva, 2003).

Porém, com o avanço de gerações, é esperado que haja modificações no valor de alguns parâmetros genéticos, tais como, média, variância genética, herdabilidade e ainda nas correlações genéticas (Santos, 2002).

Fisher (1918), citado por Allard (1971), foi o pioneiro no emprego da variância no estudo de caracteres quantitativos. Em seus trabalhos, a variância genotípica foi subdividida em variância genética aditiva, atribuída aos efeitos médios dos genes, e variância decorrida dos desvios de dominância, devido às interações entre alelos de um mesmo loco, e variância epistática, em função das interações entre diferentes locos.

A variância aditiva, que é a variância dos valores genéticos, é um dos fatores determinantes da covariância ou semelhança entre parentes e, por conseguinte, o principal determinante das propriedades genéticas da população e do seu comportamento (Falconer, 1981).

A existência de variância aditiva constitui-se em um indicativo de maior facilidade na identificação de genótipos superiores com maior concentração de alelos favoráveis. Por sua vez, a variância atribuída à dominância é indicativa de dificuldade no processo de seleção, mas é importante quando se deseja explorar o vigor híbrido (Cruz e Regazzi, 2001).

Para tanto, dentre os vários métodos de melhoramento, merece destaque a Seleção Recorrente Recíproca, pois, teoricamente, pode-se tirar vantagem tanto dos efeitos aditivos por meio da concentração dos alelos favoráveis em ambas as populações, bem como dos desvios de dominância, uma vez que se mantém a distância entre as populações permitindo explorar o fenômeno da heterose por meio do cruzamento entre as populações e/ou de linhagens oriundas das mesmas (Santos, 2003).

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

O conhecimento da associação entre as características é ponto importante de um programa de melhoramento bem planejado. As correlações são levadas em consideração na escolha dos métodos de melhoramento quando se formulam estratégias de seleção simultânea para várias características estudadas (Daros, 2004).

Desenvolveu-se então este trabalho com o propósito de estimar as alterações na média, na herdabilidade e nas correlações genéticas associadas aos caracteres quantitativos após dez ciclos de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos aplicados às populações de milho CIMMYT e Piranão.

#### 4.1.4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1.4.1. Material genético

Uma etapa importante na seleção recorrente é a escolha de populações de elevado potencial agrônômico. Neste sentido, em se tratando de melhoramento interpopulacional, duas populações pertencentes a grupos heteróticos distintos foram definidas para utilização conforme a seguir apresentadas:

**Cimmyt:** População oriunda da Universidade Federal de Viçosa, pertencente ao grupo heterótico tipo 'FLINT', Esta população possui um gene braquítico, sendo, portanto, de porte mais baixo.

**Piranão:** População também oriunda da Universidade Federal de Viçosa, pertencente ao grupo heterótico tipo "DENT", Esta população também possui um gene braquítico.

Ambas as populações já foram trabalhadas tanto no programa de melhoramento da Universidade Federal de Viçosa (4ciclos), em Viçosa - MG, quanto na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (5 ciclos) em Campos dos Goytacazes - RJ.

##### 4.1.4.2. Obtenção das famílias

O plantio das populações para a obtenção das famílias de irmãos completos e dos  $S_1$ , foi realizado em Março de 2004, no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo em Campos dos Goytacazes.

As populações foram plantadas em fileiras alternadas com uma profundidade de 0,05 m e cada fileira continha 6,00 m de comprimento e distanciadas em 1,00 m entre si, e cada planta dentro de cada fileira foi espaçada por 0,40 m.

Aos trinta dias após a emergência foi realizado o desbaste, permanecendo uma planta por cova. A adubação do plantio foi feita com 800Kg/ha de N-P-K da

formulação 04-14-08, e também aos 30 dias pós-plantio foi feita a adubação de cobertura, utilizado 300 Kg/ha de Nitrogênio, na forma de sulfato de amônio 20-0-20 e após 45 dias pós-plantio foi feita outra adubação com 260 Kg/ha também na forma de sulfato de amônio, mas na formulação 20-0-0.

Para a obtenção das progênes os seguintes procedimentos foram adotados: as espigas foram cobertas antes de soltar os estigmas com sacolas de plástico próprias a este fim. Simultaneamente, os pendões foram cobertos de forma que não ocorresse contaminação por pólen estranho. Este procedimento é extremamente necessário, pois o pólen perde sua viabilidade após oito horas do início de sua liberação; de modo que qualquer pólen viável que se encontre no saco de papel do dia seguinte ao preparo só poderá ter sido proveniente do pendão coberto.

Os cruzamentos foram feitos em plantas prolíficas, selecionadas dentro de cada par de fileiras, de maneira que a primeira espiga (superior) foi produto de autofecundação e a segunda espiga, produto de cruzamentos. As plantas de cada fileira, num total de quinze, foram numeradas para posterior identificação por ocasião dos cruzamentos.

Para cada par de plantas foram feitas duas autofecundações e dois cruzamentos, os quais foram recíprocos. Deste modo, foram obtidas 100 famílias de irmãos completos e 200 progênes autofecundadas ( $S_1$ ). As sementes  $S_1$  foram armazenadas em câmara fria, e as famílias de irmãos completos foram usadas para o ensaio de competição.

#### 4.1.4.3. Avaliação das progênes de irmãos completos

As 100 famílias de irmãos completos foram plantadas em Outubro de 2004 e avaliadas em delineamento em blocos ao acaso, em dois ambientes diferentes: Colégio Estadual Agrícola Antonio Sarlo em Campos dos Goytacazes (Norte do Estado do Rio de Janeiro), e na Estação Experimental da PESAGRO-RIO em Itaocara (Nordeste Fluminense),

Dado o alto número de tratamentos (100 famílias), as mesmas foram agrupadas em 'sets', sendo que cada 'set' conteve 25 famílias, com duas repetições por 'set', totalizando 4 'sets',

Cada unidade experimental (famílias de irmãos completos) foi cultivada em fileiras de 5,00 m de comprimento, espaçadas 1,00 m uma das outras, e 0,20 m entre plantas, Foram semeadas 50 sementes por fileira, sendo feito o desbaste um mês após o plantio, deixando apenas 25 plantas por fileira, Todos os outros tratos culturais foram seguidos de acordo com exigências da cultura.

Após o florescimento das plantas, avaliou-se as seguintes características, em cada unidade experimental:

- a) Número de Dias para o Florescimento (flo): número de dias decorridos desde o plantio até a exteriorização do estilo-estigma da espiga (flor feminina) de 50% das plantas da unidade experimental;
  - b) Altura de Planta (alp): altura média de seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da folha-bandeira em metros;
  - c) Altura de Espiga (ale): altura média das mesmas seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da espiga superior no colmo, em metros;
  - d) 'Stand' (npl): número total de plantas no momento da colheita;
  - e) Plantas Quebradas (npq): número de plantas que se apresentarem quebradas, abaixo da espiga superior, no momento da colheita;
  - f) Plantas Acamadas (npa): número de plantas que apresentarem ângulo de inclinação superior a  $45^{\circ}$  com a vertical, no momento da colheita;
  - g) Empalhamento (emp): número de espigas mal empalhadas (as quais deixam grãos expostos), no momento da colheita,
- Após colheita foram obtidos os dados das seguintes características:
- h) Número de Espigas (nes): número total de espigas colhidas;
  - i) Número de Espigas Doentes (nd): número de espigas manifestando sintomas de doença;
  - j) Número de Espigas Atacadas por Pragas (neap): número de espigas brocadas;
  - k) Peso de Espigas (pes): peso, em quilogramas, das espigas despalhadas;
  - l) Produção (prod): produtividade estimada com base no peso dos grãos debulhados em quilogramas por metro de fileira e
  - m) Peso de 100 grãos (p100): peso, em gramas, de uma amostra de 100 grãos sadios, com precisão de centésimos de grama.

A colheita foi realizada quatro meses após o plantio, mas precisamente, em Fevereiro de 2005.

#### 4.1.4.4. Análise estatística

##### 4.1.4.4.1. Análise de variância

As características mensuradas foram submetidas a uma análise de variância conforme o delineamento em blocos casualizados de acordo com o modelo genético estatístico proposto por Hallauer e Miranda Filho (1981):



onde :

$\mu$  = média experimental;

$E_i$  = efeito fixo do i-ésimo ambiente;

$S_j$  = efeito do j-ésimo 'set', NID (0,  $\sigma^2$ );

$ES_{ij}$  = efeito da interação de ambientes e 'sets' NID (0,  $\sigma^2$ );

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

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

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

$e_{ijkl}$  = erro experimental NID (0,  $\sigma^2$ );

No Quadro 1 é apresentado o esquema da análise de variância conjunta, com as respectivas esperanças de quadrados médios, sendo que, com exceção de ambiente, as demais fontes de variação foram consideradas aleatórias,



Quadro 1 – Análise de variância e esperança de quadrados médios

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

## 4.1.4.6. Estimação dos parâmetros genéticos

De posse das esperanças dos quadrados médios, apresentados no Quadro 1, foram obtidas as estimativas dos componentes de variância:

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

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

$$\text{Herdabilidade com base na média das famílias: } h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_f^2$$

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

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

Em que: QMG = quadrado médio dos genótipos;

QMR = quadrado médio do resíduo;

r = repetição;

e = ambiente,

#### 4.1.4.7. Estimação das correlações entre pares de características

As seguintes expressões foram utilizadas para o cálculo dos coeficientes de correlação fenotípica ( $r_F$ ), genotípica ( $r_G$ ) e de ambiente ( $r_A$ ) entre os pares de características (Cruz e Regazzi, 2001)

$$r_f = \frac{PMG_{xy}}{\sqrt{QMG_x \cdot QMG_y}}$$

$$r_g = \frac{\hat{\sigma}_{gxy}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{gx}^2 \cdot \hat{\sigma}_{gy}^2}}$$

$$r_a = \frac{PMR_{xy}}{\sqrt{QMR_x \cdot QMR_y}}$$

Em que:  $PMG_{xy}$  e  $PMR_{xy}$  = produto médio de genótipos e de resíduo em relação às características x e y, respectivamente;  $\hat{\sigma}_{gxy}$  = estimador da covariância genética entre x e y;  $\hat{\sigma}_{gx}^2$  e  $\hat{\sigma}_{gy}^2$  = estimadores das variâncias genotípica das características x e y, respectivamente.

Estimaram-se os ganhos de seleção direta para a característica produção ( $GS_{dx}$ ) e os ganhos para as características afetadas pela seleção direta em produção, através do sistema adotado por Eberhart (1970):  $GS_{dx} = DS_x \cdot p \cdot h_x^2$ , sendo:  $DS_x$  = diferencial de seleção; p = controle parental;  $h_x^2$  = coeficiente de herdabilidade.

#### 4.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos quadrados médios para as fontes de variação utilizados na análise conjunta são apresentados no Quadro 2.

De acordo com a classificação de Scapim et al. (1995), a qual foi elaborada levando-se em consideração a cultura estudada, o milho, e a natureza das características avaliadas, os coeficientes de variação da maioria dos caracteres foram considerados médios, o que demonstra uma boa precisão na condução dos ensaios (Quadro 2).

Porém, as características número plantas quebradas (npq), número de plantas acamadas (npa), empalhamento (emp), número de espiga doente (nd) e número de espiga atacada por praga (neap), apresentaram valores de coeficiente de variação muito altos, 91,59%; 103,91%; 129,47%; 65,42% e 146,24% respectivamente.

Daros (2003) avaliando famílias de irmãos completos e  $S_1$  em milho pipoca também encontrou valores considerados muito altos de coeficiente de variação para estas mesmas características. Segundo Coimbra (2000) os valores elevados dos coeficientes de variação para essas características estão de acordo com os encontrados na literatura para milho comum.

Ainda pela análise de variância (Quadro 2), nota-se que o efeito de ambiente não proporcionou diferenças significativas entre os materiais avaliados, com exceção às características altura de espiga (ale), número de plantas acamadas (npa), número de espigas doentes (nd), peso de 100 grãos (100) e florescimento (flo).

Quadro 2: Quadrados médios para as características analisadas nas famílias de irmãos completos.

Características <sup>1/</sup>	FV							CV(%)
	Ambiente(E)	'Set'(S)	E*S	Rep/(E*S)	Genótip/S	E*G/S	Resíduo	
Prod	7,2630 <sup>ns</sup>	5,1319 <sup>ns</sup>	4,1063	5,4992	9,5556**	2,5976 <sup>ns</sup>	2,0268	21,75
Alp	2,3844 <sup>ns</sup>	1,3948 <sup>ns</sup>	1,0709	1,2662	0,9269 <sup>ns</sup>	0,8989 <sup>ns</sup>	0,9500	43,49
Ale	3,7472*	0,0697 <sup>ns</sup>	0,1492	0,2665	0,1551 <sup>ns</sup>	0,1313 <sup>ns</sup>	0,1169	23,52
Npl	82,2676 <sup>ns</sup>	91,4374 <sup>ns</sup>	73,2516	169,8542	49,2110**	18,7084 <sup>ns</sup>	15,3324	19,94
Npq	75,2661 <sup>ns</sup>	13,3518**	7,6119	8,1203	3,4526**	1,9429 <sup>ns</sup>	1,8555	91,59
Npa	307,0540**	12,5714 <sup>ns</sup>	4,6953	15,3891	7,8763**	5,0940*	3,8144	103,91
Emp	7,5862 <sup>ns</sup>	1,8306 <sup>ns</sup>	0,9615	0,8892	3,1555**	1,3392 <sup>ns</sup>	1,3501	129,47
Nes	2,8484 <sup>ns</sup>	78,0770 <sup>ns</sup>	90,1469	165,9602	151,2460**	53,6135**	33,9844	18,66
Nd	408,9555**	0,3156 <sup>ns</sup>	2,6755	10,5989	9,6806**	7,1669 <sup>ns</sup>	6,3052	65,42
Neap	30,0726 <sup>ns</sup>	18,7824**	11,7185	4,2146	1,6462 <sup>ns</sup>	1,6273 <sup>ns</sup>	1,3688	146,24
Pés	0,0885 <sup>ns</sup>	1,4617 <sup>ns</sup>	1,3772	1,7467	3,3035**	0,9546 <sup>ns</sup>	0,7261	21,45
P100	214,6992*	25,9153 <sup>ns</sup>	7,5217	6,3554	14,8885**	8,3752*	6,1884	7,86
Flo	8288,7114**	62,9716 <sup>ns</sup>	17,9486	5,1657	17,2390**	6,7181 <sup>ns</sup>	8,2702	4,11

<sup>1/</sup> Prod = produção; Alp = altura de plantas; Ale = altura de espiga; Npl = número de plantas; Npq = número de plantas quebradas; Npa = número de plantas acamadas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Nd = número de espigas doentes; Neap = número de espigas atacadas por pragas; Pes = peso de espiga; p100 = peso de 100 grãos e Flo = número de dias para florescimento”.

\*, \*\* Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

<sup>ns</sup> Não significativo.

Esses resultados não se mostraram muito diferentes dos resultados encontrados por Daros (2003) e Freitas Jr (2005). A característica altura de espiga pode ter sido significativa, devido ao fato do solo em Itaocara ser mais fértil, contribuindo assim para plantas com espigas mais altas. Já a significância para a característica número de plantas acamadas (npa), pode ser explicada pela maior ocorrência de ventos fortes na região de Itaocara, o que favorece um maior número de plantas acamadas. O fato da região de Campos ser uma região onde se predomina o monocultivo da cana-de-açúcar, também uma monocotiledônea, pode favorecer uma maior ocorrência de doenças no solo, contribuindo assim, para aumentar o número de espigas doentes neste ambiente.

