

**SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA, EM FAMÍLIAS DE IRMÃOS
COMPLETOS, MONITORADA POR MARCADORES MOLECULARES**

FLÁVIO DESSAUNE TARDIN

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2006

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA, EM FAMÍLIAS DE IRMÃOS
COMPLETOS, MONITORADA POR MARCADORES MOLECULARES

FLÁVIO DESSAUNE TARDIN

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2006

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA, EM FAMÍLIAS DE IRMÃOS COMPLETOS, MONITORADA POR MARCADORES MOLECULARES

FLÁVIO DESSAUNE TARDIN

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 23 de fevereiro de 2006

Comissão Examinadora:

Prof. Cosme Damião Cruz (Doutor, Genética e Melhoramento) – UFV

Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior (Doutor, Genética e Melhoramento) – UENF

Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Doutor, Melhoramento de Plantas) – UENF
(Orientador)

A minha esposa, Livia, e a nossa filha, Ana Carolina.

Aos meus pais, Francisco e Maria Helena.

Aos meus irmãos, Fabiano, Fabiola e Fernanda.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador de toda a diversidade!

Ao professor Messias Gonzaga Pereira, pela orientação e amizade;

Aos amigos, Fabrício (baiano), Silvério e Ana Paula, pelo convívio quase diário e experiências trocadas durante todas as etapas realizadas no trabalho;

Ao técnico agrícola Geraldo, por compartilhar de sua experiência quanto à implantação, condução, polinização e coleta de dados dos experimentos de campo;

Ao técnico agrícola Rogério e demais funcionários de apoio lotados no Colégio Agrícola Antônio Sarlo e na Estação Experimental da PESAGRO-RIO, em Itaocara;

A Anderson, Scheila, Andréa, Heber, Nádia e Wallace, pelo apoio e amizade;

A Leonarda Grillo Neves, pelo estímulo e amizade;

Às funcionárias da CPGPV, Fátima, Patrícia e Luciana, pelo excelente atendimento;

Às bibliotecárias do CCTA, pelo atendimento e compreensão na devolução atrasada de livros;

Ao professor Afrânio, pelos primeiros ensinamentos em Genética e Melhoramento;

Aos meus professores durante o mestrado e/ou doutorado: Antônio Teixeira do Amaral Júnior, Rosana Rodrigues, Gonçalo Apolinário, Telma Nair Santana Pereira, José Tarcísio Lima Thiébaud, Eliemar Campostrini, Jurandi Gonçalves de Oliveira, Antônio Constantino de Campos, Ricardo Henrique Bressan-Smith, Fábio Cunha Coelho, Henrique Duarte Vieira e Nilton Rocha Leal, pela bagagem de conhecimentos que me ajudaram a adquirir;

Ao professor Cosme Damião Cruz, pela atenção e valiosas sugestões;

Aos técnicos do laboratório, Rogério Figueiredo Daher, Victória Régia e demais alunos/bolsistas do LMGV, pela ajuda e convivência durante a realização deste trabalho;

A Margot e Luiz Fernando Paes, pelo estímulo e cuidados com Ana Carolina e Lívia durante a realização da tese;

À UENF, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Incaper, pela licença concedida para terminar esta tese de doutorado;

À FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro para a condução dos experimentos;

Ao Colégio Agrícola Antônio Sarlo;

À PESAGRO-RIO, Estação Experimental de Itaocara;

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

Biografia

FLÁVIO DESSAUNE TARDIN, filho de Francisco Xenócrates Tardin e Maria Helena Neves Dessaune, natural de Vitória, Estado do Espírito Santo, nascido em 18 de março de 1975. Realizou seus estudos iniciais em Vitória.

Em 1994, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica do Centro Agropecuário da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre, Estado do Espírito Santo, graduando-se em março de 1999.

Ingressou no programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, em março de 1999, obtendo o Título de Mestre em Produção Vegetal no mês de abril de 2001. A partir de março deste mesmo ano, no mesmo programa de pós-graduação e universidade, já se encontrava matriculado no doutorado, obtendo o título de Doutor em Produção Vegetal em fevereiro de 2006.

Em abril de 2005, por meio de concurso público, foi contratado para o cargo de Agente de Desenvolvimento Rural II, do Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper, autarquia do Governo do Estado do Espírito Santo, vinculada à Secretaria da Agricultura, Abastecimento, Aqüicultura e Pesca - SEAG, para atuar como pesquisador nas linhas de Estatística e Métodos Quantitativos em Pesquisa e Desenvolvimento.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Botânica.....	5
2.2. Origem.....	6
2.3. Importância econômica.....	6
2.4. Diversidade genética e heterose.....	8
2.5. Melhoramento genético.....	10
2.6. Generalidades sobre o milho braquítico (br_2).....	13
2.7. Seleção simultânea de características: índices de seleção.....	14
2.8. Marcadores moleculares.....	19
2.9. Análise de agrupamento.....	22
2.9.1. Método de otimização de Tocher.....	24
2.9.2. Método hierárquico da variância mínima de Ward.....	25
2.10. Análise discriminante.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Material genético.....	28

3.2. Procedimentos experimentais e de melhoramento.....	29
3.3. Geração das famílias de irmãos completos e de sementes S ₁	30
3.4. Avaliação das progênes de irmãos completos.....	31
3.4.1. Análise estatística.....	32
3.4.2. Estimativas de parâmetros genéticos.....	35
3.4.3. Seleção baseada na utilização do índice clássico proposto por Smith (1936) e Hazel (1943).....	35
3.5. Avaliação da diversidade genética (marcadores de DNA).....	36
3.5.1. Extração do DNA.....	37
3.5.2. Reação de polimerase em cadeia (PCR).....	38
3.5.3. Análise estatística dos marcadores RAPD.....	39
3.5.4. Análise de agrupamento.....	39
3.5.5. Análise discriminante.....	40
3.6. Recombinação das progênes selecionadas.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Avaliação das progênes de irmãos completos.....	43
4.1.1. Análise de variância.....	43
4.1.2. Seleção baseada na utilização do índice clássico proposto por Smith (1936) e Hazel (1943).....	48
4.1.3. Análise dos marcadores RAPD.....	51
4.1.3.1. Dissimilaridade genética.....	53
4.1.3.2. Análise de agrupamento.....	53
4.1.3.3. Análise discriminante.....	58
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

RESUMO

TARDIN, FLÁVIO DESSAUNE; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2006; **Marcadores moleculares na seleção recorrente recíproca, em famílias de irmãos completos, envolvendo as populações de milho 'cimmyt' e 'piranão'**; Professor Orientador: Messias Gonzaga Pereira.

Das metodologias de melhoramento aplicáveis à cultura do milho, a seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos merece destaque, pois permite ganhos nas populações *per se* e/ou em cruzamento. O presente trabalho, além de utilizar o índice de seleção proposto por Smith e Hazel, nesta metodologia, introduziu, para os genótipos selecionados, uma etapa baseada em marcadores RAPD, visando preservar a variabilidade genética e identificar contaminantes antes da recombinação dos mesmos. Para tanto, foram utilizadas técnicas multivariadas de agrupamento e análise discriminante, no intento de dar longevidade ao programa de melhoramento e ampliar a distância genética entre as populações 'Cimmyt' e 'Piranão', utilizadas para obtenção de um híbrido intervarietal. A técnica molecular mostrou-se útil para identificar contaminantes e auxiliar na escolha dos genótipos a serem recombinados, de forma a maximizar a heterose entre as populações, podendo ser inserida em programas de seleção recorrente, principalmente naqueles que visam à obtenção de híbridos.

ABSTRACT

TARDIN, FLÁVIO DESSAUNE; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2006; **Molecular markers in full-sib reciprocal recurrent selection involving the 'Cimmyt' and 'Piranão' corn population**; Adviser: Messias Gonzaga Pereira.

Among the breeding methods current applicable in the maize crop, the full-sib reciprocal recurrent selection deserves distinction, once such method permits genetic gain in the involved populations *per se* and in crossing. The present investigation besides utilizing the selection index proposed by Smith and Hazel, on this methodology, introduced, for the selected genotypes, one additional step based on the RAPD markers. The main reasons were to preserve the genetic variability, to identify contaminants before the recombination, to preserve the longevity of the breeding program and to increase the genetic distance between the 'Cimmyt' e 'Piranão' populations, used to obtain an inter-population hybrid. Multivariate technique for grouping procedures and discriminant analysis were used. The molecular technique was effective to identify the contaminants and to help on the choice of the genotypes to be recombined in order to maximize the heterosis between the populations, being able to be inserted into recurrent selection programs, mainly those that aim the attainment of hybrids.

1. INTRODUÇÃO

O milho é uma das culturas mais antigas do continente americano, tendo sido originado no México (Mangelsdorf, 1974). Em termos de Brasil e de mundo, é uma das culturas mais importantes, sendo o Brasil o quarto maior produtor mundial, cultivando-o de Norte a Sul, de Leste a Oeste.

A demanda crescente por alimentos em razão do aumento da população humana, associada ao fato dos solos agricultáveis serem inelásticos, exige produtividades mais elevadas. Levando-se em consideração a qualidade ambiental, as produtividades elevadas devem ser obtidas com um mínimo uso de produtos químicos e consumo energético.

O aumento da demanda por milho já se reflete nos estoques mundiais que vêm diminuindo, sem parar, nos últimos cinco anos (Dias, 2005). Tal quadro gera o questionamento: efetivamente, é possível aumentar a produção em ritmo e proporção tais que atenda ao incremento de consumo e ainda permita recompor os estoques mundiais?

Pelas possibilidades de contribuir para o aumento da oferta mundial do grão, o Brasil contribui para a resposta a essa questão. Nos últimos anos, o país tem-se firmado como exportador do produto, gerando amplas perspectivas para que mais um produto brasileiro ocupe lugar de destaque no mercado mundial de 'commodities' agrícola, à semelhança da soja (Dias, 2005).

Metodologias que ampliem a produção e garantam uma quantidade expressiva do produto a ser exportado são de grande interesse, uma vez que a

assiduidade é condição essencial para o mercado internacional constituir-se em via segura de escoamento aos acréscimos de produção obtidos pelo setor agrícola.

Assim, o desenvolvimento de variedades melhoradas de elevado potencial de produtividade pode ser visto como uma das alternativas a questão levantada anteriormente. Tais variedades, com características qualitativas e/ou quantitativas superiores às anteriormente recomendadas, são desenvolvidas por meio do melhoramento genético, o qual se constitui numa das mais bem sucedidas tecnologias desenvolvidas na agricultura moderna, sendo responsável por incrementos de rendimentos observados na maioria das culturas (Fehr, 1987; Borém, 1997). Vale a ressalva de que o melhoramento permite substancial incremento de produção sem necessariamente implicar um incremento de custo.

A produtividade não é o único caráter a ser considerado em um programa de melhoramento (Allard, 1971). O melhoramento, na maioria das vezes, se constitui na melhor alternativa para a busca de melhorias tanto quantitativas quanto qualitativas como o valor nutritivo, o sabor, a aparência, a altura da planta, o ciclo, a altura da primeira espiga, a resistência ao acamamento e doenças, o bom empalhamento da espiga, a qualidade da semente, dentre outras.

Para obter ganhos genéticos em diversas características, de forma eficiente, há algumas metodologias de seleção simultânea (Smith, 1936; Hazel, 1943; Kempthorne e Nordskog, 1959; Willians, 1962; Elston, 1963; Pesek e Baker, 1969; Mulamba e Mock, 1978, citados por Cruz e Carneiro, 2003). Dentre essas, o índice de seleção, proposto por Smith (1936) e Hazel (1943), tem tido boa aceitação em programas de melhoramento de milho (Daros, 2003; Santos, et al., 2003; Tardin et al., 2003). Esse índice associa as informações referentes às diversas características de interesse agrônômico, fazendo uso de pesos econômicos, previamente estabelecidos, bem como de variâncias genotípicas e fenotípicas de cada característica e as respectivas covariâncias entre cada par de características. Tal metodologia associada às estratégias de melhoramento permite ganhos para diversas características num mesmo programa de seleção.

Quanto aos procedimentos de melhoramento, merece destaque o uso da seleção recorrente, pois esta visa, de forma contínua e sistemática, incrementar a média de uma ou duas populações simultaneamente, preservando a

variabilidade genética. Assim sendo, permitem-se ganhos, a curto/médio prazos, como também a longo prazo. Trata-se, porém, de metodologias trabalhosas que exigem mão-de-obra especializada e recursos consideráveis, demandando, principalmente, tempo para a condução dos diferentes ciclos.

No anseio de ampliar a eficiência dos métodos de seleção, surgem os marcadores de DNA, como ferramenta auxiliar, visando incrementar os procedimentos da seleção recorrente. Os mesmos dão assistência aos procedimentos de seleção, poupando tempo e incrementando a eficiência (Frish e et al., 1999; Frish e Melchinger, 2001), garantindo a existência da diversidade genética necessária para continuidade do programa (Labate et al., 1997; Popi et al., 2000).

Em se tratando da região Norte Fluminense, a cultura vem sendo utilizada como uma alternativa de diversificação. Embora não seja uma região tradicional de cultivo de grãos, é fundamental que se disponha de cultivares melhoradas uma vez que, além da necessidade do milho para produção de grãos, a região utiliza bastante esta cultura para a produção de silagem para o gado. Assim sendo, esse projeto visou dar seqüência a um programa de melhoramento já em desenvolvimento na UENF e que, no ano 2000, disponibilizou o primeiro híbrido de milho para a região Norte/Noroeste Fluminense. Este híbrido, denominado 'UENF506-6' encontra-se em utilização pelos agricultores, com elevado grau de aceitação.

Portanto, o atual projeto objetivou melhorar as populações de milho 'Cimmyt' e 'Piranão', utilizadas para a obtenção do híbrido intervarietal, tanto em relação à produtividade quanto em diversas outras características morfoagronômicas, para assim, possibilitar a obtenção de um milho híbrido intervarietal com características superiores às daqueles já gerados pela instituição.

Tal trabalho priorizou a manutenção da variabilidade entre e dentro das populações, garantindo assim a continuidade do programa de melhoramento, de forma a evitar contaminações genéticas, as quais acarretariam a perda da identidade das populações. Visou ainda ampliar a distância genética entre as populações, para maior expressão da heterose no híbrido intervarietal a ser obtido, e possibilitar a obtenção de linhagens superiores, as quais poderão ser utilizadas na obtenção de híbridos simples em programas futuros.

Para atingir tais objetivos, é proposta uma nova estratégia de melhoramento, a qual consta da associação do método clássico de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos com o uso de marcadores moleculares para monitoramento da divergência entre e dentro das populações de milho utilizadas no programa de melhoramento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Botânica

O milho (*Zea mays*) é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, da tribo *Maydeae*, do gênero *Zea* e da espécie *Zea mays*. Taxonomicamente é identificado como *Zea mays* L. ssp. *mays*, cuja nomenclatura serve para distingui-lo do seu parente silvestre teosinto, considerado atualmente da mesma espécie e com várias subespécies: *Zea mays* ssp. *mexicana*, *Z. mays* ssp. *parviglumis*, *Z. mays* ssp. *luxurians*, *Z. mays* ssp. *diploperennis* (Paterniani e Campos, 1999). O milho e o teosinte possuem $2n=2x=20$ cromossomos (Paterniani e Campos, 1999).

O milho é uma planta herbácea, anual, monóica, caráter este que contribui para a polinização cruzada. Possui sistema radicular fasciculado e superficial, tolerando pouco a seca. Suas folhas são alternadas, presas à bainha superpostas que envolvem o colmo e inflorescências (Goodman e Smith, 1987). O início do florescimento ocorre cerca de 50 a 100 dias depois do plantio, sendo esse tempo afetado principalmente pela temperatura. No caso da flor feminina, o estilo-estigma emerge por cerca de três a cinco dias e são receptivos imediatamente após a emergência, assim permanecendo por até 14 dias, em condições favoráveis (Magalhães et al., 1996).

