

**CAPACIDADE COMBINATÓRIA EM LINHAGENS DE MILHO
ESTIMADA POR TESTADORES E MONITORADA POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

PEDRO HENRIQUE ARAÚJO DINIZ SANTOS

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2012**

**CAPACIDADE COMBINATÓRIA EM LINHAGENS DE MILHO
ESTIMADA POR TESTADORES E MONITORADA POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

PEDRO HENRIQUE ARAÚJO DINIZ SANTOS

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

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2012

CAPACIDADE COMBINATÓRIA EM LINHAGENS DE MILHO
ESTIMADA POR TESTADORES E MONITORADA POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES

PEDRO HENRIQUE ARAÚJO DINIZ SANTOS

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

Aprovada em 16 de março de 2012.

Comissão Examinadora:

Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., Plant Breeding) - UENF

Antônio Teixeira do Amaral Júnior (D. Sc., Genética e Melhoramento de Plantas)
UENF

João Cândido de Souza (D. Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UFLA

Messias Gonzaga Pereira (Ph. D., Plant Breeding) - UENF
(Orientador)

Aos meus pais José Roberto Santos e Marli Alzira Diniz Santos, pelo incansável apoio e amor incondicional; às minhas irmãs Carolina e Flaviana e à minha futura esposa Aline,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que esse sonho se realizasse.

Aos meus familiares, em especial ao meu pai José Roberto e à minha mãe Marli, por sempre acreditarem no meu sucesso e torcerem por mim.

Às minhas irmãs Carolina e Flaviana, que mesmo a distância me incentivaram em cada decisão tomada em minha vida.

À minha futura esposa Aline, por sempre me apoiar e pelo amor despendido em todos os momentos que passamos juntos e que ainda vamos passar, e também por fazer com que a partir de agora eu não pense mais em nós dois, mas em nós três.

À UENF/Faperj, pelo suporte financeiro e pela infraestrutura para a realização desse trabalho.

Ao meu primo/irmão Ricardo Augusto, pelo apoio nos momentos em que eu mais precisei.

Ao meu orientador Messias Gonzaga Pereira, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos e auxílio na condução deste trabalho.

Aos professores Antônio Teixeira do Amaral Júnior, Telma Nair Santana e João Cândido de Souza, pelas valiosas contribuições.

Aos amigos do LMGV, pela agradável convivência durante o período do mestrado, em especial ao Robertão, Keilinha, Helaine, Geovana, Júlio, Líliam, Leandro, Cássio, Ismael, Pablo, Thiago, Caillet, Jâneo, Artur e a todos os outros.

À técnica do laboratório Vitória, pelo auxílio nas tarefas de laboratório e pela tranquilidade.

Ao grande amigo Geraldo, muito obrigado pela dedicação e ensinamentos de prática de campo.

Ao funcionário da Secretaria de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas Daniel, pela amizade e pela prestatividade.

Aos amigos que fiz em Campos, em especial ao Leãozinho, Guilhermão, Papiiiiito, Higino e Gustavão, por estarem sempre do meu lado nos momentos em que precisei.

Aos amigos de Sete Lagoas Bezola, Ameba, Dezinho, Nicolau, Netinho, Webinho, e Zezinho, pelos bons momentos vividos e acima de tudo pela amizade verdadeira.

E a todos os que de certa forma contribuíram para que esse trabalho se realizasse com sucesso, o meu MUITO OBRIGADO!!!!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. ORIGEM E BOTÂNICA.....	03
2.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	04
2.3. A SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA NA CULTURA DO MILHO.....	04
2.4. O USO DE TESTADORES NO MELHORAMENTO DO MILHO....	05
2.5. O DELINEAMENTO TOPCROSS NA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE COMBINATÓRIA EM MILHO.....	07
2.6. UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA ESTIMAR A DIVERSIDADE GENÉTICA.....	09
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1. OBTENÇÃO DOS HÍBRIDOS TOPCROSSES.....	12
3.2. AVALIAÇÃO DOS HÍBRIDOS TOPCROSSES.....	14
3.3. CARACTERÍSTICAS AVALIADAS.....	16
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA E ESTIMAÇÃO DA CAPACIDADE COMBINATÓRIA.....	17
3.5. ANÁLISES MOLECULARES.....	19
3.5.1. SELEÇÃO DOS PRIMERS.....	19

3.5.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AVALIAÇÃO.....	19
3.5.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	20
3.5.4. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	20
3.5.5. ELETROFORESE.....	23
3.5.6. ANÁLISE DOS DADOS MOLECULARES.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. DADOS MORFOAGRONÔMICOS.....	26
4.1.1. ANÁLISES DE VARIÂNCIA.....	26
4.1.2. PARÂMETROS GENÉTICOS.....	30
4.1.3. CONTRASTES ORTOGONAIS.....	31
4.1.4. TESTE DE AGRUPAMENTO DE MÉDIAS.....	37
4.1.5. CAPACIDADE COMBINATÓRIA.....	39
4.1.6. CORRELAÇÃO ENTRE DESEMPENHO DE LINHAGENS PER SE VERSUS HÍBRIDOS TOPCROSSES.....	42
4.2. DADOS MOLECULARES.....	44
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

SANTOS, Pedro Henrique Araújo Diniz, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2012. Capacidade combinatória em milho estimada por testadores e monitorada por marcadores microssatélites. Orientador: Messias Gonzaga Pereira.

O presente trabalho teve por objetivo identificar e selecionar linhagens que possuam boa capacidade específica de combinação (CEC) e boa capacidade geral de combinação (CGC), além de medir a divergência genética entre linhagens de diferentes grupos heteróticos, utilizando marcadores microssatélites. Cada grupo de linhagens (“Flint” e “Dent”) foi cruzado com dois testadores: um de base ampla, que permite inferir sobre a capacidade geral de combinação (CGC), e um de base estreita, que permite inferir sobre a capacidade específica de combinação (CEC). Os testadores utilizados para as linhagens do grupo “Dent” são a linhagem L 159 br e uma variedade, ambos pertencentes ao grupo “Flint”, que testam para CEC e CGG, respectivamente. Para as linhagens do grupo “Flint”, os testadores utilizados são a linhagem L6 e uma variedade, ambas pertencentes ao grupo “Dent”, que também testam para CEC e CGG, respectivamente. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições, com 46 tratamentos, sendo 44 híbridos Topcrosses e duas testemunhas comerciais (BR106 e UENF 508-8). Cada parcela foi constituída por uma linha de cinco metros de comprimento, com

espaçamento entre linhas de 0,9 metros e cinco sementes por metro linear, totalizando 25 plantas por parcela. Foram avaliadas 12 características de interesse agrônomo nos híbridos obtidos via Topcross, incluindo, entre elas, Rendimento de grãos (REND), Peso de espiga despalhada (PED), Número de plantas por parcela (NP) e Número de espigas por parcela (NE), entre outras. Para análise molecular, foram utilizados 34 primers SSR-ESTs com base no seu grau de polimorfismo e na qualidade de amplificação. Para análise dos dados morfoagronômicos, a fonte de variação genótipos foi desdobrada a fim de separar os grupos de híbridos de acordo com cada testador de cada grupo heterótico (híbridos Topcrosses do grupo “Flint” e híbridos Topcrosses do grupo “Dent”, ambos testando para base ampla e estreita, e a interação entre eles) e verificar a diferença significativa entre os grupos. Além disso, foi testada a capacidade específica e geral de combinação para cada grupo de testador utilizado. Para a análise molecular, inicialmente foram feitas uma análise molecular de variância (AMOVA), coordenadas principais (PCA), e uma análise de agrupamento via UPGMA a fim de verificar a variabilidade dos genótipos entre e dentro dos grupos heteróticos. Posteriormente, foi estimada a Heterozigosidade Esperada (H_E) e observada (H_O) para o grupo de genótipos em questão além do Índice de Shannon (I), Nível de homozigose, coeficiente de endogamia (F) e estrutura genética das linhagens.

Com base nos dados obtidos, observou-se separação das linhagens de acordo com os seus respectivos grupos heteróticos. A AMOVA apontou a existência de variabilidade genética dentro dos grupos confirmando os dados obtidos na análise morfoagronômica (ANOVA).