Constataram-se diferenças significativas pelo teste F em 1% de probabilidade entre os genótipos para as características mais importantes, indicando a presença de variabilidade genética entre os genótipos, o que é de fundamental importância para obtenção de ganhos genéticos em programas de melhoramento. Apenas altura de planta (alp), altura de espiga (ale) e número de espigas atacadas por praga (neap) não apresentaram significância a 5% de probabilidade, indicando, portanto, uma reduzida variabilidade genética para essas características.

A análise da interação genótipo por ambiente (Quadro 2) revelou ausência de significância para a maioria das características avaliadas, indicando, assim, um comportamento similar desses genótipos nos dois ambientes estudados. Isto sugere que há possibilidade de recomendação simultânea de genótipos superiores para ambos os locais.

No Quadro 3 estão apresentados as estimativas dos componentes genéticos da população para análise conjunta dos ambientes. Para a característica altura de planta (alp) a variância genotípica assumiu valor negativo e foi considerada nula neste trabalho, o que pode ter ocorrido devido a um elevado valor do quadrado médio do resíduo, juntamente com a baixa variabilidade genética encontrada para o caráter, que foi não significativo para o efeito genótipo.

Em relação à característica produção em t/ha (prod), considerada entre as características avaliadas a de maior importância, verificou-se que existe alta possibilidade de identificação de genótipos superiores, pois apresentaram significância pela análise de variância ( $P < 0,01$ ), alta herdabilidade (78,79%), alto coeficiente de variação genético (20,96) e índice de variação próximo a unidade (0,96).

Outras características assumiram valores de coeficiente de herdabilidade entre 16,85%, como número de espigas atacadas por pragas (neap) e 77,53%, número de espigas (nes).

Quadro 3: Estimativas referentes às variâncias genotípica ( $\sigma_g^2$ ), fenotípica ( $\sigma_f^2$ ) e da interação genótipo por ambiente ( $\sigma_{ga}^2$ ), coeficiente de herdabilidade ( $h^2$ ), coeficientes de variação genética ( $CV_g$ ), índice de variação ( $I_v$ ), as médias de cada característica e seus respectivos ganhos genéticos com pressão de seleção de 30%.

Caract. <sup>1/</sup>	Parâmetros genéticos <sup>2/</sup>							Média	GS(%)
	$\sigma_g^2$	$\sigma_f^2$	$\sigma_{ga}^2$	$h^2$	$CV_g$ (%)	$I_v$ (%)			
Prod	1,88	2,39	0,29	78,79	20,96	0,96	6,55	18,80	
Alp	-	0,23	-	-	-	-	2,24	0,00	
Ale	0,01	0,04	0,01	24,65	6,73	0,29	1,45	0,23	
Npl	8,47	12,30	1,69	68,84	14,82	0,74	19,64	8,83	
Npq	0,40	0,86	0,04	46,26	42,49	0,46	1,49	10,72	
Npa	1,02	1,97	0,64	51,57	53,62	0,52	1,88	9,24	
Emp	0,45	0,79	-	57,21	74,86	0,58	0,90	3,45	
Nes	29,32	37,81	9,81	77,53	17,33	0,93	31,24	13,82	
Nd	0,84	2,42	0,43	34,87	23,93	0,37	3,84	3,92	
Neap	0,07	0,41	0,13	16,85	32,92	0,23	0,80	8,67	
P100	2,18	3,72	1,09	58,43	4,66	0,59	31,66	0,24	
Flo	2,24	4,31	-	52,03	2,14	0,46	70,03	-0,65	

<sup>1/</sup> Prod = produção; Alp = altura de plantas; Ale = altura de espiga; Npl = número de plantas; Npq = número de plantas quebradas; Npa = número de plantas acamadas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Nd = número de espigas doentes; Neap = número de espigas atacadas por pragas; Pes = peso de espiga; p100 = peso de 100 grãos e Flo = número de dias para florescimento”.

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

Para a maioria dos pares de caracteres, verificou-se a existência de correlações genéticas positivas (Quadro 4). Correlações genotípicas positivas indicam que a seleção objetivando aumento de um deles provocará o mesmo efeito no outro. Tomando-se como exemplo os maiores valores de correlações genotípicas encontradas, pode-se afirmar que maiores ganhos via seleção indireta são possíveis entre produção de grãos (prod), número de espigas (ne) e número de plantas (npl).

Para a característica produção, considerada a mais importante, observa-se correlações significativas e altamente positivas com as características: número de plantas (0,94<sup>\*\*</sup>), número de espigas (0,90<sup>\*\*</sup>) e peso de espigas (0,99<sup>\*\*</sup>). O que já era esperado, pois, quanto maior o número de plantas, maior também será o número de espigas, e conseqüentemente maior será o peso de espigas. Porém, para as correlações entre produção e as características: número plantas quebradas (0,41<sup>\*\*</sup>), número plantas acamadas (0,21<sup>\*\*</sup>), número de espigas doentes (0,55<sup>\*\*</sup>) e número espigas atacadas por pragas (0,64<sup>\*\*</sup>), diferentemente do esperado, também apresentaram correlações positivas, no entanto, os valores dessas correlações foram baixos, e ainda pode-se considerar que plantas com espigas mais pesadas, que normalmente também apresentam maior número de grãos, por exemplo, podem aumentar as chances de quebraimento da planta e também podem facilitar ao acamamento. Por conseguinte, plantas mais produtivas parecem ter também uma maior porcentagem de doenças e pragas.

Assim como em outros trabalhos (Santos, 2005; Daros, 2003; Carvalho, 2000; Paterniani, 2002; Granate, 2002) a correlação entre as características produção (prod) e empalhamento (emp) continua sendo positiva (0,16<sup>\*\*</sup>), o que é perfeitamente explicável, pois plantas com espigas mais compridas, e conseqüentemente maior produção, tem uma maior probabilidade de apresentarem um empalhamento mais curto, o que contribui, por exemplo, para uma maior ocorrência de doenças e ataques de pragas nos grãos. Este fato pode ser bem evidenciado observando-se os altos valores de correlações positivas entre as características empalhamento (emp), número de espigas doentes (Ned) e número de espigas atacadas por pragas que são 0,99<sup>\*\*</sup> e 0,57<sup>\*\*</sup> respectivamente.

Quadro 4: Estimativas dos coeficientes de correlação genotípico ( $r_g$ ), fenotípico ( $r_f$ ) e de ambiente ( $r_a$ ) entre os diversos caracteres avaliados no 10º ciclo de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos. ( $r_f$ ) e de ambiente ( $r_a$ ) entre os diversos caracteres avaliados no 10º ciclo de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos.

Caracte- Rísticas <sup>1/</sup>	Correlações												
	alp	ale	npl	npq	npa	emp	nes	nd	neap	pes	p100	flo	
Prod	rg	-	0,43**	0,94**	0,41**	0,21**	0,16**	0,90**	0,55**	0,64**	0,99**	0,04	-0,60**
	rf	0,05	0,17**	0,86**	0,24**	0,14**	0,10	0,89**	0,34**	0,26**	0,99**	0,11	-0,42**
	ra	0,20**	-0,06	0,66**	-0,03	0,01	-0,01	0,84**	0,13**	0,06	0,99**	0,30**	-0,12
Alp	rg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	rf	0,08	0,12	-0,04	0,01	-0,08	0,07	-0,01	-0,03	0,06	0,04	0,04	0,00
	ra	0,02	-0,01	0,03	0,04	-0,03	0,25	0,09	0,01	0,21**	0,10	0,04	0,04
Ale	rg		0,22**	0,64**	0,50**	0,61**	0,42**	0,52**	0,25**	0,45**	0,27**	0,34**	
	rf		0,13**	0,26**	0,14**	0,19**	0,20**	0,13**	0,09	0,18**	0,04	0,16**	
	ra		0,09	0,06	-0,07	-0,07	0,05	-0,02	0,05	-0,05	-0,10	0,07	
Npl	rg			0,54**	0,30**	0,04	0,88**	0,32**	0,64**	0,94**	0,02	-0,55**	
	rf			0,31**	0,25**	0,06	0,83**	0,28**	0,23**	0,86**	0,06	-0,37**	
	ra			0,02	0,18**	0,10	0,70**	0,28**	0,03	0,66**	0,12	-0,10	
Npq	rg				0,14**	0,05	0,60**	0,28**	0,28**	0,40**	-0,20**	0,17**	
	rf				0,07	0,04	0,36**	0,16**	0,11	0,23**	-0,15**	0,04	
	ra				0,00	0,02	0,00	0,08	0,05	-0,02	-0,10	-0,08	
Npa	rg					0,37**	0,21**	0,26**	0,53**	0,21**	0,31**	0,03	
	rf					0,22**	0,14**	0,19**	0,08	0,14**	0,14**	0,03	
	ra					0,05	0,01	0,14**	-0,12	0,03	-0,06	0,02	
Emp	rg						0,02	0,99**	0,57**	0,14**	0,30**	0,20**	
	rf						0,02	0,46**	0,22**	0,09	0,16**	0,09	
	ra						0,05	0,02	0,08	0,00	-0,03	-0,05	
Nes	rg							0,58**	0,67**	0,89**	-0,18**	-0,52**	
	rf							0,42**	0,26**	0,88**	-0,11	-0,35**	
	ra							0,32**	0,04	0,86**	0,04	-0,05	
Nd	rg								---	0,54**	0,12	-0,30**	
	rf								0,31**	0,34**	-0,02	-0,08	
	ra								-0,08	0,16**	-0,15**	0,08	
Neap	rg									0,63**	-0,05	-0,28**	
	rf									0,25**	0,03	-0,13**	
	ra									0,06	0,08	-0,07	
Pés	rg										0,07	-0,57**	
	rf										0,13**	-0,40**	
	ra										0,28**	-0,11	
P100	rg											0,34**	
	rf											0,13**	
	ra											-0,13**	

<sup>1/</sup> Prod = produção; Alp = altura de plantas; Ale = altura de espiga; Npl = número de plantas; Npq = número de plantas quebradas; Npa = número de plantas acamadas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Nd = número de espigas doentes; Neap = número de espigas atacadas por pragas; Pes = peso de espiga; p100 = peso de 100 grãos e Flo = número de dias para florescimento".

<sup>ns</sup> = não significativo; \*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t; \* Significativo a 5% de probabilidade.



#### 4.1.6. RESUMO E CONCLUSÕES

Sabe-se que hibridações de materiais genéticos contrastantes aumentam as chances de aparecerem os efeitos heteróticos nos descendentes, de modo que a variabilidade genética é de fundamental importância para o bom êxito de um programa de melhoramento (Silva, 2003).

Porém, com o avanço de gerações, é esperado que haja modificações no valor de alguns parâmetros genéticos, tais como, média, variância genética, herdabilidade e ainda nas correlações genéticas (Santos, 2002).

Desenvolveu-se então este trabalho com o propósito de estimar as possíveis alterações na média, na herdabilidade e nas correlações genéticas associadas aos caracteres quantitativos após dez ciclos de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos aplicados às populações de milho CIMMYT e Piranão.

A análise de variância revelou diferenças significativas entre os genótipos para as características consideradas as mais importantes, e ainda a interação genótipo por ambiente revelou ausência de significância para a maioria das características avaliadas, indicando, assim, um comportamento similar desses genótipos nos dois ambientes estudados.

As características assumiram valores de coeficiente de herdabilidade entre 16,75%, número de espigas atacadas por pragas (neap) a 78,79% produção (pgr), sendo considerados, para maioria das características, satisfatórios para obtenção de ganhos genéticos com a seleção. Pelos resultados do presente trabalho, as seguintes conclusões foram possíveis:

- a) Há uma suficiente variabilidade a ser explorada nos sucessivos ciclos de seleção recorrente recíproca;
- b) A ausência de significância para a interação genótipos por ambiente sugere que há possibilidade de recomendação simultânea de genótipos superiores para ambos os locais.
- c) A característica produção (prod), considerada a de maior importância, apresentou significância pela análise de variância ( $P < 0,01$ ), alta herdabilidade (78,79%), alto coeficiente de variação genético (20,96) e

índice de variação próximo a unidade (0,96), permitindo assim, identificação de genótipos superiores e

d) Para a maioria dos pares de caracteres, verificou-se a existência de correlações genéticas positivas significativas.

#### 4.1.7.. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allard, R.W. Princípios do melhoramento genético em plantas. São Paulo: Ed. Blucher, 1971.381p.

Bull, L.T. e Cantarella, H (1993) Cultura do Milho. 301p.

Carvalho, H.W.L.;Guimarães, P. E. de O; Leal, M. L. da S.; et al. (2000) Avaliação de progênies de meios-irmãos da população de milho CMS-453 no Nordeste Brasileiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, V. 35, n. 8, p. 1577-1584. Agosto 2000.

Coimbra, R.R. (2000) Seleção entre famílias de meios-irmãos da população DFT1-Ribeirão de milho pipoca. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – UFV - Viçosa – MG, 54p.

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.

Cruz, C.D. (1997) Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV

Cruz, C. D. e Regazzi, A. J. (2001). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ª edição. Viçosa: UFV. 390p.

Daros, M. (2003) Melhoramento de milho pipoca: Seleção recorrente em famílias de irmãos completos e progênies  $S_1$ . Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, CCTA-UENF, 92p.

Daros, M.; Amaral Jr., A. T.; Pereira, M. G. (2002) Genetic gain for grains yield and popping expansion in full-sib recurrent selection in popcorn. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Vol.2, p 339 - 344.

Daros, M.; Amaral Jr, A. T.; Pereira, M.G; Santos, F.S.; Gabriel, A. P.C.; Scapim, C. A.; Freitas Jr, S.P. and Silvério, L. (2004) Recurrent selection in inbred popcorn families. *Sci. Agricola* Vol 61, n 6, p 609 – 614, Nov/Dec 2004.

Embrapa (1993). Recomendações técnicas para o cultivo o milho, 204p

Falconer, D.S. (1987) Introdução à genética quantitativa. Tradução: Silva, M.A, Silva,J.C. Viçosa, MG: Impr. Univ., 279p.

Fanceli, A. L.; Dourado Neto, D. (2000) Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, 360p.

Freitas Jr, S.P. (2005) Capacidade combinatória em milho pipoca por meio de dialelo circulante. Tese de Mestrado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, CCTA-UENF, 117p.

Granate, M. J.; Cruz, C. D.; Pacheco, C. A. P. (2002) Predição de ganho genético com diferentes índices de seleção no milho pipoca CMS-43. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, V. 37, n 7, p. 1001-1008.

Hallauer, A. R.; Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Science*, 10: 315-316.

Hallauer, A. R.; Miranda, J.B. (1988) Quantitative Genetics in Mayze Breeding. Ames: Iowa State University Press, 286p.

- Miranda,G.V, Coimbra, R.R., Godoy, C. L., Souza, L. V., et al.. (2002) Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho pipoca. *Pesq. agrop. Bras.*, vol 39.
- Miranda, G. V. (2003) Melhoramento de milho nas Universidades. *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA, 2003
- Paterniani, E. (1980) *Melhoramento e Produção do Milho no Brasil*. Fundação Cargil. Vol. único 650p.
- Paterniani, M.E.A.G.Z.; Sawazaki, E.; Gallo, P.B.; Luders, R.R.; Da Silva, R.M. (2003) Parâmetros genéticos em um composto de milho e potencial para seleção recorrente. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*. Porto Seguro, Bahia.
- Santos, F.S. (2005) Seleção recorrente entre famílias de meios-irmãos da população UNB-2U de milho pipoca (*Zea mays* L.). Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, CCTA-UENF, 95p.
- Santos, M. F., Aguiar, A. M., Filho, N. O. et al. (2003). Efeitos da seleção recorrente recíproca em um programa de melhoramento de milho. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*. Porto Seguro, Bahia.
- Scapim, C.A.; Carvalho, C.G.P.; Cruz, C.D. (1995) Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 30 (5): 683-686.