2.2. Origem

Milho (*Zea mays*), teosinto (*Euchlaena mexicana*, *Zea mexicana* ou *Zea mays* spp. *Mexicana*) e tripsacum (*Tripsacum* spp.) são os três membros da tribo Maydeae do Novo Mundo. Três hipóteses correntes têm sido discutidas sobre a origem dos membros americanos de Maydeae. Uma delas, proposta por Weatherwax, em 1954, é que milho, teosinto e tripsacum 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 teosinto. Em contrapartida, a terceira hipótese defendida por Mangelsdorf, em 1974, sugere que o teosinto é originário do milho. As evidências indicam que a segunda hipótese é a mais plausível, pois, tanto o milho como o teosinto possui n=10 cromossomos, os quais são homólogos, cruzando-se facilmente e resultando descendentes férteis, os quais, nas gerações seguintes, geram filhos semelhantes ao milho e teosinto com diferenças relativamente pequenas (Paterniani e Campos, 1999).

Mais é conhecido acerca da evolução e domesticação do milho, do que da evolução da tribo Maydeae como um todo. Amostras de pólen identificadas como sendo de milho, teosinto ou seu ancestral comum datam de 60.000 a 80.000 anos atrás, e foram coletados no México em meados de 1950 (Goodman, 1986).

Na América do Sul, evidências arqueológicas sobre domesticação são relativamente mais escassas e limitadas às áreas frias do Peru. Os materiais primitivos datam de 1000 a.C. (Goodman, 1986).

2.3. Importância econômica

Em termos de Brasil e de mundo, o milho é uma das culturas mais importantes, sendo o Brasil um dos maiores produtores, com esta cultura em todo o país.

À exceção do arroz, que sofreu ligeira queda de produção, o ano de 2003 foi marcado pelo bom desenvolvimento agrícola dos principais grãos, devido, principalmente, aos avanços tecnológicos e às boas condições

climáticas, o que gerou aumentos significativos de produção em relação a safras anteriores. No caso do milho, o Brasil obteve produção de 48,3 milhões de toneladas, superando os valores obtidos na safra anterior em 34%, afastando o risco de desabastecimento que vinha ocorrendo nos últimos anos, pela diminuição das áreas plantadas em detrimento de culturas mais rentáveis, como a soja. O principal motivo para esse crescimento foi a 2ª safra do milho que, além de ter aumentado em área plantada, obteve maior produtividade devido à melhor distribuição das chuvas, quando comparadas às dos anos anteriores (IBGE, 2003).

Assim, em relação à comercialização do milho, o mercado brasileiro foi marcado por uma grande mudança nos últimos anos, passando o Brasil de importador a exportador do produto (Agriannual, 2002). As exportações brasileiras de milho, no ano agrícola de 2003/04, atingiram a marca de 4,5 milhões de toneladas (Dias, 2005).

A região Sudeste do país obteve, em 2003, a produção de 10,2 milhões de toneladas, sendo a 2ª região mais produtora de milho do país durante essa safra, com seus estados, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro, produzindo, respectivamente, 5.326.118, 4.732.040, 132.287 e 22.911 toneladas. A área colhida foi de 2,4 milhões de ha. A região Sul, maior produtora, teve uma área colhida de 5,1 milhões de ha e produção de 24,1 milhões de toneladas (IBGE, 2003).

Um estudo de mercado e perspectivas, realizado por Dias (2005), aponta que, além de seus múltiplos usos na alimentação humana e animal, o milho tem se tornado fonte de produção de biocombustível. O aumento da demanda já se reflete nos estoques mundiais do cereal, que vem caindo há cinco anos.

Isso denota a importância da cultura que é extremamente utilizada de diversas formas, podendo-se citar: ração ou silagem para a alimentação de animais, alimentação humana na forma *in natura* ou na forma de subprodutos como pães, farinha e massas, sem mencionar a indústria, em que é empregado como matéria-prima em diversos produtos (Dias, 2005).

2.4. Diversidade genética e heterose

Pode-se definir diversidade genética como a amplitude da variação genética existente para uma determinada espécie. Para garantir a eficiência de um programa de melhoramento, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e diversidade genética das espécies, pois, sem o conhecimento da variabilidade e da sua interação com o ambiente, é bastante difícil a obtenção de genótipos superiores (Milach, 1998).

No caso do milho, acredita-se que a espécie possua aproximadamente 250 raças (Paterniani e Campos, 1999). Sabendo que dentro de cada raça podem ser identificadas distintas variedades, conclui-se que a espécie *Zea mays* L. possui grande variabilidade, que se deve principalmente a processos de seleção (Weatherwax, 1942) e hibridação (Wellhausen et al., 1952).

A divergência genética, além de assegurar o melhoramento numa população, possibilita a exploração da heterose ou vigor híbrido que é definido como a expressão genética dos efeitos benéficos da hibridação. Estudos têm revelado que quanto maiores os contrastes genéticos entre os genitores escolhidos para as hibridações, maiores chances de aparecerem efeitos heteróticos nos descendentes (Ronzelli Júnior, 1996). Entretanto, os resultados alcançados por Moll et al. (1965) indicam que aumentos da heterose são alcançados com incrementos na divergência entre genitores, porém cruzamentos extremamente divergentes resultam em decréscimo da heterose. Assim, a expressão da heterose seria limitada por uma combinação gênica desarmônica no híbrido F_1 .

Em termos de frequência gênica e efeitos genotípicos, do ponto de vista biométrico, a heterose (h) em relação à média dos pais é expressa por:

$$h = \sum_{i=1}^n (p_i - r_i)^2 \cdot d_i, \text{ em que } \mathbf{p} \text{ e } \mathbf{r} \text{ são frequências dos alelos favoráveis de um}$$

mesmo loco, em duas populações, respectivamente, e \mathbf{d} é o efeito de 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). Assim, é preciso que exista divergência genética entre duas populações e algum nível de dominância nos locos que controlam uma determinada característica para que a heterose se expresse (Falconer, 1987).

Em linhas gerais, a heterose é o aumento do vigor híbrido que pode ser

observado, para diversas características, na superioridade de genótipos provenientes do cruzamento de indivíduos contrastantes. A heterose aumenta a probabilidade de recuperação de segregantes superiores em gerações avançadas.

É esperado que a seleção intrapopulacional diminua a divergência genética, uma vez que eleva a frequência dos alelos favoráveis, promovendo, como consequência, a diminuição da heterose. Por sua vez, na seleção interpopulacional, como são selecionados os melhores cruzamentos, espera-se que a heterose aumente (Souza Júnior, 1983). Apesar disso os resultados experimentais são inconsistentes.

Um levantamento bibliográfico sobre o assunto, realizado por Souza Júnior (1983), cita os trabalhos de Genter e Eberhart (1974), no qual, inter cruzaram seis variedades em ciclos originais e avançados de seleção intrapopulacional e verificaram que a heterose, em relação à média dos pais, diminuiu em apenas metade dos cruzamentos; Moll et al. (1978), avaliando oito ciclos de seleção entre progênies de irmãos germanos e seleção recorrente recíproca de famílias de meios irmãos, verificaram que, na primeira, a heterose decresceu 12,1%, enquanto, na segunda, a mesma aumentou 11,3%, concordando com o esperado teoricamente.

Hallauer e Miranda Filho (1988) relacionam uma série de trabalhos com seleção inter e intrapopulacional e suas respectivas alterações na heterose devido à 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). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos com seleção intrapopulacional, ou seja, diminuição da heterose em uns (Penny et al., 1962; Darrah et al., 1972; Genter, 1973) e aumento em outros (Penny, 1959; Genter, 1973; Russel et al., 1973; Walejko e Russel, 1977).

Métodos de melhoramento, cujo principal produto é o híbrido, necessitam de ferramentas que possibilitem monitorar a heterose entre os materiais a serem cruzados, para certificação de que o objetivo será alcançado. Assim, a escolha adequada de genitores pode ser baseada em informações de relacionamento genético estimado por marcadores de DNA, os quais permitem um estudo seguro da divergência genética (Milach, 1998).

2.5. Melhoramento genético

Pelo fato de o milho ser uma cultura antiga e útil, é muito estudado, principalmente na área de melhoramento genético, possuindo características ideais para este propósito, tais como: ciclo curto de reprodução, planta alógama que suporta a autofecundação, monóica, fácil controle da polinização, dentre outras (Bull, 1993).

Com o emprego do melhoramento genético, tem-se conseguido aumentar em grande escala a produtividade das espécies e, com o milho, não foi diferente (Paterniani, 1987). Um importante tópico que deve ser levado em consideração é a diversidade genética da cultura, e o milho, por meio das seleções artificiais praticadas pelo homem ou pelas seleções naturais (adaptações a diferentes condições ecológicas), chegou ao homem civilizado com cerca de 300 raças diferentes, além da diversidade de variedades intra-raciais, sendo uma das espécies de maior diversidade genética na natureza (Bull, 1993).

No caso específico da cultura do milho, o melhoramento tem sido responsável por incrementos de rendimento, principalmente pela exploração do fenômeno da heterose, fator este, bastante expressivo nas plantas alógamas.

Além de incrementar o rendimento da cultura do milho, 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 milhos braquíticos (br_2br_2) apresentam boa resistência ao acamamento e ao quebramento, além de melhor adaptação à colheita mecânica (Santos, 1991). Tal característica deve ser enfatizada principalmente em programas de melhoramento para regiões onde há predominância de clima quente e ocorrência de ventos fortes, pois temperaturas elevadas fazem com que as plantas de milho tendam a crescer muito e os ventos fazem com que a cultura tenda a apresentar grande proporção de plantas acamadas e/ou quebradas, prejudicando a colheita mecanizada.

Para 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 (estratificada e estratificada geneticamente); seleção com teste de progênies; seleção recorrente (simples, para capacidade geral de combinação, para capacidade específica de combinação, recíproca, recíproca com famílias de meios-irmãos, com famílias de meios-irmãos obtidas de plantas prolíficas, com famílias de irmãos completos).

A seleção recorrente foi conceituada por Hull (1945) como a prática de re-seleção, geração após geração, com intercruzamentos entre os tipos selecionados, para se obter recombinação gênica. Sua proposta visava elevar a frequência dos genes mais favoráveis e manter a endogamia num nível baixo, assegurando um alto grau de variabilidade genética, para conduzir a seleção efetiva, por um longo período. Com esta estratégia, a cada ciclo de seleção recorrente, vai ocorrendo maior concentração de genes favoráveis nas populações trabalhadas, com o conseqüente incremento da média populacional (Pinto, 1995).

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 agrônomico. Com a seleção recorrente recíproca, teoricamente, tira-se 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.

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, conforme discutido por Eyherabide e Hallauer (1991), permite, ao mesmo tempo, assegurar ganhos genéticos diretos (nas populações *per se*) 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. Em milho, usualmente procede-se a autofecundação da 2ª espiga de cada uma das plantas. A 1ª espiga (superior) de cada planta é fecundada com pólen de outra planta (Paterniani e Campos, 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 (progênes) mais promissoras. Cada ciclo se completa quando as progênes S₁ de cada população, correspondentes aos melhores cruzamentos, são recombinaadas em lote isolado, produzindo assim as populações melhoradas A₁ e B₁.

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, 1987). Assim, depois de avaliadas as progênes de irmãos completos, as sementes S₁ correspondentes às melhores progênes são plantadas, efetuando-se a autofecundação das plantas envolvidas nos cruzamentos, gerando, após algumas gerações de autofecundação, linhagens potenciais para híbridos de alta produção.

Considerando que a heterose é a função do somatório do quadrado da distância genética entre as populações vezes os desvios de dominância (Hallauer, 1985; Hallauer e Miranda Filho, 1988), é fundamental que se escolha populações divergentes e preferencialmente de grupos heteróticos distintos. No caso do milho, existem dois grupos heteróticos, os denominados 'DENT' e 'FLINT'. A maioria dos híbridos de milho pertence a tais grupos heteróticos. No caso da seleção recorrente recíproca, o melhoramento ocorre simultaneamente em ambas as populações, ampliando a cada ciclo, o potencial genético das populações e das linhagens derivadas e, conseqüentemente dos híbridos resultantes. Paterniani e Miranda Filho (1987) preconizam que, para se obterem melhores milhos híbridos, é necessário contar com populações melhoradas. As linhagens obtidas a partir de uma variedade ocorrem com uma probabilidade que é função direta das freqüências gênicas na população. Assim, à medida que as freqüências dos genes mais favoráveis aumentam, por meio do melhoramento populacional, as linhagens superiores terão maior probabilidade de ocorrência.

2.6. Generalidades sobre o milho braquítico (br_2)

O caráter braquítico em milho foi inicialmente descrito por Kempton (1920), que considerou como plantas braquíticas aquelas que apresentavam internódios mais curtos, sem mudanças acentuadas no número e tamanho de outros órgãos. O encurtamento dos internódios, associado à permanência da quantidade dos mesmos, promove, nessas plantas, menores alturas de planta e de espiga quando comparadas com as das plantas normais (Castiglioni, 1986). Ainda, em comparação com o milho normal, tais plantas tendem a apresentar maior diâmetro de colmo (Kempton, 1920; Anderson e Chow, 1963; Leite e Paterniani, 1973), maior largura de folhas (Paterniani, 1973), maior peso de cem grãos (Castiglioni, 1986) e maior tolerância à seca, esta causada, provavelmente, pelo maior desenvolvimento do sistema radicular (Campbell, 1965; Tregubenko e Nepomnjascij, 1969). Quanto ao número de folhas e comprimento da espiga, não foram encontradas diferenças significativas (Kempton, 1920; Anderson e Chow, 1963).

Estudos realizados por Lambert (1963) determinaram que o alelo br_2 está localizado no braço longo do cromossomo 1. Acredita-se que tal alelo, quando em dose dupla, confere menor porte à planta em virtude de promover a formação de um tipo diferente de giberelina, menos ativa na promoção do crescimento (Galston e Davies, 1972). O efeito principal do alelo braquítico é a redução no acamamento e no quebramento das plantas, sendo tais plantas indicadas para regiões cujas lavouras sofram ação de ventos fortes.

Quanto à produtividade, os trabalhos iniciais com milho braquítico obtiveram menores produtividades quando comparados com os de milhos normais (Leng, 1957, Campbell, 1965). As explicações, para isso, seriam: recuperação incompleta do genótipo original após a incorporação do gene br_2 , devido ao reduzido número de retrocruzamentos; pouca oportunidade de seleção para capacidade geral de combinação na obtenção de híbridos; altura da planta e maior ataque de roedores (Leng, 1957); além de experimentos plantados em áreas onde a altura de planta não era problema sério associado a práticas culturais ineficientes realizadas nos mesmos (Campbell, 1965).

Já Sokolov e Domasnev (1968), citados por Zanette e Paterniani (1992), verificaram a superioridade de produtividade de 118 híbridos simples braquíticos, quando comparada com a das mesmas variedades normais. Zanette e Paterniani (1992) verificaram que, mesmo dentro de milhos braquíticos, os de porte mais altos foram mais produtivos que os de porte mais baixo.

2.7. Seleção simultânea de características: índices de seleção

O melhoramento genético tem-se constituído em uma das mais bem sucedidas tecnologias desenvolvidas na agricultura, sendo responsável por 50% dos incrementos de rendimentos observados, não somente no milho, como também na maioria das culturas. Por meio do melhoramento genético, novas variedades são desenvolvidas, com características superiores (Paterniani e Campos, 1999).

Quase que de forma genérica, o melhoramento genético tem priorizado aumento na produtividade das culturas. Todavia, a comunidade científica tem-se conscientizado de que a produtividade não é o único caráter a ser considerado em um programa de melhoramento. Nesse contexto, características outras, de interesse para o consumidor, também têm sido consideradas no processo de seleção em programas de melhoramento.

Segundo Cruz e Regazzi (1997), para se obterem materiais genéticos realmente superiores, é necessário que o material selecionado reúna, simultaneamente, uma série de atributos favoráveis que lhe confira rendimento comparativamente mais elevado e que satisfaça às exigências do consumidor. A seleção com base em uma, ou em poucas características, tem-se mostrado inadequada, por conduzir a um produto final superior em relação às características selecionadas, mas com desempenho não tão favorável em relação às várias outras características não consideradas.