ABSTRACT

Santos, Pedro Henrique Araujo Diniz, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March 2012. Combining ability in maize estimated by testers and monitored by microsatellite markers. Advisor: Messias Gonzaga Pereira.

This study aimed to identify and select strains that have good specific combining ability (SCA) and good general combining ability (GCA), besides measuring the genetic divergence among lines from different heterotic groups using microsatellite markers. Each group of lines ("Flint" and "Dent") was crossed with two testers, a broad-based that allows to infer about the general combining ability (GCA) and a narrow base that allows to infer about the specific combining ability (SCA). The testers used for the lines of the group "Dent" is the lineage L 159br and a variety, both belonging to the group "Flint" and testing SCA and GCA, respectively. In regard to the lines of the group "Flint", the testers used were lineage L6 and a variety, both belonging to the group "Dent", which also test SCA and GCA, respectively. The experimental design used was randomized blocks with three replicates and 46 treatments, from which 44 were topcrosses hybrids and two were commercial controls (BR106 and UENF 508-8). Each plot consisted of a five meters long row, setting a spacing of 0.9 meters between rows and five seeds per meter, totaling 25 plants per plot. 12 characteristics of agronomic interest were evaluated in hybrids obtained by

Topcross, including grain yield (GY), dehusked ear weight (DEW), number of plants per plot (NP), number of ears per plot (NE) and others. In the molecular analysis, 34 primers EST-SSR's were used based on their degree of polymorphism and quality of amplification. To analyze the morphological data, the source of variation "genotypes" was split off in order to separate groups of hybrids according to each tester from each heterotic group (topcrosses hybrids from group "Flint" and hybrid topcrosses from group "Dent", both testing broad and narrow base, and the interaction between them) and verify the difference between groups. Furthermore, the general and specific combining ability for each group of tester used was tested. Concerning to molecular analysis, it was initially done The Analysis of Molecular Variance (AMOVA), Principal Coordinates Analysis (PCA) and cluster analysis via UPGMA to verify the variability of genotypes within and between heterotic groups. Later, it was estimated Expected Heterozygosity (H_E) and Observed Heterozygosity (H_O) for the concerned group of genotypes, and moreover, the Shannon index (I), level of homozygosity, inbreeding coefficient (F) and the genetic structure of the lineages. Based on the obtained data, it was observed the separation of the lines according to their respective heterotic groups. The AMOVA indicated the existence of genetic variability within groups corroborating the obtained data in the morphoagronomic analysis (ANOVA).

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho ocupa lugar de destaque, não só pelo grande progresso que tem proporcionado no acúmulo de conhecimento técnico – científico, mas também pelo seu inestimável valor econômico e alimentar.

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil, sendo um insumo para a produtividade de uma centena de produtos. Porém, na cadeia produtiva de suínos e aves é que se consome aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (CONAB, 2008).

A descoberta da heterose e a introdução de híbridos foram sem dúvida as principais causas do aumento da produtividade como também incentivadoras do desenvolvimento de várias outras tecnologias implementadas na cultura do milho e em diversas outras culturas de importância econômica (Vencovsky & Ramalho, 2000).

Os avanços alcançados com o melhoramento da cultura têm permitido obter produtividades bastante elevadas. Contudo, no Brasil, o milho vem sendo cultivado em várias regiões, desde aquelas consideradas aptas e até mesmo em regiões consideradas marginais para o seu cultivo, sendo esta cultura submetida a diferentes níveis de tecnologias, conforme os recursos econômicos disponíveis ao produtor. Essas diferentes condições ambientais e de manejo têm como consequência uma reduzida produtividade média nacional, prevista em $4,39 \text{ t.ha}^{-1}$ para 2012 (CONAB,

2012). Esta baixa produtividade é devida ao alto número de pequenos produtores que são menos tecnificados, utilizando sementes de menor potencial produtivo (EMBRAPA, 2002; RAPOSO, 2002).

Diante do exposto, pode-se dizer que esta baixa produtividade não é devida à falta, mas sim à não utilização de tecnologia. Os híbridos em geral são de alto valor agregado, principalmente os simples, ficando de difícil acesso aos pequenos produtores que acabam utilizando variedades ou até mesmo variedades crioulas (RAPOSO, 2002).

O programa de seleção recorrente recíproca da UENF atualmente se encontra em seu 13^o ciclo, e a cada ciclo, sementes remanescentes S_1 das famílias a serem recombinadas são armazenadas para posteriormente serem realizadas sucessivas gerações de autofecundação. Portanto, o banco de germoplasma do programa de melhoramento de milho detém hoje um grande número de linhagens oriundas do programa de seleção recorrente recíproca, cujos valores genéticos são desconhecidos, em especial das linhagens extraídas nos últimos ciclos. Como é de se esperar em um programa de seleção recorrente recíproca, a frequência de alelos favoráveis se eleve a cada ciclo, e as chances de serem extraídas linhagens com alto valor genético são grandes.

Dessa forma, é extremamente recomendado testar a capacidade geral e específica de combinação de forma a obter informações sobre o comportamento dessas linhagens em cruzamentos específicos ou o seu comportamento médio com um grupo de linhagens e, assim, recomendar materiais altamente produtivos adaptados à região Norte e Noroeste Fluminense do Rio de Janeiro.

Com isso, o presente trabalho tem por objetivo identificar e selecionar linhagens que possuam boa capacidade específica de combinação (CEC) e boa capacidade geral de combinação (CGC), além de medir a divergência genética entre linhagens de diferentes grupos heteróticos, utilizando marcadores microssatélites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e Botânica

O milho comum é uma gramínea pertencente à família Poaceae, espécie *Zea mays* L., tribo *Maydeae*, que possui sete gêneros, dois dos quais, *Zea* e *Tripsacum*, são nativos do hemisfério ocidental, e cinco, da Ásia (Paterniani; Nass; Santos 2000). É uma planta alotetraloide com comportamento diplóide, com $2n = 2x = 20$ cromossomos (Marcos Filho, 2005). Sua taxa de autofecundação é inferior a 5%, sendo, portanto, uma planta alógama, com polinização predominantemente anemófila (LUNA et al., 2001).

O milho comum é uma planta de porte ereto, com altura oscilando entre 1 e 3 metros, de acordo com as variedades. As flores masculinas que terminam em uma panícula no ápice da planta recebem o nome de pendão, e as flores femininas localizadas nas axilas foliares, após fertilização, originam as espigas. Possui caule do tipo colmo de calibre robusto e folhas largas, planas e pontiagudas, muito eficientes em fotossíntese (Bull, 1993). A planta de milho é considerada uma das mais eficientes na conversão de energia radiante e, conseqüentemente, na produção de biomassa (Fancelli; Dourado-Neto 2000).

2.2. Importância econômica

Considerando as duas últimas safras, a produtividade estimada é de 3.970 kg.ha⁻¹. Este número pode variar para mais ou para menos, dado o longo período decorrente desde a semeadura da primeira safra até a colheita da segunda safra. A produção brasileira de milho esperada para a safra 2011/12 deverá ficar em 60.830,8 mil toneladas, com variação de 6,0% em relação à safra passada, quando foram colhidas 57.514,1 mil toneladas. Esta estimativa é baseada em uma safra normal. Tais variações podem estar relacionadas à maior ou menor influência dos fatores de produção durante o transcurso de todo o ciclo produtivo (CONAB, 2012).

Em se tratando da região Norte e Noroeste Fluminense, a cultura vem sendo utilizada como uma alternativa de diversificação. Embora não seja uma região tradicional de cultivo de grãos, com 7.000 ha plantados é fundamental que se disponha de cultivares melhoradas, uma vez que, além da necessidade do milho para produtividade de grãos, que não ultrapassa a marca de 2,5 t.ha⁻¹, a região utiliza bastante esta cultura para a produção de silagem para o gado (CONAB,2012).

2.3. A Seleção Recorrente Recíproca na Cultura do Milho

A seleção recorrente consiste em um processo cíclico de obtenção, avaliação e recombinação de progênes, aumentando de forma gradativa a frequência dos alelos favoráveis dos caracteres sob seleção, melhorando o desempenho das populações ou dos híbridos interpopulacionais, e a recombinação das progênes selecionadas gera variabilidade genética para o ciclo de seleção recorrente subsequente.