## 4.2. UTILIZAÇÃO DE ÍNDICES DE SELEÇÃO ESTRATIFICADO APLICADOS A UM PROGRAMA DE SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA DE FAMÍLIAS DE IRMÃOS COMPLETOS EM MILHO (*ZEA MAYS L*)

### 4.2.1. RESUMO

Como diferentes índices de seleção representam diferentes alternativas de seleção e conseqüentemente ganhos, este trabalho teve como objetivo testar os diferentes índices de acordo com os melhores ganhos preditos e praticar a seleção dos indivíduos superiores dentro de cada 'set', de modo que se realize uma seleção estratificada. Foram avaliadas 100 famílias de irmãos completos originadas do cruzamento entre as populações CIMMYT e Piranão, em dois ambientes, Campos dos Goytacazes e Itaocara, no delineamento em blocos casualizados, e ainda foram agrupadas em 'sets', devido ao elevado número de famílias. Os índices de seleção empregados foram os de Smith e Hazel, Mulamba e Mock e Williams. O índice de Smith e Hazel permitiu a predição de ganhos superiores (14,26% para a característica produção) em um maior número de caracteres, sendo, portanto, o índice eleito para se selecionar as quarenta famílias superiores. No entanto, diferentemente da maneira clássica de se utilizar o índice de seleção, a seleção simultânea para o 10º ciclo, foi feita dentro de cada 'set'. Para isso, selecionou-se os 10 melhores genótipos, fornecidos pelo índice de Smith e Hazel, dentro de cada 'set', de modo que foi possível aumentar, mesmo em pequena escala, o ganho genético, e ainda permitir um maior controle do efeito ambiente, pois com a estratificação, todos os 'sets' vão contribuir com o mesmo número de genótipos, não havendo, portanto, o favorecimento de genótipos que se encontrem em apenas um 'set'.

#### 4.2.2. ABSTRACT

Since different selection indexes represent different selection alternatives and consequently gains, this work has had as objective, to test different indexes according to the best predicted gains and practice the selection of superior individuals within each set, so that a stratified selection can be fulfilled 100 full sib families that stemmed from across breeding between the populations CIMMYT and Piranão, have been estimated in two environments, Campos and Itaocara, in randomized block design with replications within set, besides having been clustered in sets, due to the number of families. The selection indexes that were employed, have been Smith and Hazel, Mulamba and Moch and Williams. Smith and Hazel index has allowed the prediction of superior gains (14,26%) for the characteristics production out of a larger number of characters, thus it has become the index picked out to selection forty superior families. Nevertheless, quite different from the classical way to utilize the selection index, the simultaneous selection for the ten cycle, has been made within each set. Thus, the ten superior genotypes have been selected, provided by Smith and Hazel index, within each set, so that it could be possible to enhance the genetic gain, even of small scale and on the other hand, allow a larger control over the environment effect, as due to stratification, all sets are going to contribute with the same number of genotypes and therefore, there should not be any favoring of genotypes that are in a single set alone.

#### 4.2.2. INTRODUÇÃO

De forma geral, no melhoramento genético do milho, duas alternativas podem ser utilizadas em conjunto: a obtenção de populações melhoradas para a consecução de variedades e a obtenção de linhagens para a formação de híbridos. Neste aspecto, a utilização adequada de métodos de seleção está diretamente vinculada ao aumento da freqüência de genes favoráveis na população em melhoramento (Paterniani, 1980).

Considerando que os materiais genéticos realmente superiores são aqueles que reúnem simultaneamente uma série de atributos favoráveis que satisfaça as exigências do consumidor, o índice de seleção surge como um super-caráter, estabelecido pela combinação linear de vários caracteres (Cruz e Regazzi, 2001).

Segundo Cruz e Regazzi (2001) os índices de seleção permitem obter valores que quantificam o potencial genético de um indivíduo, com base em uma série de características. Ademais, o uso de índices de seleção permite a identificação de genótipos superiores em todas as características consideradas no índice, sendo, dessa forma, uma técnica útil, independente da existência ou não de correlações entre os caracteres, e deveriam ser usados com mais freqüência nos programas de melhoramento (Vilarinho 2003; Santos 2005).

Cruz et al. (1993), verificaram ganhos simultâneos nas características teor de óleo e rendimento de espigas, em progênies de irmãos completos de milho comum, usando índice de seleção, o que não foi possível quando utilizaram apenas a seleção direta e a indireta.

Atualmente existem vários métodos para obtenção desses índices: Smith e Hazel, Willians, Pesek e Baker, Mulamba e Mock, dentre outros, mas, como diferentes índices representam diferentes alternativas de seleção e conseqüentemente ganhos (Cruz e Regazzi, 2001), este trabalho teve como objetivo testar os diferentes índices através de ganhos preditos e praticar a seleção dos indivíduos superiores dentro de cada 'set', de modo que se realize uma seleção estratificada em sets.

#### 4.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.2.4.1. Material genético

Foram utilizadas 100 famílias de irmãos completos de duas populações de milho pertencentes a dois grupos heteróticos distintos: CIMMYT e Piranão. Tais populações já foram submetidas a nove ciclos de seleção recorrente recíproca.

##### 4.2.4.2. Obtenção das famílias

O plantio das populações para a obtenção das progênies de irmãos completos foi realizado em março de 2004, no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo em Campos dos Goytacazes.

As populações foram plantadas em fileiras alternadas com uma profundidade de 0,05m e cada fileira continha 6,00m e distanciadas em 1,00m entre si, e cada planta dentro de cada fileira foi espaçada por 0,40m.

Os seguintes procedimentos foram adotados: as espigas foram cobertas antes de soltar os estigmas com sacolas de plástico próprias a este fim. Simultaneamente, os pendões foram cobertos de forma que não ocorresse contaminação por pólen estranho. Este procedimento é extremamente necessário, pois o pólen perde sua viabilidade após oito horas do início de sua liberação, de modo que qualquer pólen viável que se encontrar no saco de papel do dia seguinte ao preparo só poderá ter sido proveniente do pendão coberto,

Os cruzamentos foram feitos em plantas prolíficas, selecionadas dentro de cada par de fileiras, de maneira que a primeira espiga (superior) foi produto de autofecundação e a segunda espiga, produto de cruzamentos. As plantas de cada fileira, num total de quinze, foram numeradas para posterior identificação por ocasião dos cruzamentos.

Para cada par de plantas foram feitas duas autofecundações e dois cruzamentos, os quais foram recíprocos. Deste modo, foram obtidas 100 famílias de irmãos completos e 200 progênies de autofecundação ( $S_1$ ), 100  $S_1$  da população CIMMYT e 100  $S_1$  da população Piranão. As sementes  $S_1$  foram



armazenadas em câmara fria, sob condições ideais de armazenamento, e as famílias de irmãos completos foram usadas para o ensaio de competição.

#### 4.2.4.3. Avaliação das progênes de irmãos completos

As 100 famílias de irmãos completos foram plantadas em outubro de 2004 e foram avaliadas em delineamento em blocos ao acaso, em dois ambientes diferentes: Colégio Estadual Agrícola Antonio Sarlo em Campos dos Goytacazes (Norte do Estado do Rio de Janeiro), e na Estação Experimental da PESAGRO-RIO em Itaocara (Noroeste Fluminense).

Dado o alto número de tratamentos (100 famílias), as mesmas foram agrupadas em 'sets', sendo que cada 'set' conteve 25 plantas, com duas repetições por 'set', totalizando 4 'sets'.

Cada unidade experimental foi cultivada em fileiras de 5,00 m de comprimento, espaçadas 1,00 m uma das outras, e 0,20 m entre plantas, Foram semeadas 50 sementes por fileira, sendo feito o desbaste um mês após o plantio, deixando apenas 25 plantas por fileira. Todos os outros tratos culturais foram seguidos de acordo com as exigências da cultura.

Após o florescimento das plantas, avaliou-se as seguintes características, em cada unidade experimental:

- a) Número de Dias para o Florescimento (flo): número de dias decorridos desde o plantio até a exteriorização do estilo-estigma da espiga (flor feminina) de 50% das plantas da unidade experimental;
- b) Altura de Planta (alp): altura média de seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da folha-bandeira em metros;
- c) Altura de Espiga (ale): altura média das mesmas seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da espiga superior no colmo, em metros;
- d) 'Stand' (npl): número total de plantas no momento da colheita;
- e) Plantas Quebradas (npq): número de plantas que se apresentarem quebradas, abaixo da espiga superior, no momento da colheita;
- f) Plantas Acamadas (npa): número de plantas que apresentarem ângulo de inclinação superior a 45<sup>0</sup> com a vertical, no momento da colheita;

g) Empalhamento (emp): número de espigas mal empalhadas (as quais deixam grãos expostos), no momento da colheita,

Após colheita foram obtidos os dados das seguintes características:

h) Número de Espigas (nes): número total de espigas colhidas;

i) Número de Espigas Doentes (nd): número de espigas manifestando sintomas de doença;

j) Número de Espigas Atacadas por Pragas (neap): número de espigas brocadas;

k) Peso de Espigas (pes): peso, em quilogramas, das espigas despalhadas;

l) Produção (prod): produtividade estimada em t/ha, com base no peso dos grãos debulhados em quilogramas por metro de fileira e

m) Peso de 100 grãos (p100): peso, em gramas, de uma amostra de 100 grãos sadios, com precisão de centésimos de grama.

#### 4.2.4.4. Análise estatística

##### 4.2.4.4.1. Análise de variância

As características mensuradas foram submetidas a uma análise de variância conforme o delineamento em blocos casualizados de acordo com o modelo genético estatístico proposto por Hallauer e Miranda Filho (1981):

onde :

$\mu$  = média experimental;

$E_i$  = efeito fixo do i-ésimo ambiente;

$S_j$  = efeito do j-ésimo 'set' NID  $(0, \sigma^2)$ ;

$ES_{ij}$  = efeito da interação de ambientes e 'sets' NID  $(0, \sigma^2)$ ;

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

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

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

$e_{ijkl}$  = erro experimental NID (0,  $\sigma^2$ );

No Quadro 1 é apresentado o esquema da análise de variância conjunta, com as respectivas esperanças de quadrados médios, sendo que, com exceção de ambiente, as demais fontes de variação foram consideradas aleatórias.

Quadro 1 – Análise de variância e esperança de quadrados médios

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

#### 4.2.4.5. Identificação das progênies superiores

A predição de ganhos por índice de seleção foi baseada em um tipo de planta modelo. Priorizou-se a seleção de famílias mais produtivas e que possuíssem uma menor média de características como número de plantas quebradas, acamadas, número de espigas mal empalhadas, número de espigas doentes e atacadas por pragas.

As estimativas de ganhos por seleção utilizando índices de seleção foram consideradas com base na média da análise conjunta, ou seja, dos dois ambientes estudados (Campos e Itaocara).

Utilizou-se os recursos computacionais do Programa GENES (Cruz, 2001) para as análises estatísticas.

#### 4.2.4.6. Índice de Seleção

Foram testados diferentes índices de seleção, os quais se encontram relacionados abaixo, para a seleção das 40 famílias superiores.

##### 4.2.4.6.1. Índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943) – Índice Clássico

De acordo com Cruz e Ragazzi este índice foi concebido como uma função linear dos valores fenotípicos observados nas várias características. O valor observado de cada característica é ponderado por um dos coeficientes do índice, obtendo-se o seguinte agregado fenotípico:

$$I = b_1P_1 + \dots + b_iP_i + b_nP_n \text{ onde:}$$

I é o índice de seleção;

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

n é o número de características avaliadas.

O valor genético total é representado por uma combinação linear dos valores genéticos da cada característica, ponderados por pesos econômicos conhecidos, definidos pelo pesquisador (Cruz e Regazzi, 2001).

##### 4.2.4.6.2. Índice baseado em Soma de Postos (ou “Ranks”)

Este índice foi proposto por Mulamba e Mock (1978) e consiste em classificar os materiais genotípicos em relação a cada uma das características,

em ordem favorável ao melhoramento. Uma vez classificados, são somadas as ordens de cada material genético referente a cada característica, o que resulta em uma medida adicional tomada com índice de seleção (Cruz e Regazzi, 2001).

#### 4.2.4.6.3. Índice de seleção de Williams

Também conhecido como Índice Base, foi proposto por Williams em 1962, e consiste em uma combinação linear das características de interesse no melhoramento, em que os pesos econômicos são os coeficientes de ponderação do Índice, o que dispensa o uso de matrizes de variância e de covariâncias (Cruz e Regazzi, 2001).

Tal Índice é representado pelo seguinte modelo:

$$I = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n = a' X, \text{ em que:}$$

$I$  é o índice de seleção;

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

$a'$  é o vetor dos pesos econômicos;

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

$x$  é o vetor das médias das  $n$  características que entram no índice.

#### 4.2.4.7. Seleção Direta

Estimaram-se os ganhos de seleção direta para a característica produção ( $GS_{dx}$ ) e os ganhos para as características afetadas pela seleção direta em produção, através do sistema adotado por Eberhart (1970):  $GS_{dx} = DS_x \cdot p \cdot h_x^2$ , sendo:  $DS_x$  = diferencial de seleção;  $p$  = controle parental, e  $h_x^2$  = coeficiente de herdabilidade.

## 4.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 2 consta a relação das famílias de irmãos completos em seus respectivos 'sets' e suas médias de produção em Kg/ha, onde pode ser observado a amplitude de variação entre as médias das famílias, ou seja, há famílias produzindo de 1900,00 kg/ha até 9800,00 kg/ha.

Quadro 2: Média de produção em Kg/ha das famílias de irmãos completos e seus respectivos 'sets'.

<b>Fam. 'set'</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>Fam. 'set'</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>Fam. 'set'</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>Fam. 'set'</b>	<b>MÉDIA</b>
14	9766,00	28	8175,00	64	9800,00	89	9200,00
8	9525,00	35	8150,00	68	8800,00	85	8450,00
10	8575,00	36	7975,00	51	8125,00	80	8425,00
9	8250,00	43	7825,00	70	8075,00	96	8125,00
1	7975,00	40	7500,00	61	8000,00	84	7925,00
20	7925,00	47	7425,00	74	7925,00	92	7800,00
16	7433,00	29	7233,00	71	7900,00	83	7375,00
12	7300,00	48	7225,00	59	7825,00	88	7200,00
13	7100,00	39	7075,00	57	7625,00	81	7100,00
23	7066,00	32	7000,00	67	7500,00	82	7000,00
25	7000,00	38	7000,00	58	7400,00	91	6850,00
6	6866,00	41	6875,00	65	7400,00	76	6775,00
17	6825,00	50	6800,00	75	7200,00	77	6675,00
18	6750,00	27	6300,00	54	7175,00	78	6425,00
2	6500,00	45	6100,00	63	6875,00	93	6425,00
24	6500,00	42	6075,00	69	6650,00	86	6400,00
11	6266,00	31	6066,00	66	6525,00	87	6250,00
4	6225,00	44	6050,00	55	6400,00	90	6000,00
5	6125,00	46	5825,00	53	6350,00	95	5700,00
7	6100,00	49	5600,00	62	6250,00	100	5600,00
3	5433,00	37	5525,00	60	5875,00	98	5400,00
22	5400,00	26	4975,00	56	5650,00	97	5375,00
19	5333,00	34	4700,00	73	4275,00	94	5225,00
15	5300,00	30	4075,00	72	3633,00	79	4500,00
21	0,00	33	0,00	52	2050,00	99	1900,00

Após a aplicação dos três diferentes índices de seleção nas famílias de irmãos completos, optou-se por trabalhar com índice de Smith (1936) e Hazel (1943), assim sendo, das 100 famílias avaliadas, 40 foram selecionadas por meio deste índice, que entre os índices testados, foi o que mais se adequou aos objetivos do programa, ou seja, os ganhos preditos com o índice de seleção de Smith e Hazel foram superiores aos preditos com os outros índices.