Uma maneira de se aumentar a chance de êxito de um programa de melhoramento é por meio da seleção simultânea de um conjunto de características de importância econômica. Para tal objetivo, a utilização de índices de seleção parece ser uma alternativa eficiente, pois 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.

Os índices de seleção permitem criar novos valores, associados a cada genótipo estudado, sobre o qual se exerce a seleção. O conjunto destes valores funciona como um caráter adicional, teórico, resultante da combinação de determinadas características, escolhidas pelo melhorista, sobre as quais se deseja exercer a seleção simultânea (Cruz e Regazzi, 1997).

Diferentes índices representam diferentes alternativas de seleção e, conseqüentemente, de ganhos. Estes identificam, de maneira rápida e eficiente, materiais genéticos que podem ser mais adequados para os propósitos do melhorista. Como atualmente já se dispõe de recursos computacionais e aplicativos adequados à estimação desses índices, sua obtenção é operacionalmente simples, inexistindo razão para que não sejam utilizados (Cruz e Regazzi, 1997). Diversos trabalhos em distintas culturas têm utilizado estes recursos (Marques, 2000; Martins et al., 2003; Granate et al., 2001; Granate et al., 2002).

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

De acordo com Reis (1981), o índice de seleção possui algumas limitações, tais como, dificuldades em se obter estimativas precisas de variâncias e covariâncias genotípicas e fenotípicas, problema de avaliação da importância econômica apropriada para cada característica e necessidade de esperar que medições sejam feitas para todas as características, antes que se proceda à seleção.

Cunningham (1969) relata que as conclusões gerais que podem ser

tiradas em relação às limitações do uso do índice de seleção são que a maior fonte de problemas é o uso de estimativas imprecisas de variâncias e covariâncias genéticas. A estrutura da variância e da covariância genética e de ambiente da população, bem como o balanço econômico das características, mudarão com o tempo e provavelmente irão requerer mudanças periódicas no índice.

Segundo Hanson e Johnson (1957), não há necessidade de designar valores econômicos para todas as características. Para melhorar uma característica primária, como a produção, toma-se o peso econômico desta como 1,0 (um) e as características secundárias como zero. Esse método tem permitido bons resultados no melhoramento para produção.

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, sujeito às 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. Entretanto, Tai (1977) apresentou uma generalização no método, de forma a possibilitar a inclusão dessas características no índice.

Kemphorne e Nordskog (1959) foram os primeiros a inserirem a idéia de restrição sobre os índices de seleção. Sua proposta foi uma solução matemática para maximizar o ganho em um conjunto de características, impondo a restrição de que o ganho em outro conjunto de características fosse nulo. A utilização de tal índice é de grande interesse quando o material a ser melhorado possui uma ou mais características cujos valores médios se encontrem ideais.

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 Carneiro (2003), 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, por dispensar as estimativas de variâncias e covariâncias fenotípicas e genotípicas e 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 na 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 em uma medida adicional, tomada como índice de seleção.

Considerando que as matrizes das variâncias e covariâncias genotípicas e fenotípicas, necessárias para a obtenção dos coeficientes do índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943), podem estar associadas à baixa precisão ou ainda apresentar multicolinearidade, o que pode provocar distorções nos resultados finais, Elston (1963) apresentou o índice “livre de pesos” ou “livre de parâmetros”, o qual se caracteriza por eliminar a necessidade de estabelecer pesos econômicos relativos às várias características e estimar as variâncias e covariâncias fenotípicas e genotípicas.

Cruz e Carneiro (2003) relatam que o índice proposto por Elston (1963) é semelhante ao índice multiplicativo de Subandi et al. (1973). Em seu trabalho, Subandi et al. (1973) relatam que o índice multiplicativo é muito fácil de ser aplicado, não sendo necessários o estabelecimento dos pesos econômicos e a estimativa das variâncias e das covariâncias fenotípicas e genotípicas. Os autores relatam ainda que este índice parece ser flexível às condições ambientais, já que, quando uma característica envolvida no índice torna-se mais importante em um

dados ambiente, o índice automaticamente fornecerá um peso maior para essa característica em particular. Segundo os autores, a pressuposição que envolve este índice, de que o valor fenotípico é uma exata medida do valor genotípico, não é verdadeira e, portanto, ao utilizar seleção de famílias, comparativamente à seleção de indivíduos, esse viés será menor.

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. Nesses casos, a possibilidade de variação nas magnitudes dos pesos econômicos torna bastante hábil a estimativa 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.

Em milho pipoca, Granate et al. (2002) realizaram a predição de ganho genético com diferentes índices na seleção sobre 166 famílias de meios-irmãos do composto de milho pipoca CMS-43. Concluíram que os ganhos preditos com o índice de seleção de Smith e Hazel são superiores aos preditos com os outros índices testados e manifestam-se em mais caracteres. Ainda concluíram que o índice de seleção de Smith e Hazel, quando utilizado para a seleção simultânea nas características altura de planta, produtividade e capacidade de expansão (ideótipo de plantas mais baixas, mais produtivas e de maior capacidade de expansão) com os pesos obtidos por tentativas, permite estimar os ganhos preditos considerados de mais interesse para o melhoramento desta população de milho pipoca.

2.8. Marcadores moleculares

O conhecimento da estrutura genética das populações é de grande importância num programa de melhoramento que vise à obtenção de híbridos de milho. Essas populações devem apresentar alta frequência de alelos favoráveis para possibilitarem a seleção de genótipos superiores. Porém, a avaliação dos genótipos e a confiabilidade dos dados experimentais num programa de melhoramento de plantas é um grande desafio, principalmente para características de herança complexa, como a produtividade de grãos. Assim, esforços têm sido feitos para integrar algumas técnicas de biologia molecular aos procedimentos convencionais de melhoramento de plantas, uma vez que diversos estudos demonstraram a sua aplicabilidade e eficiência na avaliação desses caracteres (Rumin e Vencovsky, 2001).

Os marcadores moleculares têm sido sugeridos como ferramenta útil ao melhoramento de plantas com distintas finalidades – caracterização de acessos e descrição de variedades; mensuração de distâncias genéticas; monitoramento de retrocruzamentos; em programas de pré-melhoramento; no próprio processo de seleção (Rumin e Vencovsky, 2001). O programa de pré-melhoramento é definido como o conjunto de atividades que visam à identificação de características e/ou genes de interesse, presentes em materiais não adaptados ou naqueles que não foram submetidos a qualquer processo de melhoramento, visando posterior incorporação nos materiais adaptados ou elites (Nass e Paterniani, 2000).

Por marcador molecular, define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas ou de segmentos específicos de DNA, correspondentes a regiões expressas ou não no genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Por atuarem diretamente no nível de DNA, os marcadores de DNA são ferramentas moleculares poderosas, pois são isentos de 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). Sabe-se que a variabilidade genética é a base de todo melhoramento de plantas, existindo, para identificação da mesma, diversas técnicas moleculares (Milach, 1998).

A possibilidade de marcar genes de importância, sejam eles qualitativos ou quantitativos, por meio 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). Desta forma, as variedades poderão ser caracterizadas por completo, permitindo o planejamento dos cruzamentos, a escolha dos genótipos a serem cruzados e a geração da variabilidade de forma controlada (Milach, 1998).

O primeiro mapa genético desenvolvido foi o da mosca *Drosophila*, em 1913, por Sturtevant. Em se tratando de plantas, um dos primeiros mapas genéticos a ser desenvolvido foi o do milho (*Zea mays*) por Emerson, Beadle, Rhoades e McClintock (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A seleção auxiliada por marcadores poderá ser realizada sem a ocorrência de estresses bióticos e abióticos, além de permitir melhor conhecimento da transmissão de caracteres entre as diferentes gerações, e ainda um melhor controle dos genes mantidos nas populações, permitindo, assim, a eliminação de genótipos indesejáveis nas primeiras gerações (Milach, 1998). Diante do exposto, observa-se que trabalho e tempo também são economizados.

O uso de marcadores em genética e no melhoramento remonta ao início do século passado, quando Bateson e Punnet, estudando ervilhas, indicaram a existência de ligação entre os genes que controlam os caracteres cor da pétala e a forma do grão de pólen. Tempos depois, Thomas H. Morgan demonstrou claramente que nem todos os genes têm segregação independente. Pelo contrário, genes podem estar ligados em grupos pelo mesmo filamento de material em que residem, os cromossomos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Desta forma, estava lançada a base para a utilização de marcadores no melhoramento, tanto para características qualitativas quanto quantitativas, pois, com os marcadores moleculares, existe a possibilidade de se mapear segmentos de DNA que contêm locos que controlam estes caracteres e monitorar a segregação destes nas populações, assim como mensurar as contribuições destes para os diferentes caracteres. Naturalmente, novos modelos genéticos de análises foram e estão sendo desenvolvidos para que essa nova técnica possa ser incorporada de vez nos programas de melhoramento (Liu, 1988).

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 revelam, para uma dada região do DNA, uma marca ou banda que permite comparar os indivíduos em estudo quanto à sua presença ou ausência. Assim, as bandas reveladas são codificadas pelo número 1 e as não reveladas pelo número 0. Com isso, cria-se uma matriz de dados binários em que são aplicados os métodos estatísticos (Meyer, 2004).

Na maioria dos modelos utilizados (isoenzimas, RFLP, RAPD, dentre outros), cada marcador é analisado como uma característica fenotípica distinta e independente das demais. A interpretação deste tipo de dado é feita de maneira simples: bandas em comum entre genótipos representam similaridades genéticas, enquanto bandas não comuns representam diferenças genéticas (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 utilizado como iniciadores, *primers*, que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Porém, a construção de *primers* para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990 por dois grupos distintos: Williams et al. e Welsh e McClelland. A idéia foi de utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade do conhecimento prévio da seqüência (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Esta nova técnica trata-se do RAPD ('Random Amplified Polymorphic DNA'), DNA polimórfico amplificado ao acaso, que utiliza *primers* de seqüências aleatórias e apenas um é empregado em cada

reação realizada pela Taq DNA polimerase, podendo ser aplicado a qualquer organismo sem o prévio conhecimento da seqüência do DNA a ser analisada (Tardin, 2001). De acordo com Tardin et al. (2001), a técnica RAPD determina uma análise segura da diversidade genética, sendo útil no objetivo de reduzir custos e tempo no desenvolvimento de futuros trabalhos.

Outras vantagens do uso de marcadores RAPD são sua simplicidade e rapidez. Isso se deve à possibilidade de se detectar polimorfismo pela visualização direta das bandas no gel. Além desta, é necessário uma pequena quantidade de DNA para a análise genotípica de um indivíduo. Por se basear no PCR, a técnica RAPD é muito mais sensível à detecção de polimorfismo ao nível de DNA. E ainda o custo da técnica é mais baixo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Com o advento dos marcadores moleculares, os estudos de divergência genética e das relações filogenéticas entre espécies vegetais têm merecido atenção (Duarte et al., 1999). Nesses estudos, os pesquisadores se interessam em agrupar os indivíduos semelhantes, de forma que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados (Meyer et al., 2004). A classificação de genitores em grupos heteróticos e a realização de cruzamento entre tipos geneticamente distintos contribuem para a ampliação da variância genética em populações segregantes (Milach, 1998).

Métodos estatísticos de análise, tais como, análise de agrupamentos, análise discriminante, análise de fatores e análise de componentes principais, podem ser aplicados para auxiliar os estudos de diversidade. Dentre eles, a análise de agrupamentos se destaca, pois não exige pressuposição inicial quanto à distribuição de probabilidades dos dados e por ser de fácil interpretação. Tal técnica é muito utilizada na área de melhoramento genético (Meyer, 2004).

2.9. Análise de agrupamento

As técnicas de agrupamento objetivam agrupar distintos indivíduos em classes, de forma que os mais semelhantes permaneçam na mesma classe. De forma geral, o número de classes não é conhecido inicialmente (Manly, 1994).

Para realização de tais técnicas, é necessária a escolha de uma medida que quantifique a semelhança entre dois indivíduos. Tais medidas são

denominadas coeficientes de similaridade, os quais podem ser divididos em duas categorias: medidas de similaridade e medidas de dissimilaridade. No caso das primeiras, quanto maiores os valores observados, mais parecidos são os indivíduos; já para as medidas de dissimilaridade, quanto maiores os valores, menos parecidos são os indivíduos.

Os coeficientes de similaridade são criados com o intuito de moldar situações especiais e de interesse do pesquisador. Devido a isso, dispõe-se de uma ampla série de tais medidas. Segundo Bussab et al. (1990), uma análise das propriedades desses coeficientes ajuda a identificar alguns princípios gerais e encontrar algum coeficiente que melhor se ajuste aos interesses de uma pesquisa em particular. Contudo, essa escolha não é comum, e os trabalhos, comumente, não justificam nenhuma escolha em particular, notadamente para dados de marcadores moleculares (Meyer et al., 2004).

Os resultados dos agrupamentos podem sofrer influência pelo coeficiente de similaridade escolhido (Gower e Legendre, 1986; Jackson et al., 1989; Duarte et al., 1999; Meyer, 2004). Buscando avaliar se diferentes coeficientes de similaridade influenciam os resultados das análises com marcadores moleculares, Meyer et al. (2004) utilizaram dados de dezoito linhagens de milho provenientes de duas populações diferentes, BR-105 e BR-106, as quais foram analisadas por marcadores do tipo AFLP e RAPD. Compararam, usando diversas metodologias estatísticas, os resultados obtidos para diversos coeficientes de similaridade, coeficiente de Jaccard, Sorensen-Dice, Anderberg, Ochiai, Simple Matching, Rogers e Tanimoto, Ochiai II e Russel e Rao.

Meyer et al. (2004) concluíram que praticamente todas as metodologias utilizadas, para ambos marcadores, os coeficientes de Jaccard, Sorensen-Dice, Anderberg e Ochiai, mostraram resultados semelhantes entre si, atribuindo tal fato de apresentarem como propriedade comum a desconsideração da ausência conjunta de bandas. Isso também foi observado para os coeficientes Simple Matching, Rogers e Tanimoto e Ochiai II, que não apresentaram grandes alterações de resultados, possivelmente devido ao fato de todos considerarem a ausência conjunta. O coeficiente de Russel e Rao apresentou resultados totalmente discrepantes dos demais, em função de excluir a ausência conjunta do numerador e incluí-la no denominador, não sendo recomendado seu uso. Os autores sugerem a escolha dentre os coeficientes que desconsideram a ausência

conjunta, devido ao fato de tal ausência não significar necessariamente que as regiões do DNA sejam idênticas.

Assim como os coeficientes de similaridade, diversos são os métodos de agrupamento encontrados na literatura. Descrições detalhadas desses métodos são fornecidas por Rao (1952), Anderberg (1973), Sneath e Sokal (1973), Clifford e Stephenson (1975), Morrison (1976), Mardia et al. (1979), Chatfield e Collins (1980), Dunn e Everitt (1980), Bussab et al. (1990), Johnson e Wichern (1992), Manly (1994), Totti (1998) e Cruz e Carneiro (2003).

Como o presente trabalho utilizou apenas duas técnicas de agrupamento, ou seja, o método de otimização de Tocher e o método hierárquico da variância mínima de Ward, apenas estas foram contempladas na revisão.

2.9.1. Método de otimização de Tocher

Os métodos de otimização possuem como princípio a formação de grupos de modo a promover a homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Para tal, é realizada a partição do conjunto de indivíduos em subgrupos mutuamente exclusivos por meio da maximização ou minimização de alguma medida pré-definida (Cruz, 2001).

Entre os métodos de otimização, um dos mais empregados na área de genética e melhoramento é o método de otimização de Tocher (Cruz e Carneiro, 2003). Segundo Tocher, este método deve ser estabelecido pelo critério de que os valores das distâncias intragrupos sejam inferiores a quaisquer distâncias intergrupos.

Por este método, é identificado o par de genótipos que apresenta o menor valor de distância (d_{ii}) na matriz de dissimilaridade, que formará o grupo inicial. Em seguida, é avaliada a possibilidade de inclusão de outros genótipos nesse grupo inicial. A entrada de um genótipo num grupo aumenta o valor médio da distância intragrupos. A inclusão ou não deste genótipo no grupo será permitida se o acréscimo no valor da distância média intragrupos não ultrapassar um valor máximo permitido (Carvalho, 1993), que pode ser arbitrariamente estabelecido ou corresponder ao valor máximo da medida de dissimilaridade (d_{ii}), obtido no conjunto de menores distâncias envolvendo cada par de indivíduos.