Em se tratando da seleção recorrente recíproca, este método consiste no melhoramento simultâneo de duas populações, que devem ser geneticamente distantes e de elevado potencial agrônômico (Comstock e Robinson, 1948). Esse método tem a vantagem de possibilitar o desenvolvimento simultâneo de híbridos e linhagens, tornando-se então um método combinado de múltiplos propósitos (Paterniani e Miranda Filho, 1987).

As populações melhoradas via seleção recorrente são fonte de linhagens não oriundas do processo de reciclagem de linhagens e, portanto, não aparentadas com elas. Conforme a metodologia preconizada por Souza Júnior & Pinto (2000), as linhagens são extraídas na fase de obtenção das progênies, em que se realiza a autofecundação, gerando as progênies S_1 que serão estocadas para serem utilizadas após a fase de avaliação, em que são identificadas as progênies superiores. Após avaliação das progênies, as sementes S_1 correspondentes às melhores progênies são plantadas, efetuando-se a autofecundação das plantas envolvidas nos cruzamentos, gerando, após algumas gerações de autofecundação, linhagens potenciais para híbridos de alta produtividade.

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

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

2.4. O uso de testadores no melhoramento do milho

O uso de *topcrosses* no melhoramento de milho tem como objetivo avaliar a capacidade combinatória de linhagens, visando à estimação de valores genéticos para a melhoria da população.

De acordo com Hallauer et al. (2010), a principal diferença entre a capacidade geral e específica de combinação é atribuída à base genética do testador (base ampla ou estreita). Tais diferenças são essencialmente uma questão na diferença das frequências genéticas. No testador de base ampla, a frequência genética para determinado loco pode assumir valores entre 0 e 1, enquanto, para um testador de base estreita, esses valores se limitam a 1 ou 0. Já para o uso de testadores resultantes do cruzamento de duas linhagens homozigotas, como, por exemplo, o uso de híbridos

simples, tais valores podem ser de 0, 0,5 ou 1. Em ambos os casos (base ampla ou base estreita), a seleção pode ocasionar mudança na média da população em função da predominância dos efeitos aditivos quando são utilizados testadores de base ampla ou a predominância dos efeitos de dominância quando são utilizados testadores de base estreita.

Ao considerar os genótipos que estão sendo avaliados em *topcrosses*, parece ser difícil distinguir entre capacidade geral e específica de combinação (Lonnquist & Lindsey, 1964; Souza, 2000). Neste caso, a expressão capacidade de combinação deve ser usada no sentido mais amplo.

Segundo Hallauer (1975), a questão central para aplicação da metodologia do topcross é a escolha do testador. O objetivo é encontrar um testador que discrimine com maior eficiência os genótipos de acordo com os fins da seleção.

Davis (1927) efetuou seleção de linhagens com base na capacidade geral de combinação com um testador de base ampla. Johnson e Hayes (1936) também relataram que as linhagens com rendimentos elevados foram mais propensas a produzir híbridos simples melhores.

Para Matzinger (1953), um testador desejável é aquele que combina praticidade no uso com o máximo de informação sobre o desempenho esperado das linhagens usadas em outras combinações ou cultivadas em outros ambientes. Porém, este mesmo autor ressalta que um só testador não pode cumprir todos esses requisitos.

Rawling e Thompson (1962) definiram o melhor testador como aquele que maximiza o desempenho em relação a linhagens e discrimina de forma eficiente as linhagens que estão sendo testadas.

De acordo com Alisson e Curnow (1966), para o melhoramento populacional, o melhor testador é aquele que maximiza o rendimento médio esperado da população a partir de cruzamentos aleatórios de genótipos selecionados. Por sua vez, Hallauer (1975) preconiza que, em geral, um testador adequado deve ser de fácil manipulação, fornecer informações que classifiquem o mérito relativo de linhagens e maximizar o ganho genético.

Gama et al. (2002), em trabalho visando a avaliar o potencial genético de um sintético de milho de grãos duros utilizando um testador relacionado, constataram que os maiores valores médios para peso de espiga despilhada foram de 12.069 kg ha⁻¹ e 11.068 kg ha⁻¹, atribuídos a dois híbridos topcrosses, tendo sido os valores das estimativas dos parâmetros estudados semelhantes aos encontrados em alguns estudos desenvolvidos em condições tropicais.

Ferreira et al. (2009) também utilizaram testador para avaliar a capacidade geral de combinação de linhagens parcialmente endogâmicas em *topcross*. Os resultados deste trabalho mostram que alguns híbridos topcrosses possuem elevado potencial produtivo, com a vantagem do menor custo de produção, tendo sido também encontradas linhagens S₃ com elevados valores de CGC.

2.5. O delineamento topcross na avaliação da capacidade combinatória em milho.

Estima-se que os programas de melhoramento de milho, no mundo todo, geram milhares de linhagens por ano. Devido à depressão por endogamia, que torna este tipo de genótipo pouco competitivo e com baixo potencial *per se*, existem algumas dificuldades na avaliação e na caracterização fenotípica desses materiais (Hallauer et al.; 2010). A identificação de parentais superiores é o primeiro passo para o melhoramento genético visando à obtenção de cultivares produtivas.

Além disso, o efeito ambiental pode promover alterações na classificação dos genótipos em baixo nível de homozigose em virtude da interação genótipos por ambientes (G x A). Tudo isso pode levar a estimativas imprecisas de parâmetros genéticos importantes, como variabilidade genotípica e herdabilidade para caracteres importantes, além de altas estimativas para coeficientes de variação experimentais, ocasionando baixa eficiência na escolha de linhagens elite. Dessa forma, recomenda-se que a avaliação de caracteres agronômicos seja feita em híbridos sintetizados via dialelos ou topcrosses, que possibilitam a expressão de heterose e permitem avaliar o mérito das linhagens genitoras

com elevado valor genético e menores influências de erros experimentais, uma vez que a correlação entre o desempenho per se das linhagens e dos híbridos é baixa.

Os cruzamentos dialélicos são comumente empregados para avaliação da capacidade específica de combinação (CEC) e capacidade geral de combinação (CGC) (Griffing, 1956; Cruz et al., 2004). Entretanto, sua praticidade é reduzida quando o número de linhagens é elevado. Para contornar este problema, melhoristas têm optado pelo método de topcrosses, proposto por DAVIS (1924), para testar linhagens em programas de milho híbrido. Esta metodologia consiste em avaliar o mérito relativo de um grande número de linhagens em cruzamentos com testadores, eliminando aquelas de desempenho agrônômico inferior, tornando mais racional e eficiente o programa de híbridos (NURMBERG et al., 2000).

A seleção do testador ideal irá depender dos objetivos de cada programa, podendo estar fundamentada na alta ou baixa frequência de alelos favoráveis, base genética ampla ou estreita, capacidade geral ou específica de combinação, rendimento per se, número de testadores utilizados e grau de parentesco com os materiais avaliados (Hallauer & Miranda Filho, 1995; Castellanos et al., 1998; Santos et al., 2001). Um bom testador, para qualquer programa de desenvolvimento de híbridos, deve oferecer simplicidade no uso, gerar informação que classifique corretamente o potencial relativo das linhagens em cruzamento e maximizar o ganho genético (Duarte et al.; 2003).

Como se observa, a CGC é função direta das diferenças de frequências alélicas, ou seja, $\pi_i - \bar{p}$. Dessa forma, valores superiores de capacidades de combinação são esperados para genótipos cujas frequências de alelos favoráveis sejam elevadas, ou seja, maiores valores de π_i , o que permite inferir sobre a estrutura genética dos genótipos em avaliação. A análise de variância permite testar a presença de efeitos genéticos aditivos e estimar parâmetros como a variância aditiva.

Os efeitos da CEC são indicativos de interações não aditivas para o caráter resultante da complementação gênica entre os parentais, possibilitando antever respostas de ganho genético com a exploração da

heterose (Bastos et al., 2003). A ausência de significância do componente quadrático da CEC implica que os parentais não apresentam entre si um apreciável grau de complementação gênica em relação às frequências dos alelos nos locos que apresentam dominância (Vencovsky & Barriga, 1992).

A combinação híbrida mais favorável deve ser, portanto, aquela que apresentar maior estimativa de capacidade específica de combinação (CEC) resultante de um cruzamento em que pelo menos um dos parentais apresente elevada capacidade geral de combinação (Cruz et al., 2004).