Daros et al. (2004), Tardin et al. (2003), Cruz et al. (1993) e Granate et al. (2002), todos trabalhando com milho, mas com diferentes populações, também empregaram o índice de Smith e Hazel para a seleção de suas progênies, pois tal índice foi que mais se adequou aos objetivos de cada programa.

Os valores dos ganhos genéticos para cada característica avaliada se encontram no Quadro 3.

Para característica produção, considerada a mais importante, o ganho foi de 14,26%. Esse resultado está muito acima do ganho encontrado por Tardin (2005, comunicação pessoal). Este autor avaliando o ciclo anterior (9º ciclo) deste mesmo programa de melhoramento, encontrou um ganho de apenas 4,68%.

Tal fato pode ser explicado pelo efeito de uma maior manifestação da heterose neste ciclo atual. Pois no 9º ciclo (ciclo anterior), pela primeira vez no programa, foi aplicada, na etapa de seleção, a ferramenta dos marcadores moleculares, justamente com objetivo de aumentar a distância genética dos materiais selecionados, de forma que os progenitores que deram origem a este ciclo (10º ciclo) foram superiores em suas características morfoagronômicas e divergentes geneticamente, o que já pode estar favorecendo maiores chances de ganhos genéticos superiores.

Quadro 3: Média original dos indivíduos selecionados, herdabilidade, ganhos por seleção direta e os ganhos fornecidos pelos diferentes índices de seleção.

Caracter.	X <sub>0</sub>	h <sup>2</sup>	GS(%)			
			Direta	Mul e Mock	Smith e Haz.	Willians
Prod	6,5092	78,79	15,99	14,63	14,26	13,75
Alp	2,2406	-	-	-	-	-
Ale	1,4543	24,63	0,22	0,01	-0,11	0,38
Npl	19,579	68,84	8,40	6,88	7,81	6,69
Npq	1,4907	46,26	10,75	5,20	8,36	5,01
Npa	1,8875	51,57	10,70	-3,87	-1,2	-1,65
Emp	0,8959	57,21	1,20	-12,11	-16,23	-14,11
Nes	31,114	77,53	11,49	10,76	10,45	10,93
Nd	3,8283	34,87	1,81	0,03	-0,6	0,82
Neap	0,7850	16,85	6,18	3,23	3,37	2,56
Pes	3,9523	78,02	14,87	13,71	13,23	13,23
P100	31,650	58,44	0,15	0,14	0,24	0,57
Flo	70,001	52,03	-0,65	-0,31	-0,62	0,03

<sup>1/</sup> Prod = produção; Alp = altura de plantas; Ale = altura de espiga; Npl = número de plantas; Npq = número de plantas quebradas; Npa = número de plantas acamadas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Nd = número de espigas doentes; Neap = número de espigas atacadas por pragas; Pes = peso de espiga; p100 = peso de 100 grãos e Flo = número de dias para florescimento”,

x<sub>0</sub> = média inicial; h<sub>2</sub> = coeficiente de herdabilidade; direta = ganho por seleção direta; Mul e Moch = índice de seleção de mulamba e Moch; Smith e Haz = índice de seleção de Smith e Hazel e Willians = índice de seleção de Willians.

Outrosim, Daros (2003) também utilizou o índice de Smith (1936) e Hazel (1943) em um programa de seleção recorrente de famílias S<sub>1</sub> em milho pipoca e obteve ganhos de 26,95% para produção e de 17,80% para capacidade de expansão. Santos (2005), trabalhando com seleção recorrente de meios-irmãos em milho pipoca, baseou-se no índice de Mulamba e Mock (1978), e encontrou ganhos preditos de 7,16% para capacidade de expansão e 10,00% de ganho para a característica produção.

Granate et al. (2002) aplicando diferentes índices de seleção na população de milho pipoca CMS-43, elegeram que o índice de Smith e Hazel permitiu a



predição de ganhos superiores em maior número de caracteres. E ainda concluiu que o uso do índice de seleção foi adequado porque permitiu a predição de ganhos simultâneos nas duas características principais do seu trabalho: produção e capacidade de expansão.

Diferentemente da maneira clássica de se utilizar o índice de seleção, a seleção simultânea para o 10º ciclo, foi feita dentro de cada 'set'. Para isso, selecionou-se os 10 melhores genótipos, fornecidos pelo índice de Smith (1936) e Hazel (1943), dentro de cada 'set', de modo que foi possível aumentar, mesmo em pequena escala, o ganho genético, como pode ser visto no Quadro 3.

Desta forma, utilizou-se um índice estratificado, (Quadro 4) o qual forneceu, mesmo em pequena escala, maiores ganhos preditos, e que ainda pode permitir maior controle do efeito ambiente, pois com a estratificação, todos os 'sets' vão contribuir com o mesmo número de genótipos, não havendo, portanto, o favorecimento de genótipos que façam parte de apenas um 'set', o que normalmente ocorre na seleção simultânea tradicional.

A estratificação pode contribuir para expressar o verdadeiro potencial de superioridade do indivíduo, pois, desta forma pode-se também eliminar a superioridade do 'set', o qual pode estar sendo favorecido por uma melhor condição ambiental.

Quadro 4: Resultado do ganho de seleção para os diferentes índices após a seleção estratificada dos genótipos dentro de cada 'set'.

Caract.	X <sub>0</sub>	h <sub>2</sub>	GS(%)			
			Direta	Mul e Moch	Smith e Haz.	Willians
Prod	6,5092	78,79	15,61	14,66	14,39	14,13
Alp	2,2406	-	-	-	-	-
Ale	1,4543	24,63	-0,05	-0,12	-0,20	0,14
Np	19,5799	68,84	8,27	7,43	7,68	7,51
Npq	1,4907	46,26	4,94	2,42	8,95	5,65
Npa	1,8875	51,57	9,33	2,33	0,68	1,54
Emp	0,8959	57,21	1,99	-10,38	-13,04	-11,05
Nes	31,1141	77,53	10,73	10,98	10,40	11,49
Nd	3,8283	34,87	2,15	0,27	0,03	0,99
Neap	0,7850	16,85	5,38	3,90	2,83	2,42
Pe	3,9523	78,02	14,53	13,83	13,28	13,54
P100	31,6509	58,44	0,30	0,16	0,30	0,44
Flo	70,0016	52,03	-0,74	-0,57	-0,71	-0,38

<sup>1/</sup> Prod = produção; Alp = altura de plantas; Ale = altura de espiga; Npl = número de plantas; Npq = número de plantas quebradas; Npa = número de plantas acamadas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Nd = número de espigas doentes; Neap = número de espigas atacadas por pragas; Pes = peso de espiga; p100 = peso de 100 grãos e Flo = número de dias para florescimento".

x<sub>0</sub> = média inicial; h<sub>2</sub> = coeficiente de herdabilidade; direta = ganho por seleção direta; Mul e Moch = índice de seleção de Mulamba e Moch; Smith e Haz = índice de seleção de Smith e Hazel e Willians = índice de seleção de Willians.

Quadro 5: Média das famílias selecionados com os diferentes índices de seleção estratificados.

Características	Xs estrat			
	Direta	Mul e Mock	Smith e Haz.	Willians
Prod	7,7988	7,7200	7,6979	7,6767
Ale	1,4511	1,4473	1,4422	1,4623
Np	21,9313	21,6938	21,7646	21,7146
Npq	1,6500	1,5688	1,7792	1,6729
Npa	2,2292	1,9729	1,9125	1,9438
Emp	0,9271	0,7333	0,6917	0,7229
Nes	35,4188	35,5188	35,2896	35,7271
Nd	4,0646	3,8583	3,8313	3,9375
Neap	1,0354	0,9667	0,9167	0,8979
Pe	4,6884	4,6528	4,6249	4,6384
P100	31,8109	31,7377	31,8117	31,8919
Flo	69,0083	69,2333	69,0417	69,4917

Prod = produção; Ale = altura de espiga; Npl = número de plantas; Npq = número de plantas quebradas; Npa = número de plantas acamadas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Nd = número de espigas doentes; Neap = número de espigas atacadas por pragas; Pes = peso de espiga; p100 = peso de 100 grãos e Flo = número de dias para florescimento”.

$x_0$  = média inicial;  $h_2$  = coeficiente de herdabilidade; direta = ganho por seleção direta; Mule Moch = índice de seleção de Mulamba e Moch; Smith e Haz = índice de seleção de Smith e Hazel e Williams = índice de seleção de Williams.

#### 4.2.6. RESUMO E CONCLUSÕES

Considerando que os materiais genéticos realmente superiores são aqueles que reúnem simultaneamente uma série de atributos favoráveis que satisfaçam as exigências do consumidor, o índice de seleção surge como um super-caráter, estabelecido pela combinação de vários caracteres.

Atualmente existem vários métodos para obtenção desses índices: Smith e Hazel, Willians, Pesek e Baker, Mulamba e Mock, dentre outros, mas, como diferentes índices representam diferentes alternativas de seleção e conseqüentemente ganhos, este trabalho teve como objetivo testar os diferentes índices de acordo com os melhores ganhos preditos e ainda praticar a seleção dos indivíduos superiores dentro de cada 'set', de modo que se realize uma seleção estratificada.

Para tanto das 100 famílias de irmãos completos priorizou-se a seleção das 40 famílias mais produtivas e que possuíssem uma menor média de características consideradas indesejáveis como número de plantas quebradas, acamadas, número de espigas mal empalhadas, número de espigas doentes e atacadas por pragas, dentre outras.

O índice escolhido foi o de Smith e Hazel, que entre os índices testados, foi o que mais se adequou aos objetivos do programa, ou seja, os ganhos preditos com o índice de seleção de Smith e Hazel foram superiores aos preditos com os outros índices, para característica produção, considerada a mais importante, o ganho foi de 14,24%.

No entanto, diferentemente da maneira clássica de se utilizar o índice de seleção, a seleção simultânea para o 10º ciclo, foi feita dentro de cada 'set'. Para isso, selecionou-se os 10 melhores genótipos, fornecidos pelo índice de Smith (1936) e Hazel (1943), dentro de cada 'set', de modo que foi possível aumentar, mesmo em pequena escala, o ganho genético (14.39%).

Com base nesses resultados pode-se concluir que:

- a) Os ganhos preditos com o índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943) são superiores aos preditos com os outros índices e
- b) A utilização do índice estratificado permitiu o aumento dos ganhos preditos para a maioria das características consideradas mais importantes e um decréscimo (valores negativos) para características indesejáveis (altura de espiga, número de plantas quebradas, número de espigas doentes e número de espigas atacadas por pragas).

## 4.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cruz, C.D. (1997) Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV

Cruz, C. D. e Regazzi, A. J. (2001). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ª edição Viçosa: UFV. 390p.

Cruz, C. D.; Vencovsky, R.; Silva, S. O.; Tosello, G. A. (1993) Comparison of gains from selection among corn progenies, based on different criteria. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, V. 16, n. 1, p. 79 – 89.

Daros, M. (2003) Melhoramento de milho pipoca: Seleção recorrente em famílias de irmãos completos e progênies  $S_1$ . Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, CCTA-UENF, 92p.

Daros, M.; Amaral Jr, A. T.; Pereira, M.G; Santos, F.S.; Gabriel, A. P.C.; Scapim, C. A.; Freitas Jr, S.P. and Silvério, L. (2004) Recurrent selection in inbred popcorn families. Sci. Agricola Vol 61, n 6, p 609 – 614, Nov/Dec 2004.

Embrapa (1993). Recomendações técnicas para o cultivo o milho, 204p

Granate, M. J.; Cruz, C. D.; Pacheco, C. A. P. (2002) Predição de ganho genético com diferentes índices de seleção no milho pipoca CMS-43. Pesq. Agrop. Bras. Brasília, V.37, n 7, p. 1001 – 1008, Jul. 2002.

Santos, F.S. (2005) Seleção recorrente entre famílias de meios-irmãos da população UNB-2U de milho pipoca (*Zea mays* L.). Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, CCTA-UENF, 95p.

Tardin, F.D.; Pereira, M.G.; Santos, F.S.; Amaral Júnior, A. T., Daros, M., Gabriel, A.P.C., Daher, R.F. (2003) Utilização de índices clássicos de seleção aplicados

em programa de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos em milho (*zea mays* L.) Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia.

Vilarinho, A. A.; Viana, J.M.S.; Santos, J.F.; Câmara, T.M.M. (2003) Eficiência da seleção de progênies  $S_1$  e  $S_2$  de milho pipoca, visando à produção de linhagens. *Bragantia*, Campinas – SP, 62(1): 9 –17.

### 4.3. ESTUDO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA VIA AFLP ENTRE DUAS POPULAÇÕES DE MILHO NO 10º CICLO DE SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA ENTRE FAMÍLIAS DE IRMÃOS COMPLETOS

#### 4.3.1. RESUMO

Conhecendo-se o nível de variabilidade genética da população e sabendo-se quais os indivíduos mais distantes geneticamente, pode-se direcionar os cruzamentos com maior exatidão. De modo que o objetivo do presente trabalho foi avaliar a divergência genética, via marcadores moleculares do tipo AFLP, entre e dentro das populações de milho CIMMYT e Piranão, as quais já foram submetidas a dez ciclos de Seleção Recorrente Recíproca. Para tanto com base nos resultados do índice de seleção de Smith e Hazel, selecionou-se as 40 famílias superiores de irmãos completos, recorreu-se então, aos seus respectivos  $S_1$ , que se encontravam armazenados em câmara fria, para submetê-los a 'genotipagem' via marcadores AFLP. A combinação de três 'primers' EcoRI/MseI, apenas de fluorescência azul, gerou um total de 105 fragmentos, sendo 85 polimórficos, com uma média de 28 marcas polimórficas por combinação de 'primer'. Pôde-se concluir que as populações CIMMYT e Piranão, mesmo já tendo sido submetidas a 10 ciclos de seleção recorrente recíproca, ainda possuem variabilidade genética intra e interpopulacional suficiente para a continuidade do programa Seleção Recorrente Recíproca de milho comum.

#### 4.3.2. ABSTRACT

Knowing the level of the population genetic variability and the most genetically distant individuals, one is likely to direct crossbreedings towards higher accuracy. Thus, the aim of the current work has been to estimate the genetic deviation via AFLP, between and within CIMMYT and Piranão corn populations, which had already been submitted to ten cycles of reciprocal recurrent selection. Thus, based on the index results of Smith and Hazel selection, 40 full sib superior families have been selected, and their respective  $S_1$ , which were stored in cold chamber, have been scrutinized, in order to submit them to genotypic selection via AFLP markers. Combination of these primers EcoRI/MseI, of blue fluorescence alone, gave rise to a total of 105 fragments, 85 polymorphic ones, averaging 28 polymorphic marks for primer combination. The CIMMYT and Piranão populations, even having been submitted to 10 cycles of reciprocal recurrent selection, still possess sufficient intra and interpopulational genetic variability to go on with the corn reciprocal recurrent selection program.

#### 4.3.3. INTRODUÇÃO

As populações de milho devem ser continuamente melhoradas para serem fontes de cultivares por longos períodos, assim sendo, a escolha de genitores e o planejamento de cruzamentos constituem a etapa crucial de um programa de melhoramento (Borém, 2001).

Avaliações de diversidade genética dos potenciais genitores por meio de marcadores moleculares são muitas vezes correlacionados com resposta heterótica (Townsend et al., 2005). A escolha de genitores mais divergentes pode aumentar a performance dos híbridos obtidos ou simplesmente aumentar a chance de obter diferentes combinações gênicas de interesse (Pinto, 2002).



Por isso, a seleção recorrente recíproca merece destaque, pois tal método visa explorar tanto os efeitos aditivos bem como os desvios de dominância, favorecendo a heterose para a obtenção de híbridos e também a extração de linhagens das populações em estudo (Santos, 2003; Pinto, 2002).