2.9.2. Método hierárquico da variância mínima de Ward

O método hierárquico da variância mínima de Ward 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).

Dantas et al. (2001), estudando a tolerância ao alumínio em 18 somaclones e três cultivares porta-enxerto provenientes da seleção *in vitro* de macieira (*Malus* sp.), verificaram que o agrupamento hierárquico baseado no método de Ward revelou ser mais adequado na classificação dos clones quanto à tolerância ao alumínio do que a dos testes de médias.

Já Emygdio et al. (2003), utilizando o agrupamento de Ward com base em resultados de marcadores RAPD, para estudar a divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão, verificaram que tal agrupamento foi eficiente ao agrupar cultivares de acordo com o centro de domesticação, mas não foi capaz de separar as cultivares de acordo com a coloração da semente. Concluíram também que cultivares locais e comerciais mesoamericanas foram agrupadas separadamente. E ainda verificaram que as cultivares comerciais, em cultivo no Rio Grande do Sul, apresentam alto grau de similaridade.

2.10. Análise discriminante

Empresas produtoras de sementes de milho investem no controle da qualidade, monitorando todas as fases da produção, a fim de assegurar a chegada, ao agricultor, da heterose alcançada pelo melhoramento genético, o que atesta a importância da manutenção da pureza genética de cada combinação híbrida, em todas as fases do processo de produção (Craig, 1977; Stuber et al., 1988).

Em campos de produção de sementes híbridas de milho, a principal causa de contaminação genética é a ocorrência de autofecundação do parental fêmea, decorrente da remoção incompleta dos pendões liberadores de pólen (Hutchcroft, 1959). A mistura de sementes, provenientes do parental fêmea autofecundado, com as sementes híbridas pode reduzir a qualidade fisiológica do lote e promover perdas no rendimento de grãos, contrárias aos objetivos do ganho genético alcançado pelos melhoristas (Smith & Wyck, 1984; Von Pinho, 1995).

Diante do exposto, podem-se imaginar as conseqüências trágicas acarretadas pela ocorrência de contaminantes nas linhagens ou populações genitoras de tais híbridos. Possivelmente, as mesmas ficariam inviáveis para a continuação do programa de obtenção dos híbridos.

Assim, em programas de melhoramento que utilizam seleção de indivíduos superiores, para formar uma nova população melhorada, há grande preocupação da ocorrência de contaminações genéticas. Para isso, tais programas direcionam seus cruzamentos ou autofecundações, utilizando-se de metodologias que previnam a ocorrência de cruzamentos não desejados, o que originariam sementes denominadas de contaminantes. Em outras palavras, um grão de pólen desconhecido proveniente de planta pertencente à outra população, ao fecundar um ovário de uma planta da população de interesse, daria origem a uma semente cuja origem paterna é desconhecida.

Tal semente, ao ser utilizada para formar a nova população melhorada, poderia estar contribuindo para a perda das características originais da população, uma vez que traria consigo alelos distintos daqueles da população de interesse, a qual, por sua vez, perderia sua identidade.

Num programa de melhoramento que utiliza a seleção recorrente recíproca em duas populações, no intuito de se explorar a heterose entre as mesmas, é de grande interesse que tais populações possuam, preservem ou, se possível, aumentem sua distância genética.

Metodologias que possibilitem a identificação dos indivíduos selecionados como pertencentes à sua população original ou a outra, auxiliariam na manutenção da distância genética entre as populações, uma vez que possibilitariam a eliminação dos mesmos antes da recombinação. Tais indivíduos, ao não serem eliminados nos programas tradicionais, poderiam estar contribuindo para a perda da identidade genética de cada população, acarretando uma

aproximação genética entre as populações, o que reduziria a possibilidade de exploração da heterose num híbrido formado entre as mesmas, principalmente em ciclos avançados de seleção.

A técnica multivariada de análise discriminante, que possui, como uma de suas finalidades, a obtenção de funções que permitam classificar um indivíduo, com base em um número de características do mesmo, como pertencentes a uma de várias populações distintas, busca minimizar a probabilidade de classificação errônea de um indivíduo em uma população quando o mesmo pertence à outra (Cruz e Carneiro, 2003). Entretanto, esta técnica poderia ser utilizada para monitoramento de programas de seleção recorrente recíproca, uma vez que os mesmos partem normalmente de populações geneticamente distintas.

Assim, tal técnica poderia estar auxiliando também na eliminação de contaminantes, uma vez que, ao trabalhar populações conhecidamente distintas, o surgimento de um genótipo, dentro de uma população caracteristicamente pertencente à outra, demonstraria a possível ocorrência de contaminação genética.

A análise discriminante pode tanto ser usada para características quantitativas, como, por exemplo, peso, altura, dias para o florescimento, número de plantas doentes. Como também, para características qualitativas, como, por exemplo, presença ou ausência de um determinado comprimento de fragmento de DNA numa análise eletroforética de um gel, que pode ser codificada por 1 (presença) e 0 (ausência) (Cruz, 2001). Neste caso, por não ocorrer influências ambientais, a análise discriminante revelaria resultados de má classificação mais precisos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. 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, oriundas da Universidade Federal de Viçosa, pertencentes a grupos heteróticos distintos, foram definidas para utilização conforme apresentadas a seguir:

Cimmyt – população pertencente ao grupo heterótico tipo 'Flint'. Possui um gene braquítico, sendo, portanto, de porte mais baixo.

Piranão – população pertencente ao grupo heterótico tipo "Dent". Esta população, à semelhança da anterior, possui um gene braquítico.

Ambas as populações já foram trabalhadas tanto em Viçosa quanto em Campos dos Goytacazes, sendo que o presente trabalho é uma seqüência ao programa de seleção recorrente conduzido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), na obtenção de mais um ciclo de seleção recorrente recíproca entre as famílias de irmãos completos. O porte mais baixo das populações é particularmente indicado para as regiões Norte e Noroeste Fluminense, onde a ocorrência de ventos é um problema maior que, normalmente, ocasiona o acamamento de lavouras de milho. As populações aqui indicadas possuem porte mais baixo, internódios curtos e colmo grosso, indicando maior resistência ao acamamento.

3.2. Procedimentos experimentais e de melhoramento

Cada ciclo de seleção recorrente envolve três etapas básicas: 1 - A geração de progênes ou famílias de irmãos completos; 2 - a avaliação das famílias, a fim de identificar aquelas que possuem características de interesse superiores; e 3 - a recombinação das sementes remanescentes correspondentes às famílias superiores, para a obtenção das populações em um ciclo mais avançado.

No intuito de melhorar as populações *per se* e, ao mesmo tempo, distanciá-las geneticamente, metodologias que possibilitem identificar genótipos superiores – quanto aos caracteres morfoagronômicos de interesse e destes ainda selecionar os mais divergentes entre populações – possibilitariam ganhos tanto na população *per se* quanto em cruzamentos, otimizando os métodos de seleção convencionais.

Assim, a metodologia utilizada seguiu aproximadamente a descrita por Hallauer e Miranda Filho (1987), com a introdução de mais uma etapa baseada na utilização de marcadores RAPD, visando à melhor manutenção da variabilidade genética das duas populações utilizadas e à possibilidade de preservar a distância genética entre as mesmas. Assim, antes da etapa de recombinação dos parentais superiores, última etapa de um ciclo de seleção recorrente, inseriu-se o processo de análise molecular do tipo RAPD, para realização de análises multivariadas como, por exemplo, análise discriminante e técnicas agrupamentos dos genótipos. De posse do cálculo das distâncias genéticas entre os parentais superiores, obtido pelas informações dos marcadores RAPD, inferiu-se sobre a possibilidade de má classificação destes genitores e a ocorrência de possíveis contaminações genéticas.

Marcadores RAPD, ou outro marcador de DNA, associado ao procedimento clássico de seleção recorrente, se justificam no sentido de que, além da seleção fenotípica conduzida no nível de campo, os marcadores atuam no nível de DNA, demonstrando, com maior precisão, a variabilidade genética dos possíveis indivíduos a serem recombinados. O que assegura a preservação da variabilidade ao longo dos ciclos de seleção, já que os marcadores auxiliam nas tomadas de decisão sobre quais genótipos devem ser recombinados.

3.3. Geração das famílias de irmãos completos e de sementes S_1

Em março de 2002, no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes, RJ, as populações 'Cimmyt' e 'Piranão' foram plantadas em fileiras alternadas para facilitar os cruzamentos para a obtenção das famílias de irmãos completos.

Para tanto, sementes provenientes das duas populações supracitadas foram plantadas, separadas e alternadamente, em filas de 6 m de comprimento, distanciadas em 1 m, a uma profundidade de 0,05 m e distanciadas 0,4 m entre si dentro de uma mesma linha.

A adubação de plantio foi feita com 500 kg/ha de N-P-K, da formulação 04-14-08. Aos trinta dias após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando uma planta por cova, bem como, uma adubação de cobertura, utilizando-se 60 kg/ha de nitrogênio, na forma de sulfato de amônio. Todos os tratamentos culturais foram realizados quando necessários, conforme as recomendações para a cultura (Fancelli e Dourado Neto, 2000).

Na obtenção das famílias de irmãos completos bem como de sementes S_1 , ou seja, provenientes de autofecundação, foram adotados os seguintes procedimentos: as espigas foram cobertas antes de soltar o estilo-estigma, utilizando-se sacolas de plástico transparentes. Consecutivamente, pendões liberando pólen foram cobertos com sacos de papel, e aguardaram um período de aproximadamente 24 h, para serem utilizados na polinização das espigas. Tal procedimento faz-se necessário, uma vez que o pólen perde sua viabilidade em 8 h, garantindo assim que qualquer pólen viável que se encontre na sacola, no dia seguinte, só possa ter sido proveniente do pendão coberto. O pólen proveniente do saco de papel de cada planta foi utilizado para polinizar a espiga viável de uma planta da fila vizinha, bem como sua própria espiga. Assim sendo, cada planta utilizada em cruzamento foi também autofecundada, gerando as progênes S_1 , necessitando, dessa forma, que as plantas utilizadas fossem prolíficas.

As plantas de cada fileira, num total de 15, foram numeradas para posterior identificação por ocasião dos cruzamentos. As espigas polinizadas foram também identificadas pelos números de sua posição e da fila a que pertenciam, bem como os números correspondentes da planta que lhe forneceu o pólen. Dessa forma, foi possível separar as espigas S_1 e aquelas que comporiam

as famílias de irmãos completos.

Todas as famílias S_1 obtidas foram armazenadas em câmara fria, para que, aquelas correspondentes às superiores, identificadas no teste de avaliação de progênie, e consideradas como classificadas corretamente na análise discriminante (aplicada aos dados obtidos pelos marcadores moleculares), posteriormente fossem recombinadas.

3.4. Avaliação das progênie de irmãos completos

As famílias de irmãos completos obtidas foram avaliadas, no ano agrícola de 2002/2003, num delineamento em blocos ao acaso, em dois ambientes (Campos dos Goytacazes, RJ - Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo - e Itaocara, RJ - Estação Experimental da PESAGRO/Rio), com duas repetições. Cada unidade experimental foi constituída de uma fileira de 5 m de comprimento, espaçadas em 1 m entre fileiras, e 0,2 m entre covas. No plantio, foram semeadas três sementes por cova e, após 30 dias da semeadura, foi efetuado o desbaste, deixando uma planta por cova, para formar um 'stand' de 25 plantas por parcela, o que equivale a 50.000 plantas/ha.

A adubação de plantio foi feita aplicando-se 500 Kg/ha de adubo N-P-K, na formulação 04-14-08. Tendo sido feita duas adubações de cobertura, com 60 e 40 Kg/ha de nitrogênio, respectivamente, aos 30 e 45 dias após o plantio, utilizando-se sulfato de amônio.

O plantio foi realizado em outubro de 2002, época considerada como estação tradicional de plantio. Por ocasião do mesmo, foi feita uma aplicação de herbicida pré-emergente (Primextra), na dosagem de 5 l/ha num volume de calda de 400 l/ha. As capinas foram realizadas quando necessárias.

As irrigações foram feitas duas vezes por semana, por um período de 2 h, com aspersor de 3 m³/h de lâmina d'água. A colheita foi realizada quatro meses após o plantio, mais especificamente, em fevereiro de 2003.

Após o florescimento das plantas, avaliaram-se:

a) *Número de Dias para o Florescimento*: 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*: altura média, em metros, de seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da folha-bandeira;

c) *Altura de Espiga*: altura média, em metros, das mesmas seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da espiga superior no colmo;

d) *Estande*: número total de plantas no momento da colheita;

e) *Plantas Quebradas*: número de plantas que se apresentaram quebradas, abaixo da espiga superior, no momento da colheita;

f) *Plantas Acamadas*: número de plantas que apresentaram ângulo de inclinação superior a 45° com a vertical, no momento da colheita;

g) *Empalhamento*: número de espigas mal empalhadas (que deixam grãos expostos), no momento da colheita;

Após colheita, ainda foram obtidos dados das seguintes características:

h) *Número de Espigas*: número total de espigas colhidas;

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

k) *Peso de Espigas*: peso, em quilogramas, das espigas despalhadas, com precisão de centésimos de quilograma;

l) *Peso de Grãos*: peso, em quilogramas, dos grãos debulhados, com precisão de centésimos de quilograma;

m) *Peso de 100 grãos*: peso, em gramas, de uma amostra de 100 grãos sadios, obtidos em balança com precisão de centésimos de grama.

3.4.1. Análise estatística

Foram realizadas, para cada característica, análise de variância conjunta, ou seja, considerando os dois ambientes. Para as características que demonstraram a ocorrência de interação entre genótipo e ambiente, foi realizado o desdobramento da interação, avaliando os genótipos dentro de cada local. Para tanto, os dados obtidos foram analisados utilizando-se os recursos computacionais do programa GENES (Cruz, 2001).

As características mensuradas foram submetidas a uma análise de variância, conforme o delineamento em blocos ao acaso, com duas repetições,

em dois ambientes, de acordo com o modelo genético estatístico:

$$Y_{ijk} = \mathbf{m} + G_i + A_j + GA_{ij} + B / A_{jk} + e_{ijk} ;$$

em que:

Y_{ijk} = observação da característica no k-ésimo bloco, avaliada dentro do j-ésimo ambiente no i-ésimo genótipo;

\mathbf{m} = média geral;

G_i = efeito do i-ésimo genótipo considerado aleatório;

A_j = efeito do j-ésimo ambiente, considerado fixo;

GA_{ij} = efeito da interação entre o i-ésimo genótipo e o j-ésimo ambiente, considerado aleatório;

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

e_{ijk} = efeito do erro experimental associado à observação de ordem ijk , considerado aleatório.

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

Quadro 1 – Esquema da análise de variância com as respectivas fontes de variação (FV); graus de liberdade (GL); quadrados médios (QM), esperanças de quadrados médios [E(QM)]^{1/}; e estatística F

FV	GL	QM	E (QM) ^{1/}	F
Blocos/Ambientes	$a(b - 1)$	QMB	$s^2 + gs_{B/A}^2$	
Ambiente (A)	$a - 1$	QMA	$s^2 + \frac{ba}{a-1}s_{GA}^2 + gs_{B/A}^2 + bg\Phi_A$	$\frac{QMA + QMR}{QMB + QMGA}$
Genótipos (G)	$g - 1$	QMG	$s^2 + bas_G^2$	QMG / QMR
G x A	$(g - 1)(a - 1)$	QMGA	$s^2 + \frac{ba}{a-1}s_{GA}^2$	$QMGA / QMR$
Resíduo	$a(g - 1)(b - 1)$	QMR	s^2	
Total	$bga - 1$			

^{1/} a = número de ambientes; b = número de blocos; g = número de genótipos

3.4.2. Estimadores de parâmetros genéticos

De posse das esperanças de quadrados médios, apresentadas no Quadro 1, foram obtidas as estimativas dos componentes de variância. O estimador da variância genotípica entre famílias é expresso por:

$$\hat{s}_G^2 = \frac{QMG - QMR}{b.a},$$

em que: QMG = quadrado médio de famílias;

QMR = quadrado médio do resíduo;

b = número de repetições; e

a = número de ambientes.