A interpretação genética da capacidade de combinação auxilia a compreensão da complexidade do processo da escolha do testador adequado. Vencovsky (1987) relata que, considerando um loco com dois alelos, a capacidade geral de combinação (CGC) é obtida pela expressão $CGC = (p_i - \bar{p}) [a + (1 - 2t)d]$, em que p_i é a frequência do alelo favorável para o referido loco na linhagem sob avaliação; \bar{p} é a frequência alélica média de todas as linhagens que estão sendo avaliadas; t é a frequência alélica do testador utilizado; a é o desvio dos locos em homozigose em relação à média, ou seja, os efeitos aditivos; e d é o desvio do heterozigoto em relação à média, isto é, os efeitos de dominância.

Há evidências de que a variância das estimativas de Capacidade Geral de Combinação (CGC) e de Capacidade Específica de Combinação (CEC) pode interagir com locais e anos e que a CEC inclui desvios de dominância e epistasia, além de uma porção significativa da interação genótipo por ambiente (ROJAS e SPRAGUE, 1952).

2.6. Utilização de marcadores moleculares para estimar a diversidade genética.

Marcadores moleculares têm sido empregados como forma de avaliar a similaridade genética com maior precisão por apresentarem pouca variação ambiental e serem ilimitados, podendo cobrir todo o genoma do organismo (Singh et al., 1991; Bered, 1999; Brammer, 2000). Atualmente, existem vários marcadores moleculares disponíveis para os mais diversos tipos de culturas.

A escolha de um marcador molecular depende de vários fatores como a disponibilidade do marcador para a espécie em estudo, nível de polimorfismo apresentado pelo marcador, disponibilidade de informação do genoma da espécie alvo, habilidades técnicas, custo da análise, disponibilidade de equipamentos, entre outros (SOUZA et al., 2008).

Os marcadores mais utilizados para avaliar a dissimilaridade genética ao nível molecular são: Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequence Repeats Amplification (ISSR), Amplified Fragment Length Polimorphism (AFLP) e Simple Sequence Repeats (SSR). Todos esses marcadores utilizam a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (WILLIAMS et al., 1990).

Os microssatélites são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em tandem, de dois a seis nucleotídeos de comprimento, que estão entre os locos mais polimórficos dos genomas (Ferguson et al., 1995; Milach, 1998; Matioli, 2001). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (Studart, 2001).

As sequências simples repetitivas (SSR) ou microssatélites possuem grande ocorrência em genomas eucariotos (LITT e LUTY, 1989). Regiões contendo SSR são amplificadas, individualmente, por meio de PCR, utilizando-se um par de primers específico (de 20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Tendo em vista a expressão codominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação genética (TAUTZ, 1989; BLAIR et al., 2003; SONG et al., 2004).

A alta informação contida em loco SSR, aliada à sua expressão codominante, potencial para automação e requerimento de pequena quantidade de DNA, fazem com que os SSRs sejam considerados marcadores genéticos ideais para mapeamento genético e de alta eficiência para estudos de ligação, proteção de variedades, seleção assistida, estudos de diversidade, entre outros (SONG et al., 2004, BORÉM e CAIXETA, 2009). Além de todas essas utilidades, os SSRs

também podem gerar informações sobre o nível de homozigose de genótipos que estão sendo avaliados.

Apesar do número relativamente elevado de publicações sobre diversidade molecular do milho, não se conhece nenhum programa de melhoramento que use, em sua rotina, tais estimativas para a tomada de decisão. Para que uma medida de diversidade seja empregada pelos melhoristas, é necessário que a estimativa de diversidade tenha sido obtida a partir de um estimador adequado.

Assim como em outras culturas, diferentes coeficientes de similaridade e de distância genética foram empregados para estimar a diversidade entre genótipos de algodoeiro, sem que nenhuma razão para a escolha tenha sido explicitada (Lu & Myers, 2002; Rahman et al., 2002; Rana & Bhat, 2005).

Trabalhos publicados sobre milho (Meyer et al., 2004) e feijoeiro (Emygdio et al., 2003) mostram que os agrupamentos podem variar com a escolha do coeficiente de similaridade, e que a análise da eficiência da projeção gráfica do agrupamento (Cruz, 2001) pode auxiliar na escolha dos coeficientes mais adequados.

Além disso, os marcadores SSR são úteis para detectar heterozigosidade em um loco específico, o que é importante para o acompanhamento da pureza genética e para a observação do nível de endogamia dos materiais elite utilizados em programas de melhoramento genético (Padilha, 2002). Barbosa-Neto et al. (1998) empregaram também marcadores RAPD e SSR para estudar a variabilidade genética em milho doce, constatando maior similaridade entre as populações do que dentro das populações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos Híbridos Topcrosses

Os híbridos foram obtidos na área experimental do Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes (Norte do Estado do Rio de Janeiro).

As linhagens utilizadas fazem parte de dois grupos heteróticos distintos: população “Flint”, oriunda da Universidade Federal de Viçosa, e a população “Dent”, oriunda da mesma universidade. Ambas as populações possuem o gene braquítico, o que lhes confere porte mais baixo.

Estas populações já foram submetidas a 12 ciclos de seleção recorrente recíproca, 5 ciclos na UFV e 7 ciclos na UENF, e a cada ciclo de seleção (dois anos) são obtidos híbridos interpopulacionais e também extraídas linhagens de ambas as populações.

Inicialmente, foi conduzido um ensaio para avaliar o desempenho *per se* para as características peso de grãos (PG), número de espigas (NE), peso de espigas despalhadas (PED), rendimento (REND), florescimento masculino (FM), número de plantas (NP) e peso de 100 sementes (P100) de todas as linhagens obtidas ao longo dos ciclos de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos a fim de se fazer um estudo de correlação fenotípica entre tais linhagens e os respectivos híbridos gerados. A partir desse trabalho, foram selecionadas 22 linhagens

superiores, 10 linhagens do grupo “Flint” e 12 linhagens do grupo “Dent”, em diferentes níveis de homozigose, para uso no presente trabalho (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição das 22 linhagens e os dois testadores utilizados no Topcross quanto a Tipo de Grão, Geração, Ciclo e Procedência.

Linhagem	Tipo de Grão	Geração	Ciclo	Procedência
L 5	Dentado	S7	P10	UENF
L 13	Dentado	S7	P10	UENF
L 10 A	Dentado	S7	P10	UENF
L 15	Dentado	S7	P10	UENF
L 22	Dentado	S7	P10	UENF
L 3 br	Dentado	S7	-	UNB
L 2	Dentado	S7	P10	UENF
L 14	Dentado	S7	P10	UENF
L 8	Dentado	S7	P10	UENF
B 73	Dentado	S7	-	UNB
Comp. Bulk	Dentado	S7	-	UNB
L 1032	Dentado	S6	P6	UENF
L 6*	Dentado	S5	P8	UENF
L 29	Duro	S7	C10	UENF
L 26	Duro	S7	C10	UENF
L 23	Duro	S7	C10	UENF
L 41	Duro	S7	C10	UENF
L 25 A	Duro	S5	C8	UENF
L 36	Duro	S7	C10	UENF
L 10 B	Duro	-	-	UNB
L 35	Duro	S7	C10	UENF
L 33	Duro	S7	C10	UENF
L48	Duro	S7	C10	UENF
L 159 br*	Duro	S7	-	UNB

*Testadores de base estreita

Cada grupo de linhagens (“Flint” e “Dent”) foi cruzado com dois testadores: um de base ampla, que permite inferir sobre a capacidade geral de combinação (CGC), e um de base estreita, que permite inferir sobre a capacidade específica de combinação (CEC).

Os testadores utilizados para as linhagens do grupo “Dent” são a linhagem 159 br (linhagem com o melhor desempenho *per se* do grupo Flint) e a variedade C8 (população pertencente ao grupo Flint do 8º ciclo de seleção recorrente recíproca), que testam para CEC e CGG, respectivamente. Para as linhagens do grupo “Flint”, os testadores utilizados são a linhagem L6 (linhagem com o melhor desempenho *per se* do grupo Dent) e a variedade P8 (população pertencente ao grupo Dent do 8º ciclo de seleção recorrente recíproca), que também testam para CEC e CGG, respectivamente. Todas as linhagens escolhidas como testadores apresentam facilidade de manejo e alta eficiência na obtenção de sementes.