Segundo Vieira et al. (2005) a dissimilaridade genética estimada por meio de marcadores moleculares, quando acompanhadas de informações fenotípicas, é importante para a seleção de genótipos. Tal expectativa decorre do fato de a heterose depender da existência de dominância no controle do caráter e da dissimilaridade entre os genótipos (Falconer, 1987).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) vem mantendo um programa de melhoramento de milho que já se encontra no 10º Ciclo de Seleção Recorrente Recíproca, e considerando que cada ciclo de seleção recorrente envolve basicamente três etapas: 1- desenvolvimento de progênies; 2- avaliação e seleção das progênies; e 3- recombinação das progênies superiores, é fundamental que as progênies selecionadas e, portanto, a serem recombinadas, sejam suficientemente divergentes. Isso é fundamental para que o processo de recombinação restabeleça a variabilidade genética, assegurando a continuidade dos próximos ciclos.

Embora este método tenha como premissa manter a variabilidade genética, é importante que se monitore o quanto há de variabilidade nas populações trabalhadas e também nas famílias selecionadas. Hallauer (1971), por exemplo, trabalhando com a população BSSS, verificou uma redução das estimativas dos componentes de variância após quatro ciclos de seleção, enquanto Helms et al. (1989), na mesma população, descreveram essa redução após nove ciclos de seleção.

Segundo Vilela (2004), Holthaus e Lamkey (1995) após submeterem a população BSSS a onze ciclos de Seleção Recorrente Recíproca, observaram uma resposta abaixo do esperado devido a duas razões: primeira, mudança da performance da população sobre a metodologia de seleção, e segunda, que a população estava com uma taxa de endogamia próxima a 37%, e ainda, puderam comprovar que todas as estimativas dos componentes de variância para produção de grãos foram reduzidas após os onze ciclos de seleção.

Portanto, conhecendo-se o nível de variabilidade genética da população e sabendo-se quais os indivíduos mais distantes geneticamente, pode-se direcionar

os cruzamentos com maior exatidão, de modo que o objetivo do presente trabalho foi avaliar a divergência genética, via AFLP, entre e dentro das populações de milho CIMMYT e Piranão, as quais já foram submetidas a dez ciclos de Seleção Recorrente Recíproca.

Assim, espera-se que os progenitores a serem recombinados sejam superiores, portadores de maior frequência de alelos favoráveis, e divergentes o suficiente para a manutenção da variabilidade genética e maior exploração da heterose durante a condução de seleção recorrente.

#### 4.3.4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.3.4.1 Material Genético

Uma etapa importante na seleção recorrente é a escolha de populações de elevado potencial agrônômico. Neste sentido, com base nos resultados do índice de seleção de Smith e Hazel, das 100 famílias de irmãos completos avaliadas selecionou-se as 40 famílias, consideradas superiores, as quais foram obtidas pelo cruzamento entre as populações CIMMYT e Piranão.

Das 40 famílias selecionadas, recorreu-se as sementes dos seus respectivos  $S_1$ , que se encontravam armazenados em câmara fria, para submetê-los a 'genotipagem' via marcadores AFLP.

##### 4.3.4.2. Avaliação da diversidade genética (marcadores de DNA)

Para a análise da diversidade via marcadores de DNA, parte das sementes  $S_1$  em estoque foram plantadas em vasos para extração de DNA em casa de vegetação. Foram coletadas pelo menos 10 plântulas de cada genótipo pertencentes a grupos heteróticos distintos, totalizando 80 genótipos, e em seguida as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e acondicionadas em ultrafreezer ( $-86^{\circ}\text{C}$ ) em tubos fechados com capacidade de 15 ml. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de

Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF), em Campos dos Goytacazes - RJ.

#### 4.3.4.3. Extração do DNA

Aproximadamente 200mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de capacidade 1,5 ml e imersos em nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle, 1990, com modificações, descritas a seguir. Foram adicionados ao tubo, 800µl do tampão de extração pré-aquecido contendo 1% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 8,0), 1% PVP e 0,1% 2-mercaptoethanol, incubando-se a 65° C por 30 a 40 minutos, e agitando-se suavemente os tubos a cada 10 minutos. Em seguida centrifugou-se a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (600µl) foi transferido para novos tubos e igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) adicionado e continuamente invertido até tornar-se túrgido. Após centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm, ao sobrenadante, foi então novamente adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e então se adicionou isopropanol gelado, com suave inversão e posteriormente foi mantido em geladeira por 12 horas. Após este intervalo, centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos, obtendo-se um “pellet”, que foi lavado duas vezes com 300µl de etanol 70% e uma vez com 300µl de etanol 95%, desidratado em condições naturais, após as lavagens, o material foi ressuspensão em 200µl de solução Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e incubado com RNase numa concentração final de 40 µg/ml a 37° C por 30 minutos. Após a adição de 20 µl de NaCl 5M e 140 µl de isopropanol gelado, incubou-se a mistura por mais 12 horas em geladeira (4° C). A seguir, centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos, desidratou-se novamente como descrito anteriormente e, finalmente, ressuspendeu-se o “pellet” em 200µl de solução de TE. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas por meio de gel de agarose 0,8%, e posteriormente padronizadas na concentração de 10ng.µl<sup>-1</sup>.

#### 4.3.4.4. Análise molecular via AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)

Os procedimentos foram descritos por Vos et al. (1995), com algumas alterações sugeridas por AFLP™ Core Reagent Kit (GIBCO BRL – LIFE TECHNOLOGIES).

##### 4.3.4.4.1. Digestão do DNA genômico e ligação de adaptadores

Foram utilizados os reagentes do AFLP core reagent kit (GIBCO BRL – LIFE TECHNOLOGIES) para a etapa de digestão e ligação do DNA genômico. Em tubos de PCR individuais com tampa devidamente identificados foram

incubados por um período de 2 horas à temperatura de 37 °C. Em seguida, a mistura foi incubada por 20 minutos a 65 °C para inativar as endonucleases de restrição e as amostras foram colocadas em gelo e levemente centrifugadas. Ao

de T4 DNA ligase. As amostras foram levemente agitadas e incubadas a 20 °C por duas horas. Foi procedida então a primeira diluição 1:10 da mistura de

nova amostra diluída, foi utilizada no segundo passo da técnica do AFLP, que consiste na amplificação pré-seletiva.

4.3.4.4.2. Amplificação pré-seletiva

Foram utilizados os reagentes do 'kit AFLP template preparation e pre-amplification module' (APPLIED BIOSYSTEMS). Em tubos de PCR em tiras de 8 unidades foram adicionados os seguintes componentes da reação de

mix [MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTP (5mM), Triton 1% , tampão 10X (2,0 µl) e 0,4 U de *Taq* DNA Polimerase]. As condições de reação foram: 72 °C por 2 minutos; 20 ciclos constituídos de 94 °C por 20 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; e, ao final dos ciclos, 60 °C por 30 minutos. Foi utilizado o termociclador marca Eppendorf Mastercycler Gradient. Após esta etapa, os



d



b

#### 4.3.4.4.3. Amplificação seletiva

Para a etapa de amplificação seletiva (também realizada em tubos de PCR em tiras de oito unidades) foram utilizados iniciadores marcados com fluorescências de cores azul (FAM). Foram adicionados os seguintes



L



mix'. As amostras foram então submetidas ao termociclador programado para as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 10 ciclos compostos de: 94 °C por 20 segundos, 66 °C por 30 segundos no ciclo 1/10, decrescendo até 57 °C por 30 segundos no ciclo 10/10 e 72 °C por 2 minutos e no final dos ciclos, 60 °C durante 30 minutos.

#### 4.3.4.4.4. Resolução dos fragmentos em gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese, foram adicionados em tubos de PCR em



formamida deionizada, blue dextran 25 mM EDTA (solução carreadora) e 'gene scan – 500 Rox', marcado com fluorescência vermelha, servindo como padrão de comprimento de fragmentos. Estas amostras então foram desnaturadas em termociclador (95 °C) por 3 minutos e rapidamente resfriadas em gelo. Para o preparo do gel de acrilamida de alta resolução, usou-se 14,4 g de uréia, 20,8 mL de água milli-Q ultrapura, 4 mL de Acrilamida + bis Acrilamida, 4 mL de TBE, 144

μ

um volume de 40 mL.

A eletroforese constou de uma pré-corrída a 1000 V por 3 minutos, seguida de corrída a 3000 V de 1,5 minutos, em seguida, o pente foi retirado e procedeu-se então a corrída por cinco horas. Foi utilizado o seqüenciador automático de DNA ABI-PRISMA 377 (APPLIED BIOSYSTEMS), em placas de 48 cm.

As imagens foram obtidas a partir do software 'GeneScan Analysis'. Para a análise dos polimorfismos, o programa 'Genotyper DNA Fragment Analysis' foi utilizado, onde através do mesmo foram obtidas as matrizes binárias de (0)-ausência e (1)-presença de banda. No entanto, foram também realizadas análises visuais dos géis, visando uma maior confiabilidade dos dados.

Foram utilizados 3 pares de combinações de iniciadores EcoRI e MseI.

#### 4.3.4.5. Análise dos dados

Foi realizada a análise de agrupamento entre os genótipos adotando-se como medida de dissimilaridade o Complemento Aritmético do Índice de Jaccard e como técnicas de agrupamento os métodos de Tocher e de Ward.

O Complemento Aritmético do Índice de Jaccard é dado por:

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

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

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

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

Sendo; 1 presença de banda e 0 a ausência de banda.

#### 4.3.4.6.. Métodos de Agrupamento

Para a análise dos resultados foram utilizados os recursos computacionais do programa Genes (Cruz, 2000).

A matriz de distâncias com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard foi utilizada para o agrupamento dos genótipos pelos métodos de Tocher e de Ward.

a) Método de Otimização de Tocher:

Esse método adota o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos.

O método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, sobre a qual é identificado o par de progenitores mais similares. Estes indivíduos formarão o grupo inicial. A partir daí é avaliada a possibilidade de inclusão de novos progenitores, adotando-se o critério anteriormente citado.

b) Método Hierárquico de Ward:

Este método foi utilizado originalmente para variáveis quantitativas, mas passou posteriormente a ser utilizado também para variáveis qualitativas. O método minimiza a soma de quadrados dentro dos grupos e maximiza a soma entre grupos. A estratégia de Ward é um algoritmo que procura partições dos grupos próximos àqueles ótimos, sendo que a estratégia não conduz necessariamente à partição ótima, mas em muitos casos a aproximação será considerada satisfatória na prática (Asensio, 1989, Martins, 2000).

#### 4.3.4.7. Recombinação das progênies selecionadas

Os 40 progenitores de cada população, identificados como superiores na etapa de avaliação morfoagronômica foram plantados em linhas individuais de 6 metros de comprimento, espaçadas de 1 m uma da outra, com 15 plantas, dentro da linha, distanciadas em 0,4 m entre si. Todos os tratos culturais foram realizados conforme a necessidade da cultura (Facelli e Dourado Neto, 2000).

Dos 40 genótipos  $S_1$ , de cada população, 15 foram eliminados e os 25 restantes foram utilizados para recombinação e formação do 10<sup>o</sup> ciclo das populações Cimmyt e Piranão. Tal seleção procedeu-se de forma a maximizar a variabilidade genética nas populações trabalhadas e tentando manter, e até mesmo ampliar, a distância genética entre as mesmas. Na escolha daqueles genótipos que deveriam ser mantidos, e então recombinados, e daqueles que

deveriam ser eliminados, levou-se em consideração diversos fatores, podendo citar em nível crescente de importância:

1º – Eliminação dos genótipos considerados como ‘contaminantes’;

2º – Eliminação dos Genótipos que tiveram problemas de germinação gerando poucas plantas para serem utilizadas para recombinação;

3º– Eliminação de genótipos geneticamente próximos, mantendo aqueles cujas médias de produção de grãos foram superiores;

4º - Eliminação dos genótipos que se posicionaram muito próximos da área de intercessão dos dois grupos heteróticos na dispersão gráfica.

Aos setenta dias após o plantio, iniciou-se o processo de recombinação em lotes isolados, das famílias selecionadas. De forma análoga à obtenção das progênes, as espigas foram cobertas antes da emissão dos estigmas, utilizando-se sacolas plásticas.

Havendo espigas aptas, ou seja, que emitiram o estigma, podendo ser polinizadas, efetuou-se a preparação dos pendões, que consistiu em cobrir aqueles que se encontravam em fase inicial de liberação de grãos de pólen, considerada quando 1/3 ou menos das anteras estivessem abertas. Tais pendões eram utilizados no dia seguinte ao preparo para garantir que o pólen viável contido na sacola era realmente do pendão coberto. Assim, os grãos de pólen de todos os pendões, previamente preparados, eram colhidos e misturados para formarem assim, uma única amostra. Essa amostra de grãos de pólen foi utilizada para polinizar todas as espigas receptivas, com exceção daquelas cujas plantas ofereceram grãos de pólen para compor a referida amostra, garantindo assim, que não ocorresse autofecundação. Tal procedimento foi repetido por diversos dias, enquanto existiram pendões liberando pólen e espigas aptas a serem fecundadas.



#### 4.3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra um gel de agarose 0,8%, onde pode-se avaliar a integridade das amostras de DNA extraído dos 80 indivíduos S<sub>1</sub> das duas populações. A qualidade do DNA extraído é um fator de grande importância para o sucesso da técnica de AFLP, pois um alto nível de pureza é necessário para garantir uma digestão completa do genoma pelas enzimas de restrição.

Ainda em relação a qualidade do DNA, é importante que se enfatize que um DNA de baixa qualidade (desnaturado ou com impurezas) pode conter seqüências originadas por uma falsa ação das endonucleases utilizadas, causando, desta forma, uma alteração no padrão (ausência ou presença) de marcas no gel. Sendo assim, foi necessária a eliminação de dois genótipos pertencentes ao grupo Piranão, pois, tais genótipos, não apresentaram boa qualidade de amplificação durante as reações, sendo, portanto, ambos eliminados das análises.

Assim, uma má qualidade do DNA aliado a uma digestão imperfeita (parcial) pode facilmente levar a interpretações erradas na análise das marcas, por isso, torna-se muito útil e importante o monitoramento do material genético após a realização de algumas das etapas do protocolo de AFLP, pois desta maneira pode-se ganhar tempo, economizar gastos e melhorar a qualidade das reações.

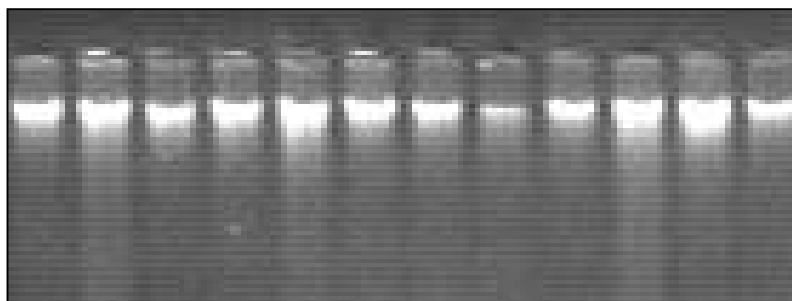


Figura 1: Resultado do gel agarose 0.8% para análise da quantificação e da integridade do material genético extraído pelo protocolo Doille e Doyle modificado de parte das amostras de milho

A combinação de três ‘primers’ EcoRI/Msel, apenas de fluorescência azul, gerou um total de 105 fragmentos, sendo 85 polimórficos, com uma média de 28 marcas polimórficas por combinação de ‘primer’ (figura 2), sendo que apenas os fragmentos polimórficos foram computados nas matrizes de dados binários.