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

$$h_{\bar{x}_f}^2 = \frac{\hat{s}_G^2}{\hat{s}_P^2} = \frac{QMG - QMR}{QMG}$$

Sendo, $\hat{s}_P^2 = \frac{QMG}{b.a}$, o estimador da variância fenotípica entre médias de famílias.

3.4.3. Seleção baseada na utilização do índice clássico proposto por Smith (1936) e Hazel (1943)

Para seleção das famílias superiores quanto aos atributos morfoagronômicos, para realização de análise discriminante das mesmas por meio da utilização de características moleculares em nível de DNA, e posterior formação do lote de recombinação, utilizou-se a potencialidade do índice de seleção, mais especificamente o índice Clássico de Smith (1936) e Hazel (1943). A opção por este índice se deve por já haver demonstrado eficiência na obtenção de ganhos desejáveis para diversas características no mesmo programa de melhoramento, no ciclo anterior ao atual (Tardin et al., 2003) e num programa de melhoramento de milho pipoca da mesma instituição (Daros, 2003; Santos et al., 2003). Ao todo, 43 famílias avaliadas em cada população foram selecionadas para a composição do lote a ser utilizado para estudo de divergência genética via

RAPD. O Programa computacional GENES (Cruz, 2001) foi empregado para a realização das análises.

Para tanto, foram atribuídos pesos econômicos para cada característica analisada que demonstrou diferenças significativas, pelo teste F, na análise de variância. Tais pesos foram escolhidos aleatoriamente, por meio de tentativas, atentando-se para os ganhos mais favoráveis para cada característica em questão, com ênfase para o peso de grãos.

Os cálculos das estimativas dos parâmetros genéticos foram realizados para serem estimados os ganhos por seleção (GS), pela expressão:

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

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

\bar{X}_o = média de todas as famílias avaliadas; e

$h_{\bar{x}_f}^2$ = herdabilidade com base na média de famílias.

3.5. Avaliação da diversidade genética (Marcadores de DNA)

Tal etapa, com exceção da análise discriminante, foi realizada em conjunto com Gabriel (2004), e parte dos resultados serviu de base para a autora realizar sua monografia para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Biotecnologia.

Para avaliação da diversidade genética entre e dentro das populações 'Cimmyt' e 'Piranão', e possível identificação de contaminantes, foram utilizadas plantas provenientes de sementes autofecundadas dos progenitores que deram origem a 43 famílias selecionadas como superiores pelo índice de seleção.

Com base em tal análise de diversidade, 25 genótipos em cada população foram selecionados para a etapa seguinte, a etapa da recombinação. Esta seleção foi realizada de forma a manter tanto a diversidade genética dentro das populações quanto a distância genética entre as populações, ou até mesmo ampliando-a.

Para a análise da diversidade via marcadores de DNA, parte das sementes S₁ estocadas, dos genitores das 43 famílias selecionadas, foram

cultivadas em vasos com terra, capacidade de 5 Kg, para obtenção de material vegetativo do qual pudesse ser extraído DNA. Foram coletadas folhas de 20 plântulas por genótipo aos 21 dias após o plantio, as quais foram envolvidas em papel alumínio e acondicionadas em recipiente contendo nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram maceradas, também em nitrogênio líquido, e acondicionadas em ultrafreezer (-70 °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.

3.5.1. Extração do DNA

Gabriel (2004) realizou testes preliminares de extração de DNA, envolvendo genótipos, das populações 'Cimmyt' e 'Piranão', e diferentes métodos de extração de DNA - Doyle e Doyle (1990) com modificações; Doyle e Doyle modificado com etapa adicional, sugerido por Ferreira e Grattapaglia (1998); e 'kit' de extração específico para DNA, 'Plant DNAzol', da 'Life Technologies'. A autora concluiu que, tanto o método proposto por Doyle e Doyle modificado quanto o 'kit plant DNAzol' originaram amostras de DNA que geraram bandas nítidas em gel, com concentrações significativas de DNA.

O 'kit plant DNAzol' foi o selecionado, embora sendo mais dispendioso, possui como vantagem a agilidade e facilidade do seu protocolo que é descrito a seguir:

Do material vegetal macerado, aproximadamente 100 mg foram transferidos para um tubo 'eppendorf' com capacidade de 1,5 ml e foi adicionado 300 ul de 'Plant DNAzol' misturado a 100 ug de RNase A/ml de 'Plant DNAzol'. Misturou-se por inversão durante cinco minutos a 25 °C e adicionaram-se 300 ul de clorofórmio e novamente misturou-se por inversão durante 5 minutos.

Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, e precipitado com 225 ul de etanol absoluto sendo invertido por seis a oito vezes e, depois, ficou em repouso por cinco minutos na bancada. Novamente, houve uma centrifugação a 7000 rpm por

4 minutos e posterior remoção do sobrenadante, possibilitando que o DNA permanecesse no fundo do tubo.

Foi preparada uma mistura de 'Plant DNAzol' / Etanol na proporção de um volume de 'DNAzol' para 0,75 de etanol absoluto. Dessa mistura, 300 ul foram adicionados ao tubo contendo DNA e, em seguida, a mistura foi homogeneizada. As amostras ficaram posteriormente em repouso por cinco minutos na bancada antes de serem novamente centrifugadas a 7000 rpm por quatro minutos. O DNA então foi lavado com 300 ul de álcool 70%, seguido de outra centrifugação a 7000 rpm por 4 minutos.

A última etapa consistiu em remover o álcool 70% por decantação e deixar o *pellet* secar em temperatura ambiente. O *pellet* então foi dissolvido em 70 ul de TE (pH 8) com sucessivas pipetagens.

A integridade das 86 amostras foi avaliada em gel de agarose 0,8% preparado por uma mistura de 250 ml de tampão TAE 0,5 X e 2,0 g de agarose comum, aquecida em forno de microondas por 2 minutos e, depois, polimerizada numa forma com capacidade para um pente de 50 poços. Nesse gel, já contendo as amostras de DNA, foi adicionado, em cada poço, 2 ul de DNA bruto e 4 ul de *blue juice*. Posteriormente, o gel foi submetido a uma eletroforese por aproximadamente 1,5 h a 60 volts e depois corado, por 30 minutos, em brometo de etídio, para posterior revelação.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro. Para tanto, foram preparadas amostras da seguinte forma: 5 ul do DNA bruto foram diluídos em 245 ul de TE e homogeneizado no vortex. O aparelho foi zerado com 250 ul de TE, amostra-padrão, e submeteram-se as amostras dos genótipos à leitura de 260 e 280 nm. Após a quantificação, prepararam-se amostras de trabalho por meio da diluição do DNA para concentração de 10 ng/ul.

3.5.2. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams et al. (1990), com modificações, num volume final de 25 µl, contendo os reagentes nas seguintes concentrações: Tris-HCl a 10 mM, pH 8,3; KCl a 50 mM; MgCl₂ a 2,4 mM; cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) a 100

μM ; oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a $0,3 \mu\text{M}$; 20 ng de DNA genômico e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotech). Foi utilizado o termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600) programado para $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto seguido de 45 ciclos de um minuto a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, um minuto a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ e dois minutos a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ e um passo final para extensão de sete minutos a $72 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando o modo de transição de temperatura de $1 \text{ }^\circ\text{C/s}$.

Para a seleção de iniciadores polimórficos, foi testado um total de 60 *primers* em oito dos 86 genótipos, sendo quatro de cada população, 'Cimmyt' e 'Piranão', seguindo procedimento similar ao protocolo já descrito.

Os produtos de amplificação (bandas) foram obtidos por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,2% e tampão TAE 1X, a 70 volts por três horas. A cada amostra, foram adicionados 5 μl de tampão de corrida *blue juice*. Ao final da eletroforese, o gel foi mergulhado em uma solução de brometo de etídio. Para leitura das bandas e arquivamento dos resultados, os géis foram fotodocumentados sob luz ultravioleta no sistema Eagle Eye II (Stratagene, USA).

3.5.3. Análise estatística dos marcadores RAPD

As bandas RAPD polimórficas foram utilizadas para a confecção de uma matriz de dados binários, atribuindo **1** à presença e **0** à ausência de determinada banda. A distância entre os pares de acessos foi calculada com base no Complemento Aritmético do Índice de Jaccard (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999), expresso por: $C_{ii} = 1 - \frac{a}{a + b + c}$, em que **a** representa o número de fragmentos de DNA, codificados com 1 (concordância positiva), comuns a ambos os indivíduos; e **b** e **c** registram o número de fragmentos de DNA, nos quais ambos os indivíduos discordam, respectivamente, representados por 1-0 e 0-1.

3.5.4. Análise de agrupamento

A matriz de distâncias gerada foi utilizada para o agrupamento dos genótipos pelo método de otimização de Tocher e pelo método hierárquico da variância mínima de Ward modificado, empregando-se para tal os recursos

computacionais do programa GENES (Cruz, 2001).

Vale a ressalva de que, para o método de otimização de Tocher, a inclusão de um genótipo num determinado grupo foi permitida quando o acréscimo no valor da distância média intragrupo não ultrapassou um valor máximo permitido. Valor este que correspondeu ao valor máximo da medida de dissimilaridade (C_{ii}), obtido no conjunto de menores distâncias envolvendo cada par de indivíduos.

No caso do método hierárquico da variância mínima de Ward, para formação do grupo inicial, são considerados os indivíduos que proporcionam a menor soma de quadrados de desvios. Admite-se que, em qualquer estágio, há perda de informações devido ao agrupamento formado, o qual pode ser quantificado pela razão entre a soma de quadrado dos desvios dentro do grupo em formação e a soma de quadrado total dos desvios. Enquanto se calcula a soma de quadrados dos desvios dentro do grupo, considerando apenas os genótipos dentro do grupo em formação, a soma de quadrados dos desvios totais considera todos os indivíduos disponíveis para análise de agrupamento (Cruz e Carneiro, 2003). O agrupamento é feito a partir das somas de quadrados dos desvios entre genótipos ou, alternativamente, a partir do quadrado da distância entre genótipos.

No caso do atual trabalho, o método de Ward foi modificado, pois ao invés de utilizar a distância euclidiana, foi utilizado o quadrado da distância entre genótipos, obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard.

3.5.5. Análise discriminante

A matriz de dados binários foi utilizada também para o estudo de análise discriminante, considerando, como medidas de distâncias, o complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando-se os recursos computacionais do programa GENES (Cruz, 2001). Neste programa, foram considerados os resultados da discriminação da população pela técnica da distância média do indivíduo em relação a cada população. O genótipo foi classificado, independentemente da classificação original, como pertencente àquela população que obteve o menor valor médio de distância.

3.6. Recombinação das progênies selecionadas

Os 43 progenitores de cada população, identificados como superiores na etapa de avaliação de campo, foram plantados, em linhas individuais de 6 m de comprimento, espaçadas de um metro 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 (Fancelli e Dourado Neto, 2000). Tal etapa ocorreu concomitantemente com o final da etapa de laboratório de obtenção de marcadores moleculares.

Dos 43 genótipos plantados de cada população, 18 foram eliminados e os 25 restantes foram utilizados para recombinação e formação das populações melhoradas 'Cimmyt' e 'Piranão', ciclo 9. Tal seleção procedeu de forma a maximizar a variabilidade genética nas populações trabalhadas, 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 citá-los em nível decrescente de importância:

1º – Eliminação dos genótipos considerados contaminantes, ou seja, pertencentes a uma população, porém geneticamente mais próximo da outra, identificados pela análise discriminante;

2º – Eliminação dos genótipos de uma das populações que, pelos métodos de agrupamento de otimização de Tocher e hierárquico de Ward, foram agrupados juntamente com indivíduos pertencentes à outra população;

3º – Eliminação dos genótipos cujo florescimento foi muito precoce ou tardio em relação ao conjunto, não possibilitando sua participação nos cruzamentos controlados para a obtenção das populações 'Cimmyt' e 'Piranão', ciclo 9;

4º – Eliminação dos genótipos que tiveram problemas de germinação, gerando poucas plantas para serem utilizadas para recombinação;

5º – Eliminação de genótipos geneticamente próximos, mantendo aqueles cujas médias de produção de grãos foram superiores.

Aos setenta dias após o plantio, iniciou-se o processo de recombinação das famílias selecionadas. De forma análoga à obtenção das progênies, as espigas foram cobertas antes da emissão do estilo-estigma, utilizando-se sacolas

plásticas.

Havendo espigas aptas a serem polinizadas, ou seja, com emissão de estilo-estigma, efetuou-se a preparação dos pendões, que consistiu em cobrir aqueles que se encontravam em fase inicial de liberação de grãos de pólen, fase considerada quando $1/3$ ou menos das anteras estão abertas. Tais pendões foram 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, foram colhidos e misturados para formarem 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 existiam pendões liberando pólen e espigas aptas a serem fecundadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das progênies de irmãos completos

Dentre as características estudadas, o número de plantas acamadas (NPA) obteve o valor de 22,86 na relação entre o maior e o menor quadrado médio de resíduo dentro de ambiente, ou seja, muito superior ao limite preconizado por Gomes e Garcia (2002), para a possibilidade de análise de variância conjunta. Tal valor observado pode ser explicado pelo fato da ocorrência de uma forte chuva dias antes da colheita do experimento de Itaocara, acarretando quebra de diversas plantas, principalmente aquelas que se encontravam acamadas. Sendo assim, os valores obtidos para plantas acamadas (NPA) e plantas quebradas (NPQ), não condizem com a realidade das famílias em estudo, porém servem de indicativo, sobre aquelas que, mesmo com as adversidades climáticas citadas, resistiram ao acamamento e quebramento das plantas.

4.1.1. Análise de variância

Na tentativa de aproveitar os dados coletados do número de plantas quebradas e plantas acamadas, somou-se o valor das duas e transformou-as em apenas uma variável, denominada de PQA, soma do número de plantas quebradas e acamadas. De fato, tal estratégia reduziu o valor do coeficiente de

variação, porém não o suficiente para considerá-lo médio ou baixo.

No Quadro 2, a seguir, encontra-se o resultado da análise de variância (ANOVA) conjunta, realizada para os experimentos de Campos dos Goytacazes e de Itaocara. Com exceção das características NDF, AP, AE e PCEM, as demais demonstraram existência de interação significativa entre o genótipo e o ambiente, sendo necessário, para estas, o desdobramento dos genótipos em cada ambiente, cujos valores também podem ser observados no quadro.

No caso das características NDF, AP, AE e PCEM, observam-se pela ANOVA diferenças significativas tanto em nível de ambiente, quanto em nível de genótipos, indicando, assim, uma variabilidade genética significativa entre famílias de irmãos completos (FIC), o que possibilita a continuidade do programa de melhoramento para tais características (Quadro 2). Ainda, por não ter ocorrido interação entre o genótipo e o ambiente, tais características podem ser melhoradas por meio de seleção de genótipos superiores comuns aos dois ambientes avaliados.

Das demais características, cuja interação entre o genótipo e o ambiente foi significativa, NTP, NTE, PE, PG e PQA comportaram-se semelhantemente nos dois ambientes, ou seja, demonstraram diferenças significativas entre os genótipos, em nível de 1% de probabilidade, dentro de cada ambiente. Já EME e NED, comportaram-se diferentemente nos ambientes estudados. Em Campos dos Goytacazes, estas características apresentaram diferenças significativas entre os genótipos, enquanto, em Itaocara, nenhuma diferença pôde ser observada (Quadro 2).