3.2. Avaliações dos híbridos topcrosses

As avaliações dos híbridos obtidos foram feitas em dois locais: Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes (Norte do Estado do Rio de Janeiro), e na Estação Experimental Ilha do Pombo, em Itaocara (Noroeste Fluminense – Pesagro-Rio).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições, com 46 tratamentos, 44 híbridos Topcrosses e duas testemunhas comerciais (BR106 e UENF 508-8). Cada parcela foi constituída por uma linha de cinco metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,9 metros e cinco sementes por metro linear, totalizando 25 plantas por parcela.

As 22 linhagens selecionadas, 12 do tipo “duro” e 10 do tipo “dentado”, combinadas com os seus respectivos testadores, geraram 44 híbridos topcrosses: 10 híbridos resultantes do cruzamento das linhagens tipo “duro” com o testador de base estreita do tipo “Dent”; 10 híbridos resultantes do cruzamento das linhagens do tipo “duro” com o testador de base ampla do tipo “Dent”; 12 híbridos resultantes do cruzamento das

linhagens do tipo “dentado” com o testador de base estreita do tipo “duro”; e 12 híbridos resultantes do cruzamento das linhagens do tipo “Dent” com o testador de base ampla do tipo “duro” (Tabela 2).

Tabela 2- Esquema para obtenção dos Híbridos Topcrosses

Linhagens “Dent”	Testador base estreita “Flint” (L159)	Testador base ampla “Flint” (C8)	Linhagens “Flint”	Testador base estreita “Dent” (L6)	Testador base ampla “Dent”(P8)
L 5	X	X	L 29	X	X
L 13	X	X	L 26	X	X
L 10 A	X	X	L 23	X	X
L 15	X	X	L 41	X	X
L 22	X	X	L 25 A	X	X
L 3 br	X	X	L 36	X	X
L 2	X	X	L 10 B	X	X
L 14	X	X	L 35	X	X
L 8	X	X	L 33	X	X
B 73	X	X	L 48	X	X
C. Bulk	X	X			
L 1032	X	X			

As sementeiras dos experimentos em Campos dos Goytacazes e Itaocara foram feitas em sistema convencional de plantio. As adubações de sementeira, pela aplicação de 400 kg.ha⁻¹ do formulado N-P-K 8-28-16. Posteriormente, foram efetuadas duas adubações de cobertura: uma aos 30 dias após o plantio, com 300 kg.ha⁻¹ do formulado N-P-K 20-00-20, e outra após 45 dias de plantio, com 200 kg.ha⁻¹ de ureia. O controle de plantas invasoras foi feito com a aplicação do herbicida Roundup antes do plantio e uma capina manual.

3.3. Características avaliadas

As 12 características de interesse agrônômico foram:

- Altura de Planta (AP): altura média de seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até o nó de inserção da folha-bandeira em metros;
- Altura de Espiga (AE): altura média das mesmas seis plantas competitivas, medidas do nível do solo até a base da espiga superior no colmo, em metros;
- Plantas Quebradas (NPQ): número de plantas que se apresentaram quebradas, abaixo da espiga superior, no momento da colheita;
- Plantas Acamadas (NPAC): número de plantas que apresentaram ângulo de inclinação superior a 45° com a vertical, no momento da colheita;
- Florescimento Masculino (FM): correspondente ao número de dias após o plantio até a antese de 50% das flores masculinas das plantas da parcela;
- Florescimento Feminino (FF): correspondente ao número de dias após o plantio até a emissão dos estilos-estigma de 50% das plantas da parcela;
- Stand (NP): Número de plantas por parcela;
- Empalhamento (EMP): número de espigas mal empalhadas por parcela;
- Peso de 100 sementes (P100): peso de 100 sementes de cada parcela (gramas);
- Número de espigas (NE): número de espigas por parcela;
- Peso de espigas despalhadas (PED): peso de espigas despalhadas por parcela (Kg.parc^{-1}); e
- Rendimento (REND): produtividade em kg.ha^{-1} .

3.4. Análises estatísticas e estimação da capacidade combinatória

Para a análise dos dados, foi considerado o seguinte modelo estatístico para a análise de variância conjunta:

$$Y_{ijk} = \mu + (B/A)_{JK} + G_i + A_j + GA_{ij} + e_{ijk}$$

em que,

Y_{ijk} é a observação no k-ésimo bloco, avaliada no i-ésimo genótipo e j-ésimo ambiente;

μ é a média geral do ensaio;

$(B/A)_{JK}$ é o efeito do bloco k no ambiente j;

G_i é o efeito do genótipo i;

A_j é o efeito do ambiente j;

GA_{ij} é o efeito da interação entre o genótipo i e o ambiente j; e

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} .

Os esquemas das análises individuais e conjuntas, bem como as esperanças dos quadrados médios, estão apresentados na Tabela 3. Na análise conjunta, foi considerado o efeito de ambiente como fixo, uma vez que os ambientes de avaliação não representam a totalidade das condições edafoclimáticas das regiões norte e noroeste Fluminense. Já os efeitos de genótipos foram tomados como aleatórios por serem representativos para o conjunto de linhagens usadas para gerá-los.

Tabela 3 - Esquema das análises de variância conjunta dos híbridos Topcrosses, envolvendo dois ambientes, com as respectivas esperanças dos quadrados médios E (QM) e graus de liberdade (GL).

F.V.	G.L.	E (QM)	F
Blocos/Ambientes	(r-1) a	$\sigma^2 + g\sigma^2b$	
Ambientes (A)	a-1	$\sigma^2 + r\sigma^2ga + g\sigma^2b + gr\sigma^2a$	$\frac{(QMA+QMR)}{(QMB+QMGA)}$
Genótipos(G)	g-1	$\sigma^2 + ar\sigma^2g$	QMG/QMR
G x A	(a-1) (g-1)	$\sigma^2 + r\sigma^2ga$	QMGA/QMR
Resíduo	a(g-1) (r-1)	σ^2	

Para verificar as diferenças entre cada grupo de genótipos em estudo (híbridos Topcrosses do grupo “Flint” e híbridos Topcrosses do grupo “Dent”, ambos testando para base ampla e estreita), os graus de liberdade de genótipos foram decompostos, sendo cada grupo avaliado via contrastes ortogonais. Desta forma, cada contraste gera uma hipótese a ser testada e está associado a uma soma de quadrados com 1 grau de liberdade. As comparações foram elaboradas com o objetivo de testar os efeitos de grupos (híbridos Topcrosses do grupo “Flint” e híbridos Topcrosses do grupo “Dent”, ambos testando para base ampla e estreita), e a interação entre eles.

As estimativas das capacidades geral e específicas de combinação foram obtidas pelo método proposto por Hallauer et al. (2010), sendo tal estimativa obtida pelo desvio do cruzamento em relação à média do conjunto de híbridos obtidos para o mesmo testador. Tais estimativas foram obtidas com a planilha Excel.

Além destas análises, foram estimados outros parâmetros, como a média, o coeficiente de variação experimental (C.V.), o coeficiente de variação genética (C.V.g), a variância genética e a herdabilidade com base na média das famílias. Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do programa SAS (1996).

3.5. Análise molecular

3.5.1. Seleção dos *primers*

Foi efetuada uma prospecção de marcadores SSR gênicos e genômicos na base de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information), disponível on-line no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=zea%20mays>, especificamente no mapa IBM02, feito para a cultura do milho comum, que se encontra completo para os 10 grupos de ligação presentes no genoma da cultura.

Para tanto, inicialmente, foi selecionado um total de 667 primers de SSR nos 10 grupos de ligação componentes do mapa. Em seguida, foi feita uma triagem dos *primers*, buscando manter uma distância física mínima de 30 cM ao longo de cada cromossomo, evitando-se a seleção de *primers* localizados na extremidade de cada braço, resultando na obtenção de um total de 165 primers SSR-ESTs, que foram enviados para síntese.

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

3.5.2. Preparo das amostras para avaliação

Para a análise de diversidade genética, foram retiradas amostras de folhas jovens das 22 linhagens escolhidas, entre elas, 10 linhagens do grupo “Flint” e 12 linhagens do grupo “Dent”, que compuseram o Topcross, Tabela 1, para extração do DNA.