No Quadro 1 estão listadas as combinações dos ‘primers’ utilizados nas reações de amplificação, suas seqüências e seus respectivos números de marcas fornecidas por reação.

Quadro 1: Combinações de ‘primers’ utilizados nas reações de amplificação seletiva para obtenção dos fragmentos de AFLP.

Combinação	Seqüência	Nº Polimórficas	Nº Monomórficas
Eco (aca)/Msel (cta)	Acacta	28	6
Eco (acat)/Msel (cag)	Actcag	25	5
Eco (aag)/Msel (ctc)	Aagctc	32	9

Esses resultados demonstram o poder discriminatório do AFLP, pois com apenas três combinações foi possível diferenciar os materiais genéticos utilizados e agrupa-los em seus devidos grupos heteróticos. Zhang et al., (1999) trabalhando com 27 genótipos de grama (*Cynodon ssp*), também puderam constatar o poder de análise do AFLP, pois apesar dos genótipos serem semelhantes morfológicamente, puderam ser diferenciados com um único par de ‘primer’.

O programa Genotyper, software que analisa automaticamente as marcas, ao analisar os géis, considerou muitos fragmentos que não eram confiáveis, de modo que a análise passou a ser visual, o que acarretou uma diminuição no número de marcas polimórficas, de 154 para 85 marcas.

Padilha (2002), utilizando da técnica de AFLP preconiza que utilizando-se diferentes ‘primers’ fluorescentes em uma mesma reação é possível a obtenção de muitos fragmentos com alta resolução em um mesmo gel, além de reduzir tempo e gastos. No entanto, em seu trabalho, a extração automática para os

dados de AFLP não foi possível e a obtenção da matriz binária foi feita manualmente. Como também observado por Schwarz et al. (2000), não foi possível balancear as diferenças de intensidades das cores utilizadas na marcação dos 'primers', o que normalmente pode ser realizado quando as amplificações são feitas separadamente.

Na figura 3, pode-se observar a diferença no padrão de marcas entre as duas populações, o que contribui para demonstrar a diferença entre os grupos heteróticos e evidenciar a distância genética entre as duas populações, o que está diretamente relacionado a heterose, pois esta depende diretamente da distância genética dos progenitores.

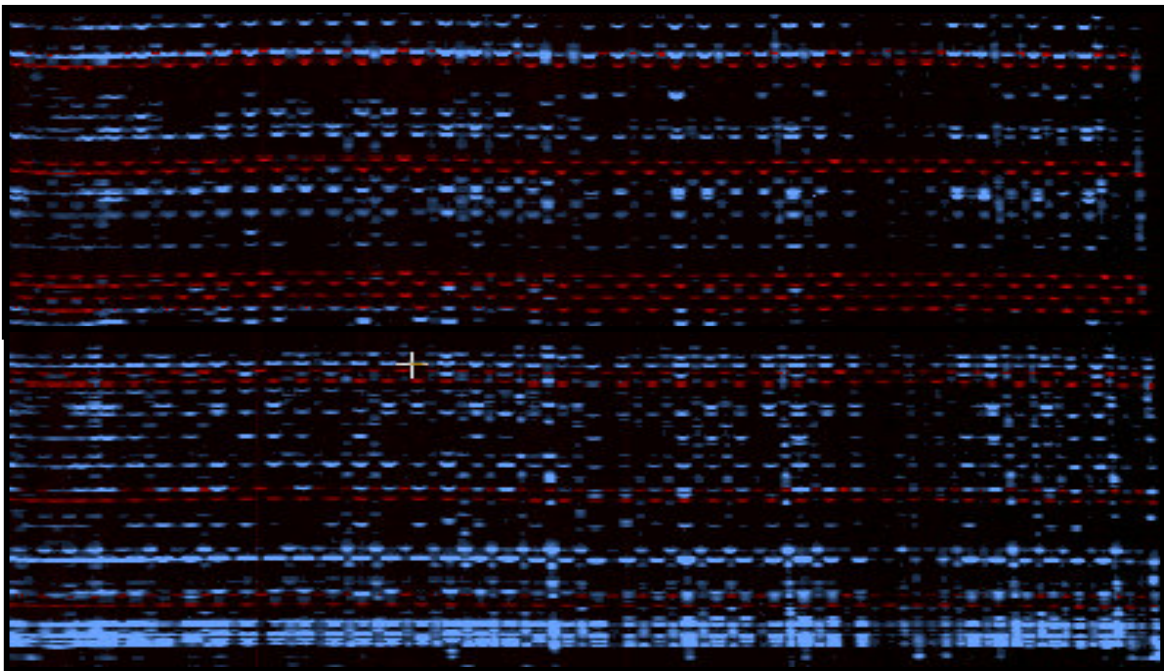


Figura 2: Foto do gel de AFLP com a combinação Eco (aag)/MseI (ctc) demonstrando alto número de fragmentos.

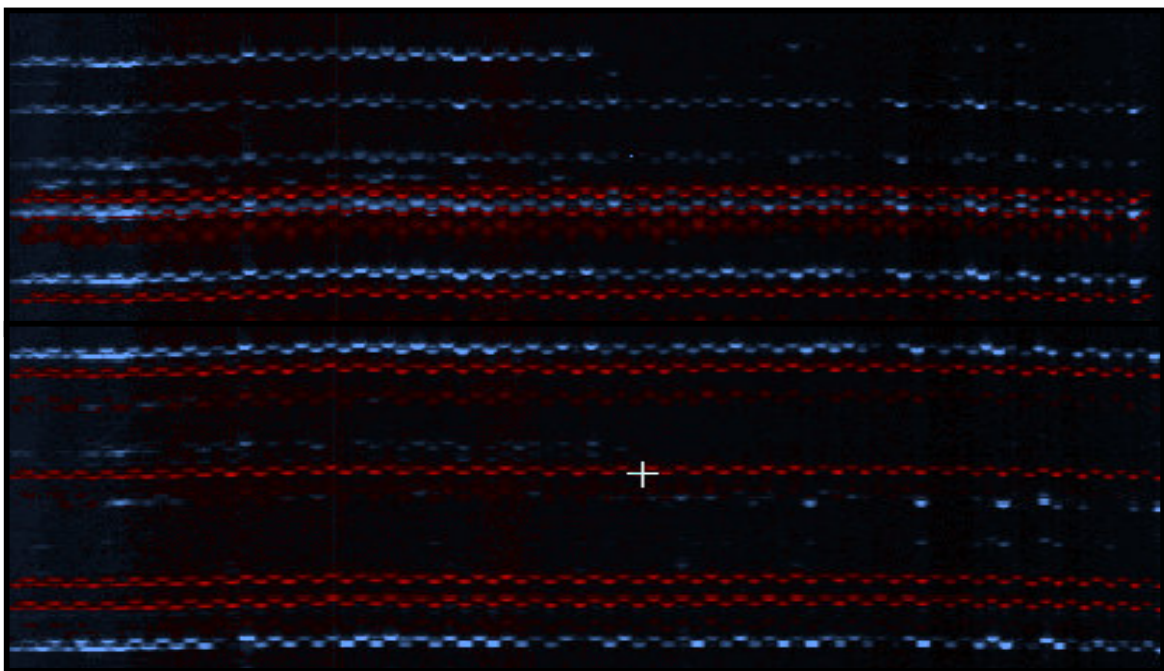


Figura 3: Foto do gel de AFLP com a combinação Eco (aca)/MseI (cag) mostrando um padrão diferente de amplificação entre as duas populações.

Na literatura vários índices têm sido testados (Vieira, 2005), no entanto, os dados binários foram analisados com base na matriz de Jaccard. Padilha (2002), trabalhando com marcadores microssatélite e AFLP para estudo de divergência genética em milho, não observou alterações na formação dos grupos quando a análise foi realizada utilizando os índices de Jaccard e o de Nei e Li. E ainda notou que a ordem na disposição dos grupos no dendograma ficou melhor visualizada com o índice de jaccard. Esses resultados estão condizentes com os de Meyer (2002), que concluiu que índices como o de Jaccard e Nei e Li, os quais desconsideram a ausência conjunta de marcas, permitiram a obtenção de resultados semelhantes para o agrupamento de linhagens de milho analisadas por marcadores dominantes como o AFLP e o RAPD.

A matriz de Jaccard permitiu indicar que os genótipos mais distantes foram os de número 34 e 58, por apresentarem um valor de distância igual a 0,6383, enquanto os mais similares foram os genótipos 60 e 74 com distância de 0,0740, o que condiz com resultados esperados, pois 34 e 58 fazem parte de grupos heteróticos distintos, enquanto 60 e 74 pertencem a mesma população (Piranão).

No agrupamento pelo método de Tocher (Quadro 2), foram formados 32 grupos, sendo que o maior grupo apresentou 21 indivíduos, vale ressaltar a presença de um grande número de grupos formado apenas por um indivíduo, denotando, assim, a existência de famílias bem dissimilares, o que é de fundamental importância para o procedimento de seleção. Os genótipos 60 e 74, identificados como indivíduos mais próximos pela matriz de Jaccard, estiveram presentes no mesmo grupo (grupo 1), já os genótipos mais distantes, 34 e 58, apareceram em grupos diferentes, o que contribui para demonstrar que o genótipo 58 é dos mais divergentes do grupo.

Quadro 2. Agrupamento pelo método de Tocher, de 78 genótipos de milho com base em 85 marcas polimórficas de AFLP utilizando-se o Complemento Aritmético do Índice de Jaccard.

<b>Grupo</b>	<b>Genótipo</b>
I	40, 60, 46, 44, 74, 53, 45, 78, 47, 70, 61, 48, 65, 51, 57, 66, 68, 62, 50, 55 e 49
II	1, 7, 9, 26, 22, 32, 34, 36, 25, 15 e 28
III	63, 72 e 76
IV	2, 21 e 18
V	4, 8, 6, 11 e 5
VI	52, 71 e 42
VII	17, 37 e 38
VIII	56 e 73
IX	27 e 33
X	20 e 30
XI	24
XII	19
XIII	59
XIV	3
XV	16
XVI	12
XVII	13
XVIII	31
XIX	14
XX	41
XXI	35
XXII	77
XXIII	29
XXIV	23
XXV	10
XXVI	39
XXVII	64

Continua...

...Continuação

XXVIII	54
XXIX	75
XXX	67
XXXI	43
XXXII	58

O diagrama de árvore contendo as famílias, gerado pelo método de Ward, (figura 4) mostrou nitidamente a formação de dois grandes grupos, separando as populações CIMMYT e Piranão. Também foi observado no dendograma, dentro dos dois grandes grupos formados, a presença de subgrupos, o que pode ser confirmado com o dendograma individual das populações CIMMYT e Piranão, (figuras 6 e 7 respectivamente), tal fato demonstra existência de variabilidade entre e dentro das populações, indicando possibilidades de ganhos 'per si', por meio da seleção, bem como de ganhos pela exploração da heterose num cruzamento interpopulacional ou entre linhagens oriundas das distintas populações.

A formação dos dois grandes grupos (CIMMYT e Piranão), aliado à indicação de ampla variabilidade dentro dos respectivos grupos indica a viabilidade para dar prosseguimento ao programa de seleção recorrente.

Esses resultados foram condizentes com os dados de Gabriel (2004), em que utilizando a técnica de RAPD para o estudo de divergência genética também entre famílias de irmãos completos em milho, observou uma alta variabilidade genética tanto entre quanto dentro das populações.

Ainda em relação ao dendograma obtido na Figura 4, foi possível identificar, assim como pelo método de Tocher, que os genótipos 3, 40, 62 e 59 aparecem como 'contaminantes', definidos aqui como genótipos pertencentes a um dos grupos, mas que, no entanto, agruparam-se no outro grupo heterótico, sabendo-se que os genótipos de 1 a 40 são pertencentes ao grupo CIMMYT e os genótipos de 41 a 78 são representantes do grupo Piranão.

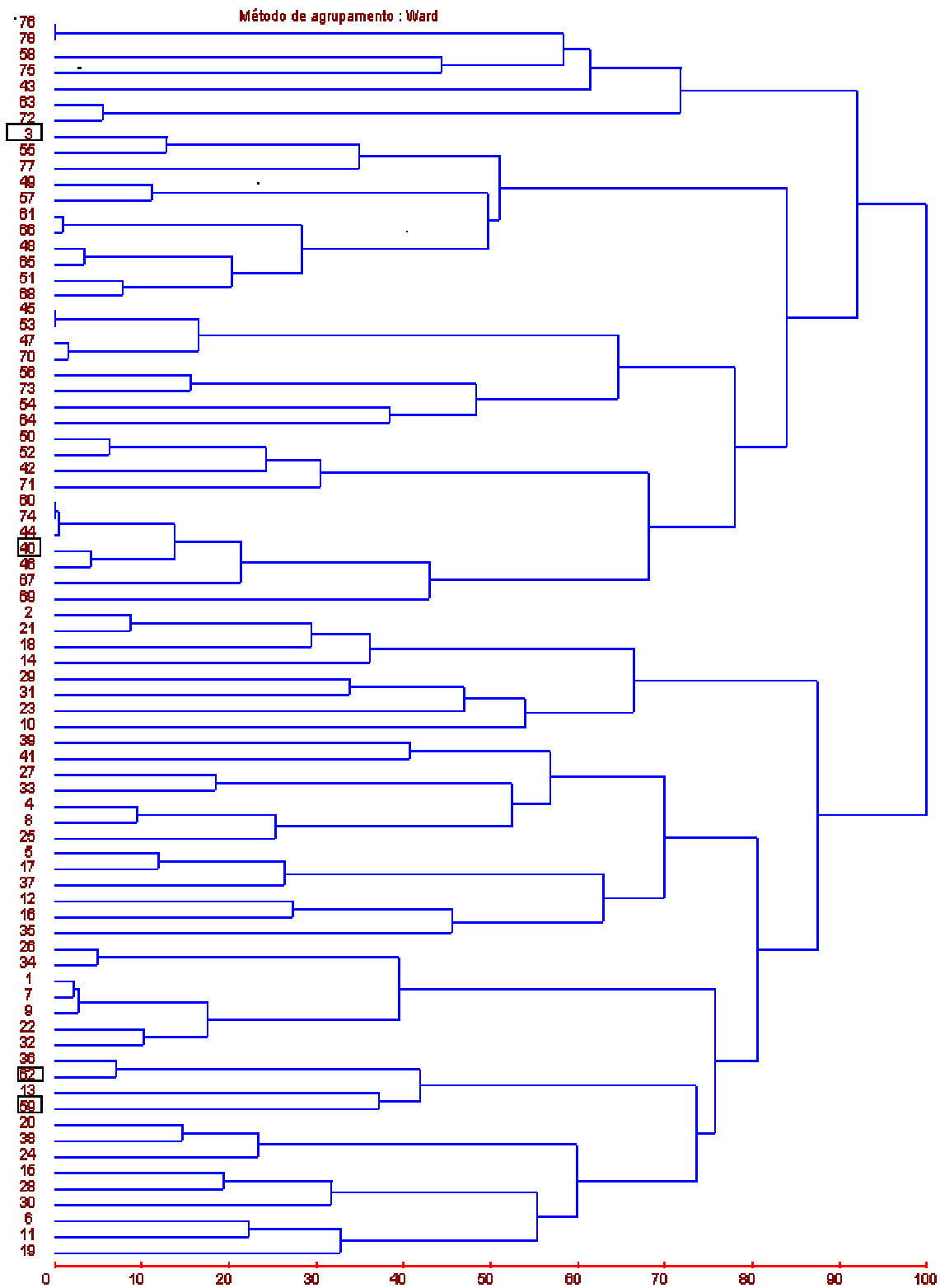


Figura 4: Dendrograma dos 78 S<sub>1</sub> obtido pelo método de Ward no Programa GENES. Os genótipos de 1 a 41 são do grupo CIMMYT e os genótipos de 42 a 78 pertencem ao grupo Piranão.