Quadro 2. Resumo da análise de variância com os respectivos quadrados médios e graus de liberdade (GL) e estimativas dos coeficientes de variação (CV) e das médias, para diversas características, avaliadas no ensaio fatorial, num delineamento em blocos ao acaso, em dois ambientes, Campos dos Goytacazes e Itaocara – RJ, no ano agrícola de 2002/2003

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio ^{1/}					
		NDF	AP	AE	NTP	EME	NTE
Bloco/Ambiente	2	10,2801	0,2332	0,1051	96,9332	39,1832	466,8017
Ambiente (A)	1	7392,0345**	26,5207**	10,7991**	589,5022*	70,6056 ^{ns}	1148,4914 ^{ns}
Genótipo (G)	115	7,4091**	0,0662**	0,0470**	16,2383**	4,7152**	70,3482**
A x G	115	2,5171 ^{ns}	0,0161 ^{ns}	0,0134 ^{ns}	8,8587*	4,1665**	39,1740**
Genótipo/Ambiente	230	-	-	-	12,5485	4,4408	54,7610
Genótipo/Campos	115	-	-	-	9,20781**	6,2331**	52,6864**
Genótipo/Itaocara	115	-	-	-	15,8892**	2,6486 ^{ns}	56,8358**
Resíduo	230	2,2193	0,0157	0,0120	5,8280	2,3093	24,6322
CV (%)		2,29	6,36	8,62	11,29	67,47	15,54
Média Geral		65,06	1,97	1,27	22,30	2,25	31,94
Média em Campos		69,05	1,73	1,12	23,43	2,64	33,52
Média em Itaocara		61,06	2,21	1,43	21,18	1,86	30,37

^{1/} NDF = número de dias para o florescimento; AP = altura da planta; AE = altura de espiga; NTP = número total de plantas; NPQ = número de plantas quebradas; NPA = número de plantas acamadas; EME = número de espigas mal empalhadas; NTE = número total de espigas; NED = número de espigas doentes; PE = peso de espigas; PG = peso de grãos; PCEM = peso de cem grãos; PQA = soma das plantas quebradas e acamadas.

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

Quadro 2, Cont.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio ^{1/}				
		NED	PE	PG	PCEM	PQA
Bloco/Ambiente	2	150,4224	1,6879	1,3227	14,4764	127,7931
Ambiente (A)	1	750,2155*	48,2718**	45,2563**	3733,4694**	1338,2414 ^{ns}
Genótipo (G)	115	25,9454**	0,6446**	0,4673**	21,7738**	45,1420**
A x G	115	20,2329*	0,4127*	0,3170**	8,3072 ^{ns}	22,1936**
Genótipo/Ambiente	230	23,0891	0,5286	0,3922	-	33,6677
Genótipo/Campos	115	31,1645**	0,4524**	0,3496**	-	35,5006**
Genótipo/Itaocara	115	15,0138 ^{ns}	0,6049**	0,4347**	-	31,8349**
Resíduo	230	15,2181	0,2910	0,2093	9,4895	16,8583
CV (%)		75,99	19,16	19,72	12,19	36,81
Média Geral		5,13	2,82	2,32	25,27	11,16
Média em Campos		6,41	3,14	2,63	28,11	9,46
Média em Itaocara		3,86	2,49	2,01	22,44	12,85

^{1/} NDF = número de dias para o florescimento; AP = altura da planta; AE = altura de espiga; NTP = número total de plantas; NPQ = número de plantas quebradas; NPA = número de plantas acamadas; EME = número de espigas mal empalhadas; NTE = número total de espigas; NED = número de espigas doentes; PE = peso de espigas; PG = peso de grãos; PCEM = peso de cem grãos; PQA = soma das plantas quebradas e acamadas.

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

A presença de valor significativo, na interação genótipo x ambiente para as características NTP, NTE, PE, PG e PQA, evidencia que as famílias estudadas não mantiveram a mesma equivalência para tais características nas duas localidades, indicando que as melhores famílias em um local podem não sê-las em outro. Resultados de interações significativas entre o genótipo e o ambiente para a característica peso de grãos, considerada como a mais importante, por representar a produtividade das famílias, também foi encontrado por Ferrão (1985), Daros (2003) e Santos (2005).

Na seleção de genótipos superiores, devido aos elevados custos associados aos recursos limitados do programa de melhoramento, foi utilizado, para todas as características, o resultado proveniente da análise conjunta, não se levando em consideração as particularidades de cada ambiente. A distinção entre os ambientes avaliados não inviabiliza a implementação de um único programa de melhoramento para as duas localidades, uma vez que, segundo Santos (2005), o que importa, para a seleção, é a expressão das médias fenotípicas das famílias em ambos os ambientes. Nesse contexto, a obtenção de ganhos por seleção é possível, sobretudo, com a utilização da potencialidade de índices de seleção.

Enquanto o menor coeficiente de variação (CV) observado foi para a característica – número de dias para o florescimento (NDF) – com valor de 2,29%, o número de espigas doentes (NED) demonstrou o maior coeficiente de variação no valor de 75,99% (Quadro 2).

Quanto menor o coeficiente de variação de uma característica, maior é a precisão experimental e, coeficientes de variação altos podem ser interpretados como pouca precisão experimental, o que prejudica as inferências que podem ser feitas em relação às características que o possuem (Marques, 2000).

Scapim et al. (1995) propuseram uma classificação dos CV para a cultura do milho para as seguintes características: altura de planta, altura de espiga, peso de 100 grãos, número de espigas, peso de espigas e peso de grãos com base em dados obtidos a partir de 66 teses na área de genética e melhoramento de plantas. De acordo com esta classificação, as variáveis supramencionadas, que foram analisadas no atual experimento, apresentaram CV médios, coincidindo com o exposto pelos autores. Nesse sentido, tais características tiveram coeficiente de variação médio no maior número de teses avaliadas, podendo-se inferir que tais características possuem boa precisão experimental e podem ser

utilizadas para a seleção de genótipos superiores (Quadro 2).

Para as demais características, NDF, NTP, EME, NED e PQA, não foi encontrado nenhum trabalho com a cultura do milho propondo uma classificação dos coeficientes de variação. Assim, comparando os valores observados no Quadro 2 com a classificação proposta por Gomes (1987), somente o CV de NDF pode ser considerado como baixo, NTP, como médio e, para as demais características, como muito altos.

4.1.2. Seleção baseada na utilização do índice clássico proposto por Smith (1936) e Hazel (1943)

Ao todo, 43 famílias, das 116 avaliadas, foram selecionadas utilizando-se o índice clássico proposto por Smith (1936) e Hazel (1943). Após diversas tentativas, os pesos econômicos que conferiram melhores resultados para o programa em questão foram: -1, -1, 5, -13, -1, 10, 400, 10 e -13, respectivamente para as características AP, AE, NTP, EME, NED, PE, PG, PCEM e PQA.

Como observado no Quadro 3, para a característica – peso de grãos (PG) – considerada a mais importante, o ganho estimado foi de 4,68%. Tal valor é baixo quando comparado com os 14,58% de ganhos estimados no ciclo 8, por Tardin et al. (2003). Tal diferença pode ser resultado das diferentes intensidades de seleção aplicadas nestes dois ciclos. Enquanto, no atual trabalho, a intensidade de seleção foi de 37,1%, a mesma foi de 23,1%, no ciclo 8. Para as demais características, NDF, AP, AE, NTP, EME, NTE, NED, PE, PCEM e PQA, conforme Quadro 3, os ganhos foram de -0,34%, 2,05%, 2,21%, 1,09%, 1,05%, 2,40%, -8,55%, 3,92%, 0,84% e -0,07%, respectivamente. Os valores negativos para ganhos estimados são de interesse para o programa de melhoramento nas características em questão.

Vale a ressalva que os valores visualizados no Quadro 3, para as características NTP, EME, NTE, NED, PE, PG E PQA, foram convertidos para a produção de 1 ha de milho, considerando-se uma lavoura implantada nas mesmas condições do atual experimento.

Quadro 3: Estimativas da média da população original (\bar{X}_o), da população selecionada (\bar{X}_s), da herdabilidade ($h^2\%$), dos ganhos por seleção com base na média (GS) e dos ganhos por seleção percentual (GS%), obtidos pela análise estatística do Índice Clássico de Seleção proposto por Smith (1936) e Hazel (1943) para 43 famílias superiores de irmãos completos de milho comum em nono ciclo de seleção recorrente recíproca

Característica ^{1/}	\bar{X}_o	\bar{X}_s	$h^2 \%$	GS	GS%
NDF	65,06	64,66	54,13	-0,22	-0,34
AP	1,97	2,04	59,23	0,04	2,05
AE	1,27	1,32	60,19	0,03	2,21
NTP	44.600,00	46.512,00	25,54	488,30	1,09
EME	4.500,00	4.593,00	50,96	47,40	1,05
NTE	63.880,00	66.977,00	49,46	1.531,80	2,40
NED	10.260,00	8.035,00	39,41	-876,86	-8,55
PE	5.640,00	6.107,00	47,34	221,06	3,92
PG	4.640,00	5.075,00	49,82	216,97	4,68
PCEM	25,27	25,74	45,48	0,21	0,84
PQA	22.320,00	22.279,00	38,88	-15,92	-0,07

^{1/} NDF = número de dias para o florescimento; AP = altura da planta; AE = altura de espiga; NTP = número total de plantas (plantas.ha⁻¹); NPQ = número de plantas quebradas (plantas.ha⁻¹); NPA = número de plantas acamadas (plantas.ha⁻¹); EME = número de espigas mal empalhadas (espigas.ha⁻¹); NTE = número total de espigas (espigas.ha⁻¹); NED = número de espigas doentes (espigas.ha⁻¹); PE = peso de espigas (Kg.ha⁻¹); PG = peso de grãos (Kg.ha⁻¹); PCEM = peso de cem grãos (g); PQA = soma das plantas quebradas e acamadas (plantas.ha⁻¹)

Santos (1991), utilizando a seleção recorrente recíproca com famílias de irmãos completos entre as variedades braquíticas de milho 'Piranão' e 'Cimmyt', estimou um ganho de seleção de 7,66% para a característica peso de grãos. Tal valor, comparado com o encontrado nesse trabalho, que utilizou populações também oriundas das populações 'Piranão' e 'Cimmyt', demonstra a eficiência da utilização do índice clássico de Smith (1936) e Hazel (1943) como instrumento eficaz na seleção simultânea de características. Além do ganho observado para tal característica, obtiveram-se ganhos satisfatórios nas demais, o que favorece a continuidade do programa de melhoramento de milho da UENF com essas populações.

4.1.3. Análise dos marcadores RAPD

Para se estudar a variabilidade genética entre os 86 progenitores pré-selecionados sem a influência do ambiente, foi utilizada a técnica RAPD. Um dos requisitos básicos do RAPD refere-se à qualidade do DNA genômico a ser utilizado como molde nas reações. Nesse aspecto, o método de extração de DNA, utilizando-se o 'kit Plant DNAzol', da 'Life Technologies', mostrou-se bastante eficiente, possibilitando a obtenção de grande quantidade e boa qualidade do DNA. Tal 'kit', também demonstrou eficiência de extração de DNA em milho doce, quando Bordallo (2001) o utilizou para a obtenção de DNA para realizar reações de RAPD, para estudo de divergência, e microssatélites, na análise de QTLs

A quantidade de DNA obtida variou de 114,25 a 238,5 ng/μl. A pureza das amostras foi estimada pela razão entre as leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. Esses valores variaram de 1,616 a 1,758, mostrando que o DNA obtido estava com elevado grau de pureza, livre de contaminações por clorofórmio e proteínas. A integridade do DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As amostras de DNA não se apresentaram degradadas nem com problemas nas reações de amplificação.

Diversos *primers* passaram por um *screening* para que se pudessem selecionar aqueles que originariam o maior número de bandas polimórficas e a melhor nitidez das mesmas. Para tanto, em oito dos 64 progenitores selecionados, quatro provenientes da população 'Cimmyt' e os outros quatro da população 'Piranão', foram testados 60 *primers* de seqüências aleatórias, dos quais 14 foram escolhidos. Estes, como se observa no Quadro 4, a seguir, geraram 86 bandas, sendo dez monomórficas e 76 polimórficas, quando utilizados no processo de amplificação dos 86 genótipos, 43 progenitores 'Cimmyt' e 43 progenitores 'Piranão'.

Quadro 04. Relação dos *Primers* utilizados e número de bandas a estes associados

Iniciadores	Número de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas	Total por iniciador
OPAA12	0	6	6
OPAA14	2	6	8
OPAA16	1	4	5
OPAA17	2	3	5
OPAE 03	0	7	7
OPAE 06	0	7	7
OPAE 07	1	4	5
OPAE 08	1	7	8
OPAE 09	0	4	4
OPAE 11	0	7	7
OPAE 15	2	3	5
OPAE 18	1	6	7
OPB08	0	7	7
OPB10	0	5	5
Total	10	76	86

4.1.3.1.- Dissimilaridade genética

Para identificar a ocorrência de divergência genética entre os 86 genótipos, foram realizadas análises estatísticas multivariadas. Para tanto, utilizaram-se as 76 bandas polimórficas e 10 monomórficas de RAPD para confecção de uma matriz de dados binários, utilizada para compor uma matriz de distâncias com base no complemento aritmético do índice de Jaccard.

Ressalva-se que os genótipos codificados com os números de 1 a 43 são pertencentes à população 'Piranão' e os demais, codificados de 44 a 86, são pertencentes à população 'Cimmyt'.

Observou-se que os genótipos mais distantes foram os de número 14 e 60, por apresentarem maior distância, ou seja, 0,5439. Por sua vez, os genótipos 4 e 24 foram os mais similares, apresentando magnitude de distância de 0,1111. Vale a ressalva de que as menores distâncias (<0,2111) coincidiram por estarem entre os genótipos pertencentes ao mesmo grupo, enquanto as maiores distâncias (>0,4439) ocorreram, em sua maioria, entre os genótipos de grupos diferentes, o que era esperado, uma vez que tais grupos constituem grupos heteróticos distintos (dentado e duro).

4.1.3.2. Análise de agrupamento

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.

No Quadro 05, a seguir, encontra-se o agrupamento obtido pelo método de Tocher. Observa-se a formação de 36 grupos, sendo o maior deles, com 16 genótipos, o grupo II e 17 grupos com um genótipo cada. Os genótipos 4 e 24, entre os quais foi observada a menor distância genética, estiveram presentes no grupo I, juntamente com outros seis genótipos. Por sua vez, os genótipos 14 e 60, os quais apresentaram a maior distância genética, encontram-se constituindo os grupos XXXIII e IV, respectivamente, evidenciando que o genótipo 14 é um dos mais divergentes do grupo.

Sabendo-se que os genótipos de 1 a 43 são pertencentes à população 'Cimmyt' e os genótipos de 44 a 86 pertencem à população 'Piranão', verifica-se,

pelo Quadro 5, que os genótipos 8,23, 58 e 82 aparecem como contaminantes, definidos aqui como genótipos pertencentes a uma população, porém agrupados com genótipos pertencentes a outra. Explicação para tal ocorrência leva a diversas hipóteses, dentre elas: a planta originária da semente autofecundada poderia já ser proveniente da outra população, ocorrendo tal fato por uma mistura de sementes das duas populações; pólen da outra população poderia ter polinizado a planta pertencente à população que deu origem à 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 uma área de interseção entre dois conjuntos.

Para os genótipos que constituíram grupos individuais, esta técnica de agrupamento não possibilitou a discriminação dos mesmos como contaminantes ou não, uma vez que os grupos formados não possuem nenhuma ligação. Assim, há necessidade de avaliação do conjunto de genótipos por outras técnicas de agrupamento. No atual trabalho, foi utilizado o agrupamento pelo método hierárquico de Ward.