As amostras coletadas foram envoltas em papel alumínio e imersas em nitrogênio líquido, posteriormente, acondicionadas em tubos com capacidade de 15 ml e armazenadas em *ultrafreezer* a - 86°C.

3.5.3. Extração de DNA

As amostras de folhas jovens coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo efetuada a extração do DNA genômico, utilizando Kit Plant Genomics DNA Extraction YGP 100 – RBC (BioAmerica), seguindo metodologia preconizada pelo fabricante.

Após a extração, o DNA foi submetido à quantificação via análise em gel de agarose a 0,8%, utilizando o marcador High DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA) para verificar a qualidade. As amostras de DNA foram coradas utilizando a mistura de GelRed™ e Blue Juice (1:1), e a imagem, capturada pelo sistema de fotodocumentação MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems).

Para mensuração do volume de DNA extraído, posteriormente, as amostras foram submetidas à quantificação no aparelho NANODROP 2000c. com leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 260 nm. Com base neste resultado, todos os primers foram diluídos para a concentração de trabalho de 10ng/μL.

3.5.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para testar as condições da reação em cadeia de polimerase (PCR), foi feito um gradiente de temperatura, variando de 50° à 70,5°, tendo sido selecionadas as temperaturas ótimas para cada um dos 165 primers. Após a definição das temperaturas, foi feito um *screening*, no qual foram selecionados 66 primers com base no grau de polimorfismo e na qualidade de amplificação. Devido à impossibilidade de se trabalhar com os 66 *primers* no que se refere à quantidade de material e tempo disponível, foram utilizados 34 *primers*, Tabela 4, com o maior grau de informação.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 10 μL, contendo 2 ng de DNA, 1 μL de tampão de reação 5X, MgCl₂ (1,5mM), 1 μL de dNTPs (200 μM de cada), 0,8 μM de cada iniciador (Sigma, USA) e 0,05 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL) (Go Taq Flexi, Promega, USA). As amplificações foram feitas em sistema de “touchdown” num termociclador Eppendorf, em que a temperatura de pareamento dos primers teve início com 5°C acima da temperatura ótima e sofreu um decréscimo de 1°C durante os cinco primeiros

ciclos de amplificação até alcançar a temperatura desejada. O programa utilizado foi de 94°C durante 4 minutos; 94°C por 1 minuto; Y°C com redução de 1°C a cada ciclo por 1 minuto; 72°C por 3 minutos (durante os cinco primeiros ciclos); 94°C por 1 minuto; Y°C por 1 minuto; 72°C por 3 minutos (durante 30 ciclos); 72°C por 7 minutos, sendo Y a temperatura específica de anelamento para cada *primer* (Tabela 4).

Tabela 4 – Descrição dos 34 primers utilizados, suas sequências, posição nos grupos de ligação, temperatura de anelamento e número de alelos.

Loco	Sequência do Primer (5'....3')	G.L.	Ta(°C)	Nº de alelos
umc1166	F*: CGATCAGATCATAACAACCTTGC R*: GAGGATCGATTCTTGGCGAGT	1	58,1	7
umc2149	F: AGCAGCACCATCGTAATAAGCAC R: TACATGCAAAGCTAGCTAGTCGGA	1	58,1	6
umc1073	F: CACCAACGCCAATTAGCATCC R: GTGGGCGTGTTCCTACTACTCA	1	68,1	6
umc1917	F: ACTTCCACTTCACCAGCCTTTTC R: GGAAAGAAGAGCCGCTTGGT	1	68,1	7
umc1811	F: ACTCACTCGACGGACTTCTCGAC R: AGATAGCCGCGGAGACCAAG	1	68,1	8
umc2145-r1	F: GTAGTAGAGGCAGGGCTTCCAAC R: TAGGAGTTCGTCAGTCAACGAGC	1	63,5	4
umc2145-r2	F: GTAGTAGAGGCAGGGCTTCCAAC R: TAGGAGTTCGTCAGTCAACGAGC	1	63,5	3
umc1924	F: CTACAACAACCTGCTGCTCCCG R: GGATGCGGTTCGTACAGTACAAGTAT	1	63,5	5
umc1108	F: ATGATGAAGCCTCACACATACGAA R: TAAAGAGAGAGGAAACAAGCTGCG	2	60,8	3
phi96100	F: AGGAGGACCCCAACTCCTG R: TTGCACGAGCCATCGTAT	2	55,5	7
ole1	F: AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC R: GCGGCGATATATACGAGGTTGT	2	55,5	3
umc2071	F: ACTGATGGTGTTCCTTGGGTGTTTT R: ATACACGCAGTTACCCGAAGGTT	3	58,1	9
umc1594	F: CACTGCAGGCCACACATACATA R: GCCAGGGGAGAAATAAAATAAAGC	3	55,5	5
umc1135	F: CGCTAGCTTAGCTCCATCGTTTTA R: TTTTAACTCAGCAGCATCGTCT	3	53,2	4
umc2152	F: CCTTTGTCTTCCGCTATCTTCCTT R: TAGCTTCACCTGATGATCTTGCAC	3	60,8	8
umc1117	F: AATTCTAGTCCTGGGTCGGAATC R: CGTGGCCGTGGAGTCTACTACT	4	58,1	9
umc1031	F: ACGTGGACAACCAAGTCTATCAACA R: TTGGGTTTCATACCTCCTAGGAACA	4	60,8	6

Tabela 4, cont.

Loco	Sequência do Primer (5'....3')	G.L.	Ta(°C)	Nº de alelos
umc1899	F: GAAACTAATCAGTGCGCCACAGTA R: TGCATACAGGTTACAGCAGGACTC	4	53,2	8
umc1775	F: GAGGACAACGCTGCTATTCTCG R: GGAACTCCGTCAAAATCCCATC	4	53,2	6
umc1328	F: ATCCAGTCTCCGGACTTCCAAC R: TACAAGGAGGAGGCCGCTGT	4	70,5	4
umc1221	F: AAACAGGCACAAAGCATGGATAG R: GCAACAGCAACTGGCAACAG	5	58,1	6
umc1155	F: CCTGAGGGTGATTTGTCTGTCTCT R: TCTTTTATTGTGCCCGTTGAGATT	5	58,1	7
gln4	F: AGCAGAACGGCAAGGGCTACT R: TTTGGCACACCACGACGA	5	58,1	7
umc1325	F: ATATTGTACAGGAGCAGCTGGGAC R: GGAGGTCATGCGTGTAATAGGTC	5	63,5	5
umc2170	F: CACTGCAAGCCTCTACAGACAATG R: GAGAGTTCTCCAGGCGAGGTG	6	60,8	6
umc1250	F: CTGCTGCTTTTGGTGTTGTCTCT R: GAGGCAAGAGCTAGGTCTCGATAG	6	53,2	7
umc1837	F: AAGTGTTGGGAAAGAAGGGGACT R: TGGTCGGGGCTTCCTATAGTTAAA	7	53,2	4
umc1412	F: CTCAGCTTGCAGGTTATCGCTT R: GCATCTGTAGCCTTTTTGTGTGTG	7	60,8	6
umc1268	F: ACGAACAACCTAGCACAGTCCTAAA R: CAAGGCGGTTACCAAGTTTACATC	8	53,2	4
umc1483	F: GTTAGGGGGTAGAAGACAGGGATG R: GTTCAAGGCCATTGTAATCCTCCT	8	70,5	5
umc1974	F: ACAAGGAGACCCTCCTCAGCTAGT R: GTAAGCTGTGGCCATACTACCACC	8	70,5	8
umc1789	F: ACCTCTCCTTTTTCCTCGCCTT R: GTCAGAGAAGAGGCCGGGTC	9	68,1	7
umc1634	F: GTAGCCTGCAAAACATCCAAGAAC R: TCCGTTGAGGACACTCGAATTTAT	9	63,5	6
umc1743	F: GAGAGGAGGAGCTTACGAGC R: TGGACTTCGAAAATTCTCTTCAGC	9	60,8	8

*Sequências Forward e Reverse.

3.5.5 Eletroforese

Depois da amplificação, o material foi distribuído em placas específicas contendo 96 poços para eletroforese capilar no aparelho AdvanCE™ FS9.