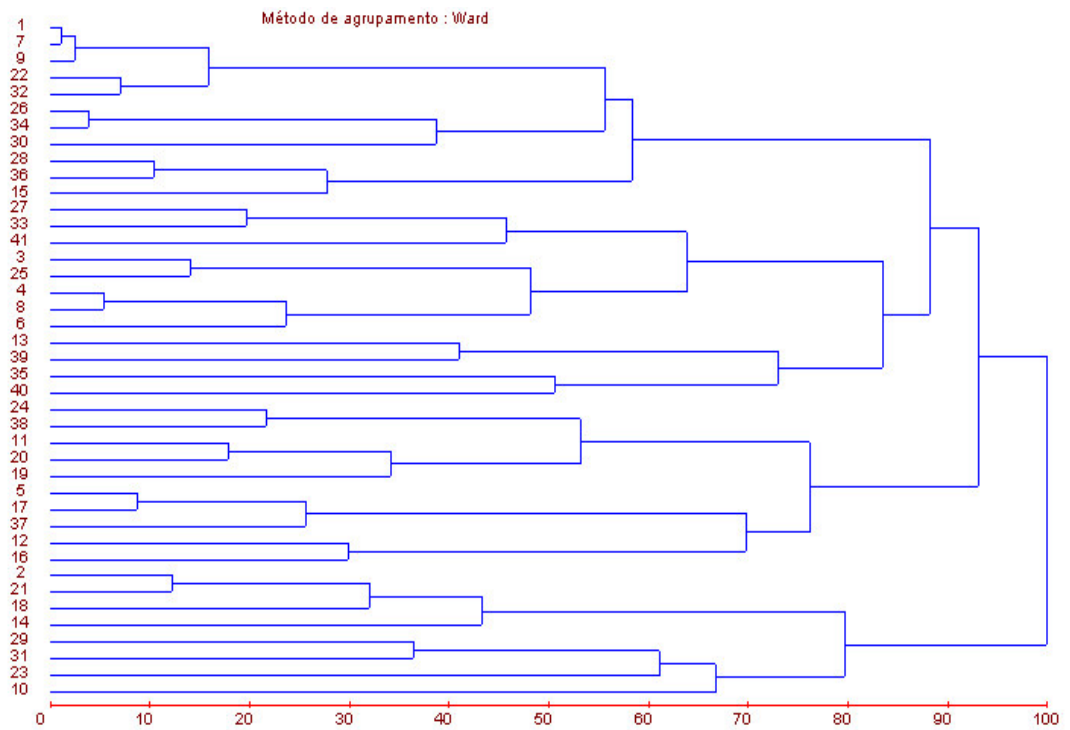


Figura 5: Dendrograma da população CIMMYT obtido pelo método de Ward

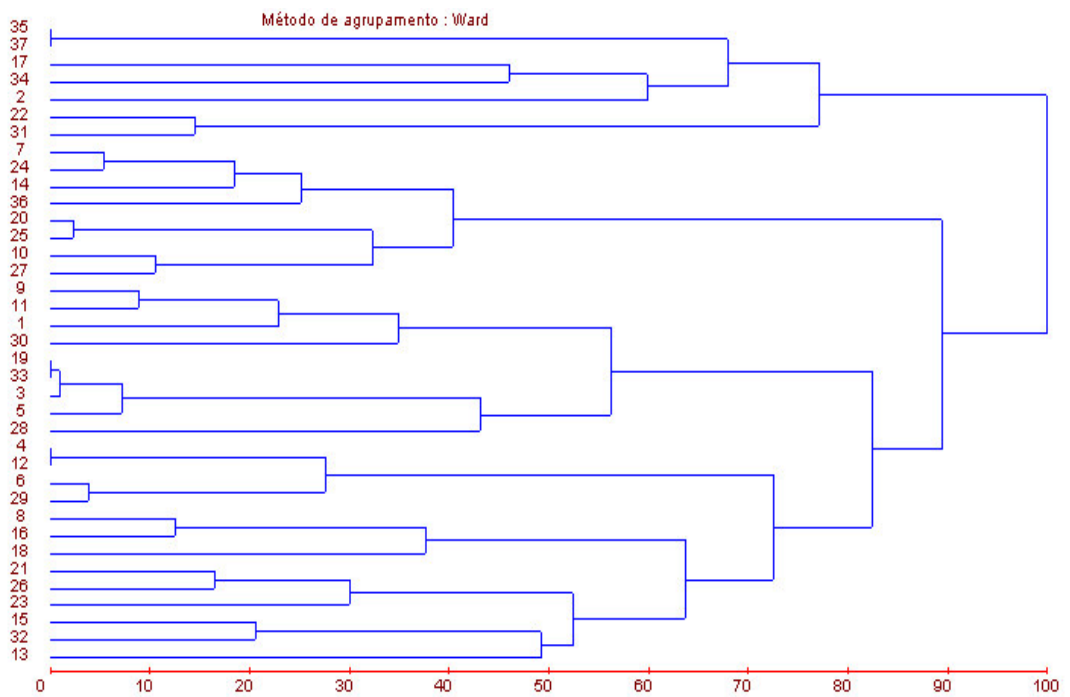


Figura 6: Dendrograma da população Piranião obtido pelo método de Ward

Algumas hipóteses são levantadas para explicar a ocorrência desses indivíduos considerados 'contaminantes': a planta originária da semente autofecundada poderia já ser proveniente da outra população ocorrendo tal infortúnio por uma mistura de sementes das duas populações; pólen da outra população pode ter polinizado a planta pertencente a população que deu origem a semente, porém a análise molecular a identificou como mais próxima geneticamente da população paterna; ou as populações mesmo sendo consideradas de grupos heteróticos distintos possuem uma sobreposição, ou seja, descendentes semelhantes, como um ponto de interseção de dois conjuntos.

A identificação de indivíduos considerados 'contaminantes' é importante porque indicam quais genótipos devem ser eliminados da etapa de recombinação, para que seja garantida a distância genética entre as populações, fator de grande importância quando se deseja explorar a heterose.

Com a análise molecular tentou-se maximizar a variabilidade genética dentro dos grupos e ampliar a distância intergrupo, como pode ser visto nos gráficos de dispersão (figuras 07 e 08). Com base na dispersão gráfica foi possível observar o distanciamento entre as duas populações após as devidas eliminações.

Assim, espera-se que, desta forma, possa-se contribuir com incremento da heterose em futuros híbridos intervarietais ou entre linhagens a serem derivadas de ambas as populações.

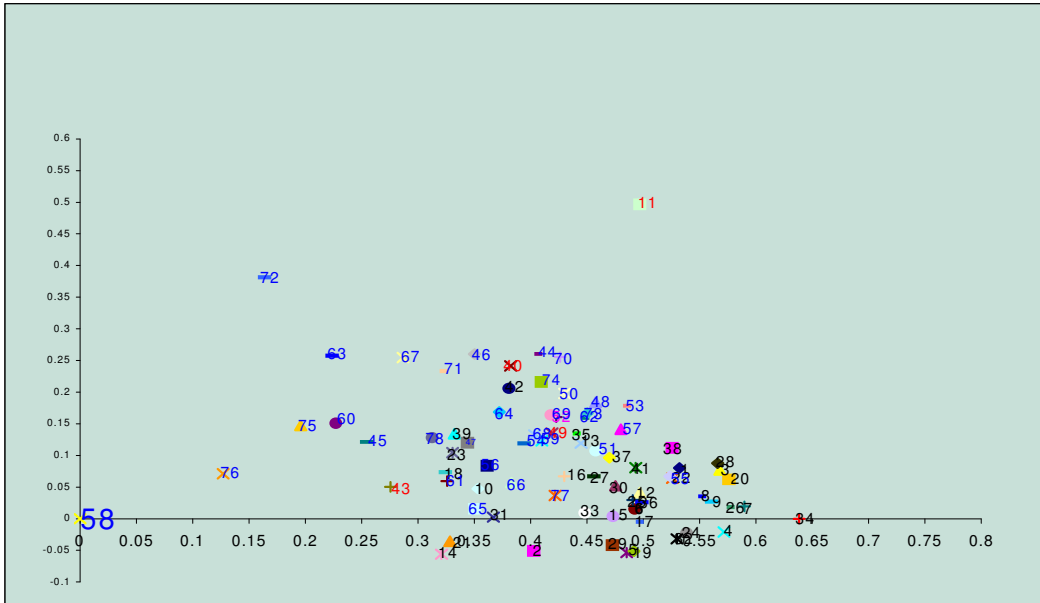


Figura 7: Gráfico de dispersão das 78 famílias genotipadas via AFLP .

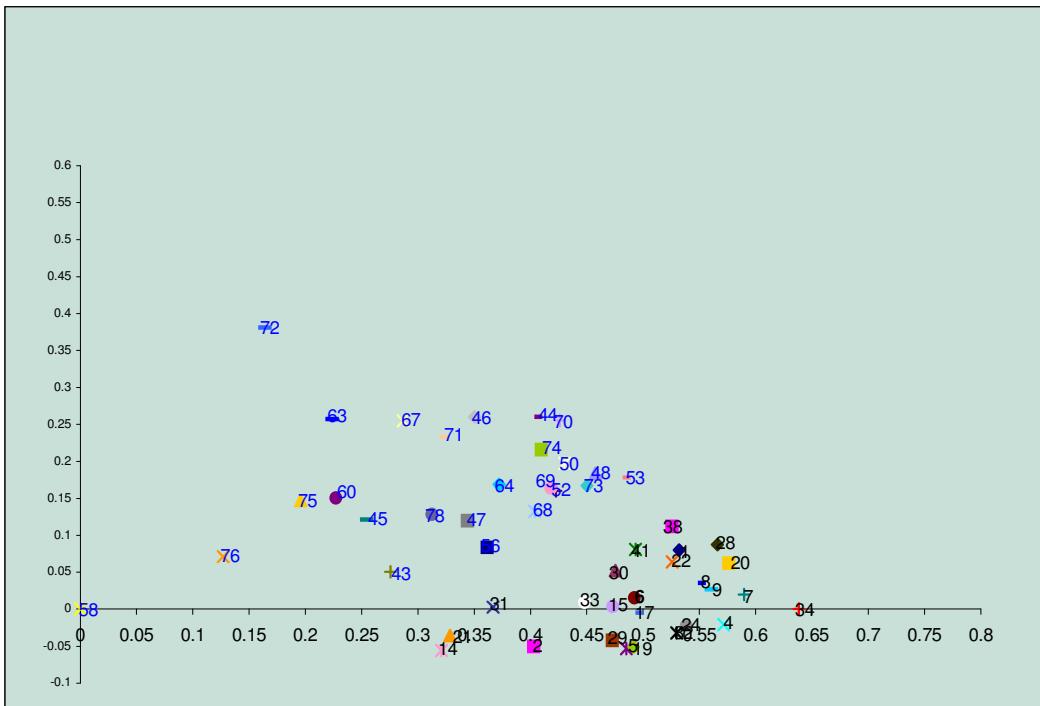


Figura 8: Dispersão gráfica das 50 famílias selecionadas para a etapa de recombinação. Genótipos de 1 a 25 pertencem ao grupo CIMMYT e os genótipos de 26 a 50 pertencem ao grupo Piranão.

#### 4.3.6. RESUMO E CONCLUSÕES

Avaliações de diversidade genética dos potenciais genitores por meio de marcadores moleculares são muitas vezes correlacionados com resposta heterótica (Townsend et al., 2005). A escolha de genitores mais divergentes pode aumentar a performance dos híbridos obtidos ou simplesmente aumentar a chance de obter diferentes combinações gênicas de interesse (Pinto, 2002).

Segundo Vieira et al. (2005) a dissimilaridade genética estimada por meio de marcadores moleculares, quando acompanhadas de informações fenotípicas, é importante para a seleção de genótipos. Tal expectativa decorre do fato de a heterose depender da existência de dominância no controle do caráter e da dissimilaridade entre os genótipos (Falconer, 1987).

Portanto, conhecendo-se o nível de variabilidade genética da população e sabendo-se quais os indivíduos mais distantes geneticamente, pode-se direcionar os cruzamentos com maior exatidão, de modo que o objetivo do presente trabalho foi avaliar a divergência genética, via AFLP, entre e dentro das populações de milho CIMMYT e Piranão, as quais já foram submetidas a dez ciclos de Seleção Recorrente Recíproca.

Para tanto com bases nos resultados do índice de seleção de Smith e Hazel, selecionou-se as 40 famílias de irmãos completos, consideradas superiores em suas características morfoagronômicas, recorreu-se então, aos seus respectivos  $S_1$ , que se encontravam armazenados em câmara fria, para submetê-los a 'genotipagem' via marcadores AFLP. A combinação de três 'primers' EcoRI/MseI, apenas de fluorescência azul, gerou um total de 105 fragmentos, sendo 85 polimórficos, com uma média de 28 marcas polimórficas por combinação de 'primer'.

A matriz de Jaccard indicou que os genótipos mais distantes foram os de número 34 e 58, por apresentarem um valor de distância igual a 0.6383, enquanto os mais similares foram os genótipos 60 e 74 com distância de 0,0740 e pelo agrupamento de Tocher foram formados 33 grupos, sendo que o maior grupo apresentou 21 indivíduos e o dendograma gerado pelo método de Ward mostrou

que há variabilidade genética tanto entre quanto dentro das populações e ainda pode contribuir para indicação de genótipos considerados 'contaminantes'.

Com base nos resultados foi possível concluir que:

- a) As populações CIMMYT e Piranão, mesmo já tendo sido submetidas a 10 ciclos de seleção recorrente recíproca, ainda possuem variabilidade genética intra e interpopulacional suficiente para a continuidade do programa Seleção Recorrente Recíproca de milho;
- b) O AFLP mostrou-se uma técnica eficiente para estudos de diversidade e na alocação dos genótipos nos seus devidos grupos heteróticos;
- c) Por meio do marcador AFLP foi possível identificar indivíduos considerados 'contaminantes', os quais foram eliminados da etapa de recombinação e
- d) O gráfico de dispersão dos 50 genótipos selecionados mostrou a existência de variabilidade genética em ambas as populações e ainda o distanciamento genético entre as duas.

#### 4.3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral Júnior, A. T., Thébaut J.T.L (1999) Análise multivariada na avaliação de diversidade em recursos genéticos vegetais. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF, 55p.

Borém, A. (2001) Melhoramento de Plantas, 3ª edição. Viçosa: UFV. 453 p.

Cruz, C.D. (1997) Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1997) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12:13-15.
- Fanceli, A. L.; Dourado Neto, D. (2000) Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- Falconer, D.S. (1987) Introdução à genética quantitativa. Tradução: Silva, M.A, Silva, J.C. Viçosa, MG: Impr. Univ., 279p.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética . Brasília: Embrapa - CENARGEM, 3<sup>o</sup> edição, 220p.
- Hallauer, A. R. e Miranda, J.B. (1985) Quantitative Genetics in Mayze Breeding. 286p
- Meyer, A.S. (2002) Comparação de coeficientes de similaridades usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – São Paulo. 106p.
- Padilha, L. (2002) Marcadores moleculares semi-automatizados e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese de Doutorado Lavras: UFLA. 85p.
- Pinto, R.M.C.; Carlini-Garcia, L.A.; Garcia, A. A. F.; Souja Jr, C.L. (2003) Comparação entre diversidade genética molecular e capacidade específica de combinação na alocação de linhagens S<sub>3</sub> de milho em grupos heteróticos. Anais do 2<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia.
- Santos, M. F., Aguiar, A. M., Filho, N. O. et al. (2003). Efeitos da seleção recorrente recíproca em um programa de melhoramento de milho. Anais do 2<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia.