Quadro 05. Agrupamento pelo método de Tocher, de 86 genótipos de milho, com base em 76 bandas polimórficas de RAPD, utilizando-se o complemento aritmético do índice de Jaccard

Grupo	Genótipo	Grupo	Genótipo
I	4, 24, 27, 28, 29, 3, 58, 37	XIX	31, 36
II	68, 77, 75, 78, 50, 51, 70, 63, 79, 80, 57, 74, 45, 48, 44, 47	XX	38
III	1, 42, 5, 33, 13	XXI	35
IV	65, 67, 60	XXII	6
V	8, 82	XXIII	39
VI	15, 32, 21	XXIV	86
VII	53, 54, 76, 62, 49	XXV	46
VIII	2, 43, 18	XXVI	22
IX	56, 64, 59	XXVII	10
X	69, 83, 23	XXVIII	52
XI	25, 26	XIX	72
XII	61, 71	XXX	11
XIII	17, 34	XXXI	7
XIV	73, 81	XXXII	66
XV	12, 20	XXXIII	14
XVI	30, 40	XXXIV	41
XVII	16, 19	XXXV	9
XVIII	55, 85	XXXVI	84

Pelo método hierárquico de Ward, apresentado na Figura 1, tomando-se por base, para a formação de grupos, mudanças abruptas no dendrograma, foi verificado a ocorrência bem nítida da formação de dois grandes grupos. Um formado pelos genótipos pertencentes à população 'Cimmyt' e o outro com os que pertencem à população 'Piranão'. Tal ocorrência demonstra a variabilidade entre as populações, o que justifica a utilização das mesmas na obtenção de um híbrido intervarietal para a exploração da heterose.

A variabilidade dentro das populações pode ser observada pela ocorrência de diversos subgrupos, dentro dos dois grandes grupos formados no dendrograma (Figura 1), indicando que as mesmas podem ser melhoradas *per se*.

De forma semelhante ao agrupamento pelo método de Tocher, o agrupamento pelo método hierárquico de Ward também demonstrou a presença de contaminantes. O genótipo 36, proveniente da população 'Cimmyt', aparece no grande grupo da população 'Piranão'; e os genótipos 46, 69, 73, 82 e 83, pertencentes a esta população, aparecem agrupados com os genótipos da população 'Cimmyt'. Por esse método, formar grupos interligados, a possibilidade de identificação dos genótipos contaminantes é facilitada. Isso, quando comparado com os resultados obtidos pelo método de Tocher o qual, no atual trabalho, formou diversos grupos com apenas um genótipo, o que dificultou tal interpretação.

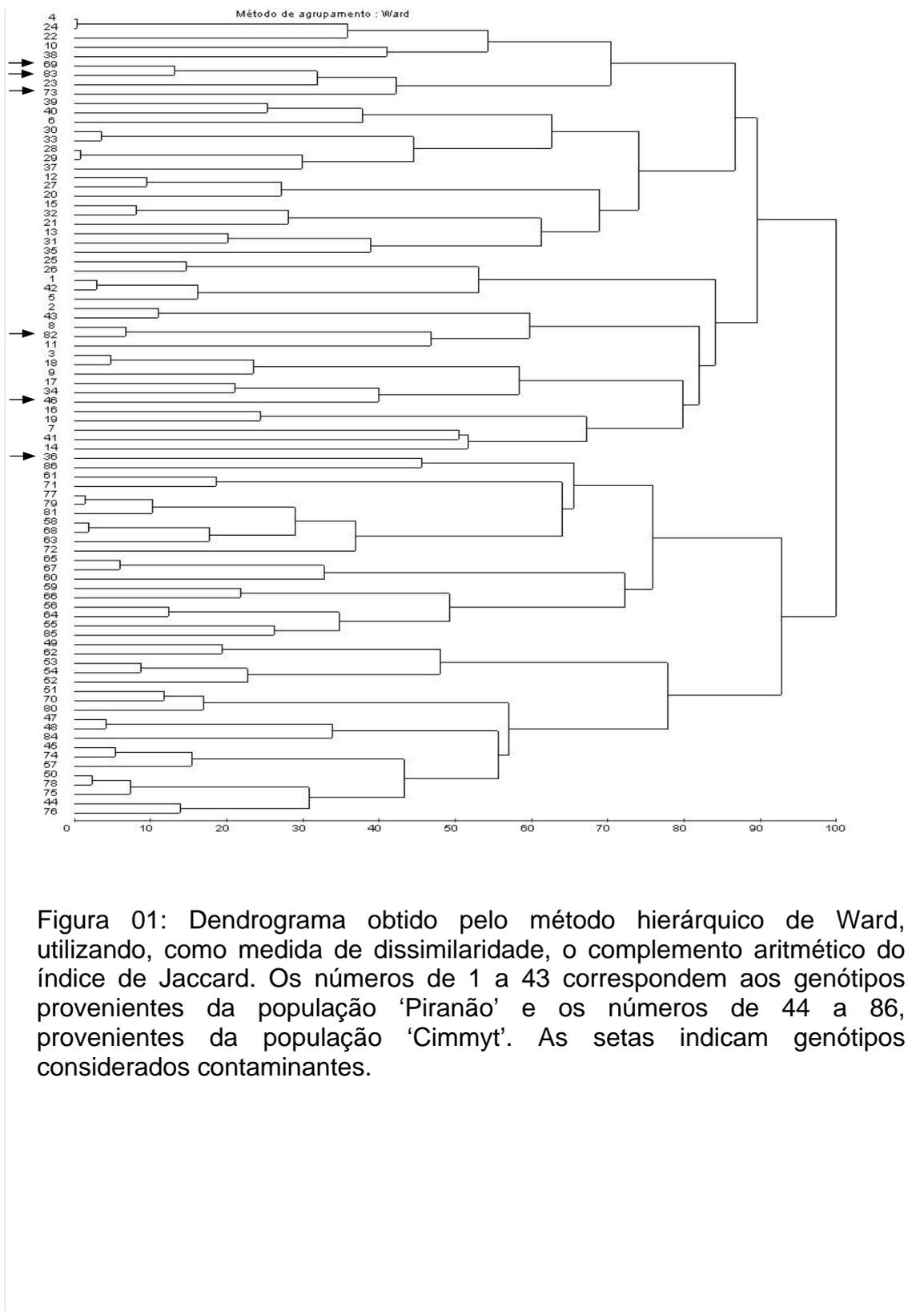


Figura 01: Dendrograma obtido pelo método hierárquico de Ward, utilizando, como medida de dissimilaridade, o complemento aritmético do índice de Jaccard. Os números de 1 a 43 correspondem aos genótipos provenientes da população 'Piranão' e os números de 44 a 86, provenientes da população 'Cimmyt'. As setas indicam genótipos considerados contaminantes.

4.1.3.3. Análise discriminante

Pela a análise discriminante, observaram-se sete classificações incorretas, com uma taxa de erro de 8,14%, em que os genótipos 3, 7, 10, 16, 23, 29 e 36, inicialmente obtidos e classificados como pertencentes à população 'Piranão', possuem, para suas distâncias genéticas médias, valores menores em relação à população 'Cimmyt' do que para sua própria população, ou seja, os mesmos devem ser classificados como pertencentes à população 'Cimmyt' e não à 'Piranão' (Quadro 6). Observa-se ainda que, para os indivíduos obtidos e classificados inicialmente como pertencentes à população 'Piranão', não ocorreu nenhuma má classificação, pois, em relação às distâncias genéticas médias referentes às duas populações em questão, todos os indivíduos tiveram os menores valores para a população em que foram classificados inicialmente.

Tal fato demonstra que pode ter ocorrido uma contaminação das espigas autofecundadas dos progenitores pertencentes à população 'Piranão' por pólen proveniente da população 'Cimmyt', ou que os progenitores já pertenciam a esta população. Entretanto, sendo qual for a explicação, tais genótipos devem ser descartados no processo de recombinação.

Quadro 6. Classificação e distância média dos genótipos em relação às populações 'Cimmyt' e 'Piranão', utilizando análise discriminante baseada no vizinho médio, tendo como medida de dissimilaridade o complemento aritmético do índice de Jaccard

Indivíduo	Origem	Classificação	Distância da População	
			'Piranão'	'Cimmyt'
1	'Piranão'	'Piranão'	0,329	0,333
2	'Piranão'	'Piranão'	0,350	0,390
3	'Piranão'	'Cimmyt'	0,296	0,295
4	'Piranão'	'Piranão'	0,284	0,329
5	'Piranão'	'Piranão'	0,336	0,358
6	'Piranão'	'Piranão'	0,344	0,398
7	'Piranão'	'Cimmyt'	0,427	0,426
8	'Piranão'	'Piranão'	0,346	0,360
9	'Piranão'	'Piranão'	0,368	0,391
10	'Piranão'	'Cimmyt'	0,394	0,374
11	'Piranão'	'Piranão'	0,411	0,414
12	'Piranão'	'Piranão'	0,326	0,382
13	'Piranão'	'Piranão'	0,369	0,401
14	'Piranão'	'Piranão'	0,391	0,420
15	'Piranão'	'Piranão'	0,343	0,392
16	'Piranão'	'Cimmyt'	0,392	0,387
17	'Piranão'	'Piranão'	0,343	0,369
18	'Piranão'	'Piranão'	0,342	0,353
19	'Piranão'	'Piranão'	0,386	0,413
20	'Piranão'	'Piranão'	0,387	0,441
21	'Piranão'	'Piranão'	0,344	0,399
22	'Piranão'	'Piranão'	0,368	0,381
23	'Piranão'	'Cimmyt'	0,357	0,349
24	'Piranão'	'Piranão'	0,365	0,388
25	'Piranão'	'Piranão'	0,351	0,407
26	'Piranão'	'Piranão'	0,356	0,391
27	'Piranão'	'Piranão'	0,301	0,349
28	'Piranão'	'Piranão'	0,285	0,328
29	'Piranão'	'Cimmyt'	0,301	0,299

Quadro 6, Cont.

Indivíduo	Origem	Classificação	Distância da População	
			'Piranão'	'Cimmyt'
30	'Piranão'	'Piranão'	0,385	0,432
31	'Piranão'	'Piranão'	0,358	0,388
32	'Piranão'	'Piranão'	0,340	0,400
33	'Piranão'	'Piranão'	0,325	0,346
34	'Piranão'	'Piranão'	0,346	0,404
35	'Piranão'	'Piranão'	0,365	0,410
36	'Piranão'	'Cimmyt'	0,371	0,359
37	'Piranão'	'Piranão'	0,323	0,357
38	'Piranão'	'Piranão'	0,348	0,370
39	'Piranão'	'Piranão'	0,352	0,394
40	'Piranão'	'Piranão'	0,364	0,398
41	'Piranão'	'Piranão'	0,403	0,433
42	'Piranão'	'Piranão'	0,331	0,343
43	'Piranão'	'Piranão'	0,370	0,391
44	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,385	0,301
45	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,379	0,295
46	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,389	0,371
47	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,403	0,322
48	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,373	0,301
49	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,353	0,335
50	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,355	0,254
51	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,348	0,287
52	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,348	0,342
53	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,375	0,310
54	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,339	0,291
55	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,405	0,333
56	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,372	0,321

Quadro 6, Cont.

Indivíduo	Origem	Classificação	Distância da População	
			'Piranão'	'Cimmyt'
57	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,398	0,293
58	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,321	0,251
59	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,389	0,319
60	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,428	0,357
61	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,379	0,329
62	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,412	0,329
63	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,370	0,292
64	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,353	0,310
65	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,391	0,297
66	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,419	0,338
67	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,409	0,327
68	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,365	0,287
69	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,363	0,331
70	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,390	0,300
71	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,384	0,323
72	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,407	0,321
73	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,390	0,341
74	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,390	0,305
75	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,371	0,279
76	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,372	0,310
77	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,363	0,259
78	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,356	0,266
79	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,364	0,292
80	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,387	0,310
81	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,389	0,323
82	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,343	0,298
83	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,379	0,303
84	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,445	0,348
85	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,372	0,312
86	'Cimmyt'	'Cimmyt'	0,419	0,372

Os resultados obtidos pelas técnicas de agrupamento demonstram a existência de variabilidade suficiente para a continuidade do programa de seleção recorrente. Associando estas técnicas à análise discriminante, a análise molecular dos genótipos, via RAPD, mostra-se uma ferramenta útil e importante para a identificação de contaminantes, que devem ser eliminados antes da recombinação, para que seja garantida a distância genética entre as populações. Isso porque se trata de um fator de importância para explorar a heterose interpopulacional e até mesmo para preservar as características de cada população trabalhada.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de dar continuidade ao programa de melhoramento de milho da UENF, envolvendo as populações 'Cimmyt' e 'Piranão', realizou-se mais um ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos, de acordo com o descrito por Hallauer e Miranda Filho (1987) com a população que já se encontra no 8º ciclo de seleção, porém com uma etapa adicional envolvendo marcadores de DNA do tipo RAPD.

Por meio do cruzamento de plantas das duas populações, foram obtidos 116 híbridos, cujos progenitores ainda tiveram uma de suas espigas autofecundadas e armazenadas. Das provenientes dos melhores progenitores, num total de 43, foi extraído DNA a ser utilizado na etapa de análise molecular via técnica RAPD. As informações geradas foram suficientes para descartar os genótipos que pudessem comprometer o programa, antes da etapa de recombinação, utilizando-se 25 progenitores remanescentes de cada população, para dar origem às populações 'Cimmyt' e 'Piranão', no ciclo 9.

A seleção das 43 famílias superiores foi realizada utilizando-se o índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943). Uma análise molecular, via RAPD, foi realizada com o DNA obtido de folhas de plantas originadas de parte das sementes autofecundadas dos progenitores destas famílias. Foi confeccionada uma matriz de dados binários com o resultado da análise eletroforética do produto de amplificação do DNA genômico dos 86 genótipos avaliados, atribuindo-se os valores 0 e 1, respectivamente, à ausência ou à presença de determinada banda. Essa matriz foi utilizada para obtenção das distâncias entre os genótipos, pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizado para agrupar os genótipos pelo método de otimização de Tocher e hierárquico de Ward, bem como, para a

realização da análise discriminante para classificação de qual população um determinado genótipo é mais próximo.

Tais análises, além de verificarem a existência de variabilidade entre e dentro das populações para a continuidade do programa de melhoramento, tiveram como objetivo, antes do processo de recombinação, identificar e eliminar genótipos considerados contaminantes, visando, com isso, à manutenção das características de cada população e à ampliação ou, pelo menos, à manutenção da distância entre as populações.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- 1) As populações 'Cimmyt' e 'Piranão' possuem variabilidade intra e interpopulacional suficiente para a manutenção de programas de melhoramento;
- 2) O índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943) é eficiente na seleção de famílias superiores, garantindo ganhos de seleção em diversas características de interesse;
- 3) A utilização da etapa de análise molecular é de grande importância na tomada de decisão de quais genótipos devem ser recombinados;
- 4) A técnica de RAPD constitui uma ferramenta útil e importante para a identificação de contaminantes que devem ser eliminados da recombinação, para que seja garantida a distância genética entre as populações, um fator de importância na exploração da heterose interpopulacional e até mesmo na preservação das características da população original.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual* (2002) São Paulo: FNP consultoria e comércio LTDA, p. 417-437.
- Allard, R. W. (1971) *Princípio do melhoramento genético das plantas*. São Paulo, Edgard Blücher. 381p.
- Amaral Júnior, A.T., Thiébaud J.T.L. (1999) *Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais*. Campos dos Goytacazes: CCTA – UENF, 55p.
- Anderberg, M.R. (1973) *Clustering analysis for applications*. London: Academic Press, 359p.
- Anderson, J.C., Chow, P.N. (1963) Phenotypes and grain yield associated with brachytic-2 gene in single-cross hybrids of dent corn. *Crop Science*, 3:111-113.
- Asensio, L.J. (1989) *Técnicas de análisis de datos multidimensionales: bases teóricas y aplicaciones en agricultura*. Madrid: Neografis, 301p.
- Bordallo, P.N. (2001) *Marcadores de DNA e análise em milho doce (Zea mays L.): diversidade genética e herança de caracteres morfoagronômicos e bioquímico*. Campos: UENF, 83 p. Tese (Doutorado).
- Borém, A. (1997) *Melhoramento de plantas*. Viçosa. Editora UFV. 547 p.
- Bull, L. T. *Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: POTAFOS, 1993, 301 p.