O material amplificado foi corrido em gel de agarose 0,8% imerso em tampão TBE [Tris-Borato 90 mM (pH8,0) EDTA 10 mM], corado com GEL RED™ e visualizado através do sistema de fotodocumentação MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems) a fim de saber sobre a quantificação do material para, posteriormente, ponderar a diluição com base nas imagens obtidas no gel. Depois de obtidas as imagens, foram feitas as diluições do produto de amplificação cuja relação material amplificado/água ultrapura variou de 1 µl / 69 µl à 1 µl / 89 µl.

Após diluição do material nas placas, ele foi levado ao aparelho AdvanCE™ FS96 junto com outra placa contendo o marcador de 10 e 500 pares de base da NoLimits™. Foi utilizado também o marcador DNA Ladder (Invitrogen, USA) de 250pb durante as corridas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados.

O material contido nas placas foi transportado para os capilares onde foram submetidos à corrida de 140 minutos em uma corrente de 7,50 Kw. Após esta etapa, as imagens resultantes da eletroforese foram utilizadas para análise (Figura 1).

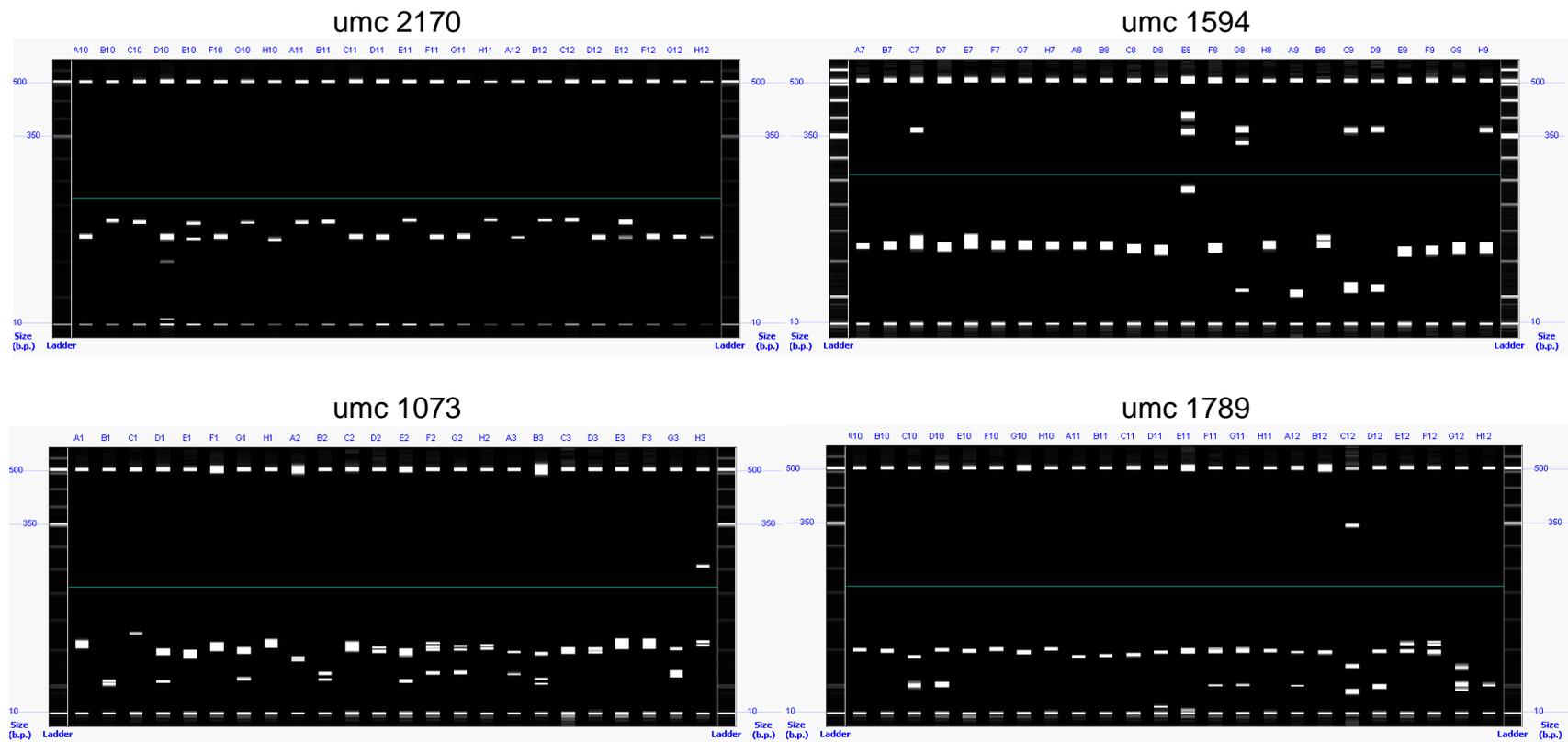


Figura1- Imagem da eletroforese capilar do aparelho AdvanCE FS96 de quarto *primers* microssatélites (umc 2170, umc 1594, umc 1073 e umc 1789).

3.5.6 Análise dos dados moleculares

Os dados obtidos pela amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código numérico para cada alelo por loco. Tal matriz numérica foi desenvolvida atribuindo-se valores de 1 até o número máximo de alelos no loco, como descrito a seguir: para um loco que apresenta três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 para as formas homozigotas (A1A1, A2A2 e A3A3) e 12, 13 e 23 para as heterozigotas (A1A2, A1A3 e A2A3). A partir dessa matriz numérica, foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados, com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2008), utilizando um Índice Ponderado, conforme proposto por Ramos et al. (2011c). A análise de agrupamento dos genótipos via dendograma foi feita utilizando a média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, denominado método da distância média (UPGMA) (Cruz & Regazzi, 2001), com auxílio do programa Mega versão 5 (Kumar et al., 2009), e a dispersão gráfica dos genótipos foi feita com base no método da Análise das Coordenadas Principais (PCA), utilizando o programa Genalex 6.3 (Peakall and Smouse, 2009).

O aplicativo Genes (1997) foi utilizado para analisar a variabilidade genética entre e dentro dos grupos através da Análise Molecular de Variância (AMOVA) (Excoffier et al., 2005).

Para estimar os valores do conteúdo de polimorfismo (PIC), índice de Shannon, heterozigose esperada (H_E), estimada pela proporção esperada de heterozigotos sobre acasalamento ao acaso, heterozigose observada (H_O), estimada pela proporção de heterozigotos observados em um dado loco, e o coeficiente de endogamia (F), foram utilizados os programas PowerMarker versão 3.25 (Liu and Muse, 2005) e Popgene versão 1.31 (Yeh et al., 1999). Os genótipos ainda foram avaliados quanto à estruturação genética.

Para tanto, utilizou-se o método bayesiano através do programa Structure 2.3.1 (Pritchard et al., 2000). Empregou-se o modelo de presença de mistura (“*admixture model*”) e frequências alélicas correlacionadas, usando “*Burnin Period* = 5.000”, seguido de extensão de 50.000 repetições durante a análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados morfoagronômicos

4.1.1 Análises de Variância.

Na análise conjunta, Tabela 5, verificou-se interação significativa Genótipo x Ambiente ($P \leq 0,01$) para os caracteres número de plantas (NP), florescimento feminino (FF), peso de espiga despalhada (PED), rendimento (REND) e número de plantas acamadas (NPAC) e que o efeito de Genótipos x Ambientes foi menos expressivo para ($P \leq 0,05$) para o caráter peso de 100 sementes.

Observa-se que, para a fonte de variação Topcrosses do grupo “Flint” (TC “FLINT”), houve diferença significativa ($P \leq 0,01$) para todas as variáveis, exceto para empalhamento e número de plantas quebradas.

Para a fonte de variação Topcrosses do grupo “Dent” (TC “Dent”), houve diferença significativa ($P \leq 0,01$) para NP, FF, AP, PED, REND, EMP, NPQ, FM, AE e P100.

Observando a fonte de variação da interação entre os grupos “Flint” (TC “Flint”) x “Dent” (TC “Dent”), nota-se que NP, FF, PED, REND, FM AE e P100 evidenciaram diferenças significativas, enquanto para as demais variáveis não foi observada diferença. Tal fato mostra que, para as características diretamente relacionadas à produtividade, o grupo de híbridos “Flint” diferiu do grupo “Dent”,

mostrando diferenças entre os grupos heteróticos no que se refere a tais características.