Schwars, K.; Herz, M.; Huang, X.Q., Michalek, W.; Jahoor, A.; Wenzel, G.; Mohler, V. (2000) Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis en barley and wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, V. 100, n.3 / 4, p. 545-551, Feb.2000.

Townsend, M. and Henning, J. A. (2005) Potential heterotic groups in hop as determined by AFLP analysis. *Crop Sci* 45: 1901-1907. Aug. 2005.

Vieira, E. A.; De Carvalho, F.I.F.; De oliveira, A.C.; Benin, G.; et al. (2005) Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. *Bragantia*, Campinas, V. 64, n1, p. 51-60, 2005.

Zhang, L.H.; Ozias-Akins, P.; Kochert, G.; et al. (1999) Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, V.98, n. 6/7, p. 895-902, May 1999.





## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de dar continuidade ao programa de melhoramento da UENF foi implementado o 10º ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos, pois este método permite o aumento de frequências de alelos favoráveis em ambas as populações, permitindo assim, ganhos diretos (na população per se) e indiretos (nas populações em cruzamento).

Para avaliar -se as bases genéticas das populações com base em suas características morfoagronômicas foram estimados parâmetros genéticos e as correlações genéticas de 100 famílias de irmãos completos, que foram avaliadas em 'sets' dentro de blocos ao acaso em dois ambientes: Campos e Itaocara.

A análise conjunta de variância revelou a existência de variabilidade genética suficiente para a continuidade do programa, e pôde-se ainda inferir que há possibilidade de recomendação simultânea de genótipos para os dois locais. A estimativa dos parâmetros genéticos identificou que as populações possuem genótipos com bons potenciais, pois a maioria das características apresentaram significância na análise de variância, valores altos de herdabilidade para as características de interesse e níveis satisfatórios de índice de variação.

A próxima etapa consistiu em identificar as famílias superiores, de modo que a seleção foi potencializada pelo uso de diferentes índices de seleção. Porém, dentre os índices testados, o eleito foi o índice de Smith e Hazel por ter permitido maiores ganhos preditos. No entanto, este trabalho propôs uma nova

metodologia, qual seja, uma estratificação dentro do índice. Tal proposta contribui para o aumento, mesmo em pequena escala, do ganho genético predito. Após a identificação das 40 famílias superiores, recorreu-se aos seus respectivos  $S_1$ , e tais indivíduos, foram, então, 'genotipados' via AFLP. Este poderoso marcador identificou que há variabilidade genética inter e intrapopulacional suficiente para a continuidade do programa.

Pelos resultados encontrados no presente trabalho, as seguintes conclusões foram possíveis:

- a) Foi detectada suficiente variabilidade a ser explorada nos sucessivos ciclos de seleção recorrente recíproca;
- b) A ausência de significância para a interação genótipos por ambiente sugere que há possibilidade de recomendação simultânea de genótipos superiores para ambos os locais;
- c) A característica produção (prod), considerada a de maior importância, apresentou significância pela análise de variância ( $P < 0,01$ ), alta herdabilidade (78,79%), alto coeficiente de variação genético (20,96) e índice de variação próximo a unidade (0,96), permitindo assim, identificação de genótipos superiores;
- d) Para a maioria dos pares de caracteres, verificou-se a existência de correlações genéticas positivas significativas;
- e) Os ganhos preditos com o índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943) são superiores aos preditos com os outros índices;
- f) A utilização do índice estratificado permitiu o aumento dos ganhos preditos para a maioria das características consideradas mais importantes e um decréscimo (valores negativos) para características indesejáveis (altura de espiga, número de plantas quebradas, número de espigas doentes e número de espigas atacadas por pragas);
- g) As populações CIMMYT e Piranão, mesmo já terem sido submetidas a 10 ciclos de seleção recorrente recíproca, ainda possuem variabilidade genética intra e interpopulacional suficiente para a continuidade do programa Seleção Recorrente Recíproca de milho;
- h) O AFLP mostrou-se uma técnica eficiente para estudos de diversidade e na alocação dos genótipos nos seus devidos grupos heteróticos;
- i) Por meio do marcador AFLP foi possível identificar indivíduos considerados 'contaminantes', os quais foram eliminados da etapa de recombinação e

j) O gráfico de dispersão dos 50 genótipos selecionados mostrou a existência de variabilidade genética em ambas as populações e ainda o distanciamento genético entre as duas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allard, R.W. Princípios do melhoramento genético em plantas. São Paulo: Ed. Blucher, 1971.381p.

Amaral Júnior, A. T., Thébaut J.T.L (1999) Análise multivariada na avaliação de diversidade em recursos genéticos vegetais. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF, 55p

Araújo, I.S. (2002) Mapeamento genético e identificação de QTLs associados ao teor de manteiga na amêndoa do cacauzeiro (*Theobroma cacao L.*). Tese de Mestrado em Produção Vegetal. UENF. CCTA. Campos dos Goytacazes - RJ, 52p.

Asensio, L.J. (1989) Técnicas de análisis de datos multidimensionales: bases teoricas y aplicaciones en agricultura. Madri: Neografis, 301p.

Benchimol, L.L., Souza JR, C.L., Garcia, A.A.F., Kono, P.M.S., Mangolin, C.A., Barbosa, A.M.M., Coelho, A.S.G., Souza, A.P. (200). Genetic diversity in tropical mayze inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. Plant Breeding, v. 119; p.491-496.

Boletim informativo (2003). Companhia nacional de Abastecimento - CONAB

- Borém, A. (2001) *Melhoramento de Plantas*, 3ª edição. Viçosa: UFV. 453 p.
- Borém, A (1999). *Melhoramento de plantas Cultivadas*. Viçosa: UFV.817p
- Bull, L.T. e Cantarella, H (1993) *Cultura do Milho*. 301p.
- Cattaneo, L. F. , Daher, R. F., Marin, S.L.D., Pereira, M.G. (1999) Avaliação de divergência genética em mamoeiro (*Carica papaya L.*) utilizando marcadores RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, v.22, n.3-supplement, p.524
- 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.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. ((2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. V.1, 3.ed. Viçosa: UFV, 480p.
- Cruz, C.D., Vencovsky, R., Oliveira e Silva, S., Tosello, G.A., De Oliveira e Silva, S. (1993). Comparison of gains for selection among corn progenies based on different criteria. *Revista Brasileira de Genética*, 16:1, 79-89.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 585p.
- Cruz, C.D. (2001) Programa GENES – Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV
- Daher, R.F. (2003) Cruzamentos dialélicos entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) e milheto (*Pennisetum glaucumL.*) e suas relações com a divergência genética. Tese de Doutorado em Produção Vegetal. Campos dos Goytacazes - UENF.RJ, 125p.

Daros, M. (2003) Melhoramento de milho pipoca: seleção recorrente em famílias de irmãos completos e progênies  $S_1$ . Tese de Doutorado em Produção Vegetal. Campos dos Goytacazes - UENF.RJ, 92p.

Daros, M., Amaral Junior, A.T., Pereira, M.G., Santos, F.S., Scapim, C.A., Freitas Junior, S.P., Daher, R.F., Ávila, M.R. (2004) Correlações entre caracteres agronômicos em dois ciclos de seleção recorrente em milho pipoca. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n. 5, p. 1389-1394, set.-out. 2004.

Daros, M., Amaral Junior, A.T., Pereira, M.G., Santos, F.S., Gabriel, A.P.C., Scapim, C.A., Freitas Junior, S.P., Silvério, L. (2004). Recurrent selection in inbred popcorn families. *Sci. Agri.*, Piracicaba, v. 61, n. 6, nov-dez, 2004.

Doebley, J. (1990) Molecular evidence and the evolution of mayze. *Economic Botany*, New York, v. 44, n.3 p. 6-27.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1997) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12:13-15.

Eberhart, S.A., Debela, S., Hallauer, A.R. (1973) Reciprocal recurrent selection in the BSSS and BSCB1 maize varieties and half sib selection in BSSS. *Crop Sci.* 13: 451-456

Facelli, A.L., Dourado Neto, D. (2000) *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária, 360p.

Falconer, D.S. (1987) Introdução à genética quantitativa. Tradução: Silva, M.A, Silva, J.C. Viçosa, MG: Impr. Univ., 279p.

Ferreira, C.F. (2002) Marcadores de DNA no mapeamento de regiões genômicas do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) associados à resistência ao cretamento bacteriano comum. Tese de Doutorado em Produção Vegetal. Campos dos Goytacazes - UENF.RJ, 98p.

Fehr, W.R. (1987) Principles of cultivar development. Theory and technique. Volume I. Macmillan Publishing Company. New York. 536p.

Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética . Brasília: Embrapa - CENARGEM, 3ª edição, 220p.

Gabriel, A.P.C. (2004) Marcadores de DNA como ferramenta para maximizar os ganhos genéticos em um programa de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.). Campos dos Goytacazes: UENF, 34p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas).

Galiant, W. Evolution of corn. Adv. in Agron. Vol. 47, pág 203 a 229. 1992

Galinat, W.C. (1973) Intergenomic mapping of maize, teosinte, and tripsacum. *Evolution*, 27, 644-655.

Gomes, M. S. (1999) Heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. Tese de mestrado em produção Vegetal. Lavras: UFLA. 78p.

Granate, M. J.; Cruz, C. D.; Pacheco, C. A. P. (2002) Predição de ganho genético com diferentes índices de seleção no milho pipoca CMS-43. *Pesq. Agrop. Bras.* Brasília, V.37, n 7, p. 1001 – 1008, Jul. 2002.

Goloubinoff, P.; Paabo, S.; Wilson, A.C. (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh 2* gene segment from archaeological specimens. *Proceedings of the National Academy Sciences*. Washington, D.C., V. 90, p. 1997-2001.

Guimarães, C. T. (2003) Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento de milho. *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA, 2003.

Hallauer, A.R. and Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Sci.* 10:315-16.

Hallauer, A.R. (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 3:01-33.

Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. (1988) Quantitative genetics in maize breeding. 2 ed. Ames. Iowa State University Press. 468 p.

Hazel, L.N. The genetic basis for construction selection indexes. **Genetics**, Austin, v.28, p.476-490. 1943.

Helms, T.C.; Halluer, A .R. Smith, O.S. (19889) Genetic drift and selection evaluated from selection programs in mayze. *Crop Scienc* 29: 602-607.

Hull, F.H. (1945) Recurrent selection for specific combining ability in corn. *Jour. Amer. Soc. Agron.*, 37: 134-145.

Linares, E. (1987) Seleção recorrente recíproca em famílias de meios-irmãos em milho pipoca (*Zea mays L*). Tese Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas. Piracicaba, SP., Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 78 p.

Lubbers, E.L., Arthur, L., Hanna, W.W. e Osiasakins, P.(1994) Molecular markers shared by diverse apomictic pennisetum species. *Theoretical and Applied Genetics*, 89(5):636.

Mangesldorf, P.C. (1974) *Corn its origin, evolution and improvment*. Cambridge, Mass, USA.

Martins, E.R. (2000) Conservação da Poaia (*Psychrya ipecacuanha*): coleta, ecogeografia, variabilidade genética e caracterização reprodutiva. Tese de Doutorado em produção Vegetal. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF. 109p.

Milach, S.C.K. (1998) Marcadores Moleculares em plantas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, porto Alegre, p. 17-28.



Miranda,G.V, Coimbra, R.R., Godoy, C. L., Souza, L. V., et al.. (2002) Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho pipoca. *Pesq. agrop. Bras.*, vol 39.

Miranda, G. V. (2003) Melhoramento de milho nas Universidades. Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho. Lavras: UFLA, 2003

Padilha, L. (2002) Marcadores moleculares semi-automatizados e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese de Doutorado Lavras: UFLA. 85p.

Paterniani, E. e Vencovsky, R. (1977) Reciprocal recurrent selection in maize (*Zea mays* L.) based on the testcross of half-sib families. *Maydica* 22: 141-152.

Paterniani, E. (1980) Melhoramento e Produção do Milho no Brasil. Fundação Cargil. Vol. único 650p.

Paterniani, E., Campos, M.S. (1999) Melhoramento do milho. In: Borém, A. (Editor). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV. p. 429-485.

Pereira, J. R. (1985) Seleção de irmãos completos, visando a qualidade da semente e outros caracteres agronômicos em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Viçosa: UFV. 85p. Tese (Mestrado)

Pinto, R.J. B. (1995) Introdução ao melhoramento genético de plantas. Maringá. 275p.

Pinto, R.M.C.; Carlini-Garcia, L.A.; Garcia, A. A. F.; Souja Jr, C.L. (2003) Comparação entre diversidade genética molecular e capacidade específica de combinação na alocação de linhagens S<sub>3</sub> de milho em grupos heteróticos. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia.

Ramalho, M. P., Bosco,J.,Pinto, C.A. (2000) Genética na Agropecuária. Lavras: UFLA, 2000. 472p.

Ronzelli Junior,P.(1996). Melhoramento Genético de Plantas. Curitiba. 219p.

Tardin, F.D. (2001) Diversidade morfoagronômica e molecular em acessos de alface (*Lactuca sativa*). Mestrado em produção vegetal. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF. 61p.

Santos, N.T. (1991) Seleção recorrente recíproca entre as variedades braquíticas de milho (*Zea mays* L.) ‘Piranão’ e ‘Çimmyt’, usando famílias de irmãos germanos obtidas de plantas prolíficas. Viçosa: UFV, 76 p. Tese (Mestrado).

Santos, F.S., Daros, M., Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G., Tardin, F.D., Riva, E.M. (2003) Uso do índice de seleção de Smith & Hazel na população de milho pipoca UNB-2U para obtenção do segundo ciclo de seleção recorrente. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Londrina - PR: Brazilian Society of Plant Breeding, 2003. v.2. p.9 – 12

Santos, M. F., Aguiar, A. M., Filho, N. O. et al. (2003). Efeitos da seleção recorrente recíproca em um programa de melhoramento de milho. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto Seguro, Bahia.

Santos, F.S. (2005) *Seleção recorrente entre famílias de meios-irmãos da população unb-2u de milho pipoca (Zea mays L.)*. Doutorado em Produção Vegetal. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF. 95p.

Silva, P.C.; Osuna, J.T.A.; Queiroz, S.R.de O.D.; Paiva, L.M. (2003)Seleção recorrente recíproca em milho (*Zea mays* L.), obtenção e avaliação de híbridos forrageiros. *Sitientibus* 3 (1/2): 125-130.

Silva, R.M.; Miranda Filho, J.B. (2003) Heterose em cruzamentos entre populações de milho: peso de espigas. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, V. 60, n.3.

Souza, P.M.; Braga, M.J. in: Galvão, J.C.C.; Miranda, G.V.(2004) Tecnologias de produção de milho. Viçosa, UFV, 366p.

Vieira, E.A.; Zimmer, P.D.; Oliveira, A.C.; Carvalho, F.I.F.; Malone; Benin, G. (21002) Emprego de modelos gráficos na seleção de genitores de milho paa hibridização e mapeamento genético. *Ciência Rural*, Santa Maria, V. 35, n.5, p.986-994, set-out.

Vilarinho, A. A.; Viana, J.M.S.; Santos, J.F.; Câmara, T.M.M. (2003)Eficiência da seleção de progênies  $S_1$  e  $S_2$  de milho pipoca, visando à produção de linhagens. *Bragantia*, Campinas – SP, 62(1): 9 –17.

Viliela, F.O.(2004) Impacto da seleção recorrente na variabilidade genética da população UNB-2U de milho pipoca (*Zea mays* L.) por meio de marcadores RAPD. Doutorado em Produção Vegetal. Campos dos Goytacazes: CCTA-UENF. 94p.

Von Pinho, R. G. (2003) Produção de milho no Brasil e no mundo: Realidade e perspectiva. . *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA, 2003.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M. Et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acides Research*. 23 (21):4407-4414