- Bussab, W.O., Miazaki, E.S., Andrade, D.F. (1990) *Introdução a análise de agrupamentos*. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística. 105p.
- Campbell, C.M.(1965) New dwarf and modifiers.). In: An. Hy. Corn Ind. Conf., 20, Washington, *Proceedings ...* Washington: ASTA. P.80-86.
- Carvalho, L.P. (1993) *Divergência genética e análise dialélica em *Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch.* Viçosa: UFV, 203p. Tese (mestrado).
- Castiglioni, V.B.R. (1986) Efeito da introdução do gene braquítico-2 (br_2) sobre características agrônômicas de sete variedades de milho (*Zea mays* L.) Viçosa: UFV. 116 p.
- Chatfield, C., Collins, A.J. (1980) *Introduction to multivariate analysis*. New York: Chapman e Hall, 246p.
- Clifford, H.T., Stephenson, W. (1975) *A introduction a numerical taxonomy*. London: Academic Press, 229p.
- 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.
- Craig, W.F. (1977) Production of hybrid corn seed. In: Sprague, G.F. (Ed.). *Corn and corn improvement*. Madison: American Society of Agronomy. p.671-679.
- Cruz, C.D. (2001) *Programa GENES: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 648p.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.2 Viçosa: UFV, 585p.
- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J. (1997) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: UFV, 390p.
- 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.
- Cunninghan, C.P. (1969) *Animal breeding theory*. Oslo:[s.n.], 272p.
- Dantas, A.C.M., Fortes, G.R.L., Silva, J.B., Nezi, A.N., Rodrigues, A.C. (2001) Tolerance to aluminium in apple rootstocks somaclones in

nutrient solution. *Pesq. agropec. bras.*, Apr. vol.36, no.4, p.615-623. ISSN 0100-204X.

- Daros, M. (2003) Melhoramento de milho pipoca: seleção recorrente em famílias de irmãos completos e progênies S_1 . RJ: UENF, 92p. Tese (doutorado).
- Darrah, L.L., Eberhart, S.A., Penny, L.H. (1972) A maize breeding methods study in Kenya. *Crop Sci.* 12:605-608.
- Dias, D. (2005) Milho. In: *Agrianual* São Paulo: FNP consultoria e comércio LTDA, p. 409-410.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n. 27, p.13-15.
- Duarte, M.C., Santos, J.B., Melo, L.C. (1999) Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology* 22:427-432.
- Dunn, G., Everitt, B.S. (1980) *An introduction to mathematical taxonomy*. New York: Cambridge University Press, 152p.
- 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.
- Elston, R.C. (1963) A weight-free index for the purpose of ranking or selection with respect to several traits at a time. *Biometrics*. Alexandria, v.19, n.1, p.85-97.
- Emygdio, B.M., Antunes, I.F., Nedel, J.L., Choer, E. (2003) Genetic diversity in cultivars and landraces of common bean based on RAPD markers analysis. *Pesq. agropec. bras.*, Oct. vol.38, no.10, p.1165-1171. ISSN 0100-204X.
- Eyherabide, G.H.; Hallauer, A.R. (1991) Reciprocal full-sib recurrent selection in maize: direct and indirect responses. *Crop Science*. 31:952-959.
- Fancelli, 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: Imprensa Universitária, 279p.

- Fehr, W.R. (1987) Principles of cultivar development. Theory and technique. Volume I. Macmillan Publishing Company. New York. 536p.
- Ferrão, M.A.G. (1985) *Avaliação de compostos de milho (Zea mays L.) "dentado" resultantes da seleção recorrente recíproca baseada em famílias de irmãos completos entre os compostos "dentado" e "duro"*. Viçosa, MG: UFV, 85p. Tese (mestrado).
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- Frisch, M., Bohn, M., Melchinger, A.E. (1999) Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a genes. *Crop Science*, 39 (5): 1295-1301.
- Frisch, M., Melchinger, A.E. (2001) Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. *Crop Science*, 41 (6): 1716-1725.
- 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).
- Galinat, W.C. (1973) Intergenomic mapping of maize, teosinte, and tripsacum. *Evolution*, 27, 644-655.
- Galinat, W.C. (1977) The origin of corn. In: Sprague, G.F. (ed.) *Corn and corn improvement*. Madison: American Society of Agronomy. 1.
- Galston, A.W., Davies, P.J. (1972) *Mecanismo de controle no desenvolvimento*. São Paulo, Edgard Blucher. 171 p.
- Genter, C.F. (1973) Comparison of S₁b and testcross evaluation after two cycles of recurrent selection in maize. *Crop Sci.* 13: 524-527.
- Gevers, H.O. (1974) Reciprocal recurrent selection in maize under two systems of parent selection. *Proc. Of fifth Genet. Congr.* Repub. South Africa.
- Gomes, F.P. (1987) *Curso de estatística experimental*. 12 ed. São Paulo: Nobel, 467p.

- Gomes, F.P., Garcia, C.H. (2002) *Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos*. v.11. Piracicaba: FEALQ, 309p.
- Goodman, M.M. (1986). Maize. In: Simmonds, N. W. (Ed.) *Evolution of crop plants*. Scotland: LST. p. 128-136.
- Goodman, M.M., Smith, J.S.C. (1987) Botânica. In: Paterniani, E., Viegas, G.P. (eds.) *Melhoramento e produção de milho*. Campinas: Fundação Cargill, p.41-78.
- Gower, J.C., Legendre, P. (1986) Metric and Euclidean properties of dissimilarity coefficients. *Journal of classification*, v.3, p.5-48.
- Granate, M.J., Cruz, C.D., Cecon, P.R., Pacheco, C.A.P. (2001) A análise de fatores na predição de ganhos por seleção em milho (*Zea mays* L.) *Acta Scientiarum*. Maringá, v. 23, n. 5, p. 1271-1279
- 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. agropec. bras.* v.37, no.7, Brasília.
- Hallauer, A.R. (1977) Four cycles of reciprocal full-sib selection. North cent. Corn Breed. Res. Comm. (NCR-2) Rep. Mimeogr. Library, Iowa State Univ., Ames, p.11-13.
- Hallauer, A.R. (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 3:01-33.
- Hallauer, A.R., Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Sci.* 10:315-16.
- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. (1987) Quantitative genetics in maize breeding. 2 ed. Ames. Iowa State University Press. 468 p.
- Hanson e Johnson (1957)
- Hazel, L.N. (1943) The genetic basis for construction selection indexes. *Genetics*, Austin, v.28, p.476-490.
- Hull, F.H. (1945) Recurrent selection for specific combining ability in corn. *Jour. Amer. Soc. Agron.*, 37: 134-145.
- Hutchcroft, C.D. (1959) Contamination in seed fields of corn resulting from incomplete detasseling. *Agronomy Journal*, Madison, v.51, p.267-271.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2003) *Produção agrícola municipal*. Rio de Janeiro, v.30, 93p.

- Jackson, A.A., Somers, K.M., Harvey, H.H. (1989) Similarity coefficients measures for co-occurrence and association or simple measures of occurrence? *American Naturalist*. V.133,p.436-453.
- Johnson, R.A. Wichern, D.W. (1992) *Applied multivariate statistical analysis*. 3 ed. New Jersey: Prantice Hall, 642p.
- Kempton, J.H. (1920) Heritable characteres in maize. *The Journal of Heredity*, 11:111-115.
- Kemphorne, O., Nordskog, A.W. (1959) Restricted selection indices. *Biometrics*, v.15, p.1-19.
- Labate, J.A., Lamkey, K.R., Lee, M., Woodman, W.L. (1997) Molecular genetic diversity after reciprocal recurrent selection in BSSS and BSCB1 maize populations. *Crop Science*, 37 (2): 416-423.
- Lambert, R.J. (1963) Location of brachytic-2 dwarf. *Maize Genet. Coop. News Lett.*, 37:41-42p.
- Leite D.R., Paterniani, E. (1973) Comportamento do Milho (*Zea mays* L.) braquítico-2 em diferentes densidades de plantio. *Relat. Ci. Dep. Genet. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz*, 7:74-82.
- Leng, E.L. (1957) Genetic production of short stalked hybrids. In: An. Hy. Corn Ind. Res. Conf. Washington, proceedings ... Washington: ASTA. P.80-86.
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M., Gomide, R.L. (1996) Fisiologia da cultura do milho. In: Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária. *Manual técnico para a cultura do milho no estado do Espírito Santo*. Vitória: EMCAPA, p.15-33.
- Mangesldorf, P.C. (1974) *Corn its origin, evolution and improvement*. Cambridge, Mass, USA.
- Manly, B.F.J. (1994) *Multivariate statistical method*. 2. ed. London: A primer 215 p.
- Mardia, K.V., Kent, J.T., Bibby, J.M. (1979) *Multivariate analysis*. London: Academic Press, 520p.
- Marques, M.J.B.S.G.S.M.(2000) Número mínimo de famílias de meios-irmãos de milho pipoca, critérios de seleção e predição de ganhos por seleção. Viçosa: UFV, 236p. Tese (Doutorado).

- Martins, E.R. (2000) *Conservação da Poaia (Psychotrya ipecacuanha): coleta, ecogeografia, variabilidade genética e caracterização reprodutiva*. Campos dos Goytacazes, RJ:UENF, 109p. Tese (Doutorado).
- Martins, I.S., Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Pires, I.E. (2003) Eficiência da seleção univariada direta e indireta e de índices de seleção em *Eucalyptus grandis*. *Rev. Árvore*, vol.27, no.3. Viçosa:UFV.
- Meyer, A.S., Garcia, A.A.F., Souza, A.P. ; Souza Júnior, C.L. (2004) Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 83-91.
- Milach, S. (1998) *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 141 p.
- Moll, R.H., Lonquist, J.H., Vélez Fortuno, J., Jonhson, E.C. (1965) The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics* 52: 139-144.
- Morrison, D.F. (1976) *Multivariate statistical metholds*. New York: MacGraw Hill Book Company, 415p.
- Mulamba, N.N.; Mock, J.J. (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, v.7, p.40-57.
- Nass, L.L., Paterniani, E. (2000) Perspectivas do pr'e-melhoramento do milho. In: Udry, C.V., Duarte, W. (Org.). *Uma história brasileira do milho – o valor dos recursos genéticos*. Brasília: Paralelo 15,. P.43-63.
- Paterniani,E. (1973) Origem e comportamento do milho piranão. *Relatório científico*. Instituto de Genética. Piracicaba: ESALQ, v.7, p.148-161.
- Paterniani, E. Diversidade genética em plantas (1987) In: *Encontro sobre recursos genéticos*, Anais...1. Jaboticabal: UNESP/FCAVJ, p.75-77.
- Paterniani, E., Campos, M.S. (1999) Melhoramento do milho. In: Borém, A. (Editor). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV. p. 429-485.
- Paterniani, E., Miranda Filho, J.B. (1987) Melhoramento de populações. In: Paterniani, E., Viegas, G. P. (eds.) *Melhoramento e produção do milho*, 2 ed. Campinas: Fundação Cargill. P. 215-274.

- Paterniani, E. e Vencovsky, R. (1977) Reciprocal recurrent selection in maize (*Zea mayz* L.) based on the testcross of half-sib families. *Maydica* 22: 141-152.
- Penny, L.H. (1959) Improving combining ability by recurrent selection. *Proc. Annu. Hybrid Corn Ind. Res. Conf.* 14:7-11.
- Penny, L.H., Russel, W.A., Sprague, G.F. (1962) Types of gene action in yield heterosis in maize. *Crop Sci.* 2: 341-344.
- 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)
- Pesek, J., Baker, R.J. (1969) Desired improvement in relation to selected indices. *Can. J. Plant Sci.*, Ottawa, v. 49, n. 6, p.803-804.
- Pinto, R. J. B. (1995) *Introdução ao melhoramento genético de plantas*. Maringá: EDUEM. 275 p.
- Popi, J., Rajnpreht, J., Kannenberg, L.W., Pauls, K.P. (2000) Random amplified polymorphic DNA-based evaluation of diversity in the hierarchical, open-ended population enrichment maize breeding system. *Crop Science*, 40 (3): 619-625.
- Rao, C.R. (1952) *Advanced statistical methods in biometric research*. New York: John Wiley & Sons, 389 p.
- Ronzelli Júnior, P. (1996) *Melhoramento genético de plantas*. Curitiba: P.R.J. 219 p.
- Rumin, G.C.R., Vencovsky, R. (2001) RFLP marker index for selection of inbred lines aimed at synthetic maize populations. *Sci. agric.*, vol.58, no.2, p.303-311. ISSN 0103-9016.
- Russel, W.A., Eberhart, S.A., Vega, U.A. (1973) Recurrent Selection for specific combining ability for yield in two maize populations. *Crop Sci.* 13: 257-261.
- 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. (2005) *Seleção recorrente entre famílias de meios-irmãos da população unb-2u de milho pipoca (Zea mays L.)*. Campos dos Goytacazes, RJ: UENF, 97p. Tese (doutorado).
- 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 In: 2o. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2003, Porto Seguro. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Londrina - PR: Brazilian Society of Plant Breeding, 2003. v.2. p.9 – 12
- Scapim, C.A., Carvalho, C.G.P., Cruz, C.D. (1995) Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.30, n.5, p.683-686.
- Smith, H.F. A discriminant function for plant selection. *Ann. Eugen.*, v.7, p.240-250, 1936.
- Smith, J.S.C.; Wyck, R.D. (1984) The identification of female selfs in hybrid maize: a comparison using electrophoresis and morphology. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.14, p.1-4.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1973) *Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W.H. Freeman, 573p.
- Sokolov, B.P., Domasnev, P.P. (1968) Brachyct forms in breeding hybrid maize. *Proceeding All-Union Lenin Academy Agriculture Science*, Russia, n.5, p.2-7.
- Souza Júnior, C.L. (1983) *Variabilidade genética em milho (Zea Mays L.) e relações com a seleção recorrente intra e interpopulacional*. Piracicaba: ESALQ, 151 p. Tese (Doutorado).
- Stuber, C.W.; Wendel, J.F.; Goodman, M.M.; Smith, J.S.C. (1988) *Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize*. Raleigh: North Carolina State University. 87p. (Technical Bulletin, 286).
- Subandi, W., Compton, A., Empig, L.T. (1973) Comparison of the efficiencies of selection indices for three traits in two variety crosses of corn. *Crop Sci.*, Madison, v.13, p.184-186.

- Tai, G.C.C. (1977) Index selection with desired gains. *Crop Sci.*, v. 17, p.182-183.
- Tardin, F.D. (2001) *Diversidade morfoagronômica e molecular em acessos de alface (Lactuca sativa L.)*. Campos: UENF, 61p.
- Tardin F. D., Pereira M.G.; Santos, F.S.; Amaral Júnior, A.T., Daros, M. Gabriel, A.P.C. e Daher, R.F.(2003) Utilização de índices clássicos de seleção aplicados em programa de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays L.*). In: 2o. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2003, Porto Seguro. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Londrina - PR: Brazilian Society of Plant Breeding. p.2 – 3.
- Totti, R. (1998) Utilização de métodos de agrupamentos hierárquicos em acessos de *paspalum*(Graminae (Poaceae)). Piracicaba: ESALQ, 75p. Dissertação (mestrado).
- Tregubenko, M.J., Nepomnjascij, V.I. (1969) The water consumption of brachytic maize hybrids in relation to their yield. *Bulletin all-union Science-Research Maize Institute*, Russia, n.6, p. 20-26.
- Von Pinho, E.V.R. (1995) *Conseqüências da autofecundação indesejável na produção de sementes híbridas de milho*. Piracicaba: USP-ESALQ. 130p. Tese (Doutorado).
- Walejko, R.N., Russel, W.A. (1977) Evaluation of recurrent selection for specific combining ability in two open pollinated maize cultivars. *Crop Sci.* 17: 647-651.
- (Weatherwax, P. (1942) The Indian as a corn breeder. *Proc. Indiana Acad. Sci.*, 51:13-21.
- Weatherwax, P. (1954) *Indian corn in old America*. New York, USA: The MacMillan Co. 253p.
- Wellhausen, E.J., Roberts, L.M., Hernandez, X.E. (1952) In: Mangelsdorf, P.C. *Races of maize in Mexico*. Cambridge: The Bussey Institute, Harvard University.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* 18:7213-7218.
- Willians, J.S. (1962) The evaluation of a selection index. *Biometrics*, v.18, p.375-393.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, L.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Zanette, V.A., Paterniani, E. (1992) Efeito do gene braquítico-2. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 27(8): 1173-1181.