Tabela 5 - Estimativa de quadrados médios para 12 características morfoagronômicas avaliadas em 44 híbridos Topcrosses em dois locais (Colégio Agrícola e Itaocara) - RJ, no ano agrícola de 2010/2011.

FV	G.L.	QM					
		NP	NE	FF	AP	PED	REND
Bloco/Amb.	4	25,63*	59,78*	5,64*	0,60**	2627,10**	8,45**
Amb.	1	16,26ns	75,47ns	239,30**	8,78**	34519,30**	139,90**
Gen.	43	53,41**	77,75**	16,59**	0,15**	1397,22**	4,88**
TC "Flint"	19	83,52**	145,22**	10,19**	0,16**	1930,77**	6,98**
TCFba	9	112,34**	211,37**	11,42**	0,17**	2413,97**	8,12**
TCFbe	9	45,05**	89,87*	10,05**	0,15*	1449,55**	5,86**
TCFbaxTCFbe	1	170,41**	48,01ns	0,30ns	0,25ns	1912,80*	6,80*
TC "Dent"	23	18,91**	25,06ns	21,46**	0,14*	722,66**	2,63**
TCDba	11	12,86ns	30,65ns	19,38**	0,13ns	495,19ns	1,67ns
TCDbe	11	19,44*	21,65ns	1,25ns	0,16*	984,56**	3,74**
TCDbaxTCDbe	1	79,51**	1,08ns	266,78**	0,15ns	344,02ns	1,00ns
TC "Flint" x TC "Dent"	1	274,71**	7,53ns	26,03**	0,02ns	6774,44**	16,61**
Gen. x Amb.	43	14,58*	18,77ns	5,76**	0,08ns	635,98**	2,13**
TC "Flint" x Amb.	19	24,71**	23,23ns	6,26**	0,11ns	716,63**	2,44**
TCFba x Amb.	9	29,88**	17,33ns	7,34**	0,15*	475,74ns	1,77ns
TCFbe x Amb.	9	19,05*	30,46ns	5,68**	0,06ns	1000,66**	3,33**
(TCFbaxTCFbe) x Amb.	1	29,01ns	11,18ns	1,63ns	0,15ns	328,39ns	0,50ns
TC "Dent" x Amb.	23	6,24ns	12,31ns	5,05**	0,05ns	562,46*	1,89*
TCDba x Amb.	11	7,10ns	17,84ns	4,67*	0,06ns	718,02**	2,45*
TCDbe x Amb.	11	5,34ns	7,86ns	1,23ns	0,04ns	362,76ns	1,18ns
(TCDbaxTCDbe) x Amb.	1	6,68ns	0,51ns	51,37**	0,08ns	1048,03ns	3,65ns
(TC "Flint" x TC "Dent") x Amb.	1	14,01ns	82,63*	12,61*	0,01ns	794,52ns	1,62ns
Resíduo	172	9,08	11,90	2,24	0,07	287,49	1,07
Total	263						

Tabela 5, cont.

FV	G.L.	QM					
		EMP	NPQ	NPAC	FM	AE	P100
Bloco/Amb.	4	1,58 ^{ns}	18,90**	1,47 ^{ns}	10,53*	0,38**	43,18**
Amb.	1	8,00 ^{ns}	93,91*	13,48*	87,04*	2,92**	547,71**
Gen.	43	3,38**	3,51**	1,85**	16,12**	0,08**	39,92**
TC “Flint”	19	1,30 ^{ns}	2,93 ^{ns}	3,50**	9,46**	0,06**	54,54**
TCFba	9	0,66 ^{ns}	2,86 ^{ns}	2,26**	7,78*	0,05*	69,37**
TCFbe	9	1,74*	3,30 ^{ns}	5,08**	11,78**	0,07**	45,38**
TCFbaxTCFbe	1	3,01 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,41 ^{ns}	3,68 ^{ns}	0,01 ^{ns}	3,56 ^{ns}
TC “Dent”	23	5,18**	4,13**	0,47 ^{ns}	21,13**	0,11**	21,70**
TCDba	11	2,13*	3,33 ^{ns}	0,45 ^{ns}	11,98**	0,11**	13,65 ^{ns}
TCDbe	11	8,24**	4,03*	0,13 ^{ns}	6,18 ^{ns}	0,11**	31,49**
TCDbaxTCDbe	1	5,06*	14,07**	4,34*	286,18**	0,08*	2,53 ^{ns}
TC “Flint” x TC “Dent”	1	1,68 ^{ns}	0,33 ^{ns}	2,17 ^{ns}	27,54**	0,08*	181,29**
Gen. x Amb.	43	1,22 ^{ns}	2,35 ^{ns}	1,68**	5,55 ^{ns}	0,03 ^{ns}	14,83*
TC “Flint” x Amb.	19	1,20 ^{ns}	2,30 ^{ns}	3,09**	5,69 ^{ns}	0,03 ^{ns}	14,22 ^{ns}
TCDba x Amb.	9	0,63 ^{ns}	2,78 ^{ns}	1,09 ^{ns}	3,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	8,19 ^{ns}
TCDbe x Amb.	9	1,91*	1,90 ^{ns}	5,41**	8,73*	0,05*	21,31*
(TCDbaxTCDbe) x Amb.	1	0,01 ^{ns}	1,64 ^{ns}	0,21 ^{ns}	2,41 ^{ns}	0,00 ^{ns}	4,84 ^{ns}
TC “Dent” x Amb.	23	1,30 ^{ns}	2,30 ^{ns}	0,41 ^{ns}	5,54 ^{ns}	0,03 ^{ns}	14,50 ^{ns}
TCDba x Amb.	11	0,52 ^{ns}	3,62*	0,63 ^{ns}	4,26 ^{ns}	0,03 ^{ns}	11,12 ^{ns}
TCDbe x Amb.	11	2,18**	1,19 ^{ns}	0,15 ^{ns}	3,19 ^{ns}	0,03 ^{ns}	16,39 ^{ns}
(TCDbaxTCDbe) x Amb.	1	0,18 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,85 ^{ns}	45,57**	0,02 ^{ns}	30,76 ^{ns}
(TC “Flint” x TC “Dent”) x Amb.	1	0,01 ^{ns}	4,61 ^{ns}	3,79*	3,11 ^{ns}	0,03 ^{ns}	33,89 ^{ns}
Resíduo	172	0,90	1,91	0,87	3,65	0,02	9,61
Total	263						

^{*}, ^{**}, ^{ns} Significativo a 5%, 1% e não significativo pelo teste F, respectivamente. EMP=Número de espigas mal empalhadas; NPQ=Número de plantas quebradas; NPAC=Número de plantas acamadas; FM=Número de dias para o florescimento masculino; AE=altura de espiga e P100=Peso de 100 grãos.

Quando se decompõe a fonte de variação TC “Flint”, são obtidas as fontes de variação TCFba (Topcrosses “Flint” que utilizam testadores de base ampla) TCFbe (Topcrosses “Flint” que utilizam testadores de base estreita) e a interação TCFba x TCFbe.

Considerando-se a fonte de variação TCFba, fica evidente a diferença significativa para todas as características avaliadas, exceto para EMP e NPQ. Isto mostra que os híbridos oriundos do cruzamento de linhagens “Flint” com o testador de base ampla do grupo “Dent” (P8) diferiram entre si. Da mesma forma, para a fonte de variação TCFbe, também foi encontrada diferença significativa para todas as características, exceto para NPQ, mostrando também que os híbridos oriundos do cruzamento de linhagens “Flint” com o testador de base estreita do grupo “Dent” (L6) também diferiram entre si.

Tomando-se as estimativas do quadrado médio da fonte de variação da interação TCFba x TCFbe, observa-se diferença significativa para características diretamente ligadas à produtividade, sendo elas NP, PED e REND, portanto, evidencia-se que, para tais características, os testadores P8 e L6 foram importantes para gerar desempenhos distintos nos híbridos dentro do grupo “FLINT”.

Dentro do grupo “Dent”, o testador de base ampla (C8) foi capaz de discriminar os híbridos em relação a FF, FM, EMP e AE, enquanto o testador de base estreita (L159) foi capaz de diferir os híbridos dentro do grupo “Dent” quanto a NP, AP, PED, REND, EMP, NPQ, AE e P100.

Em relação à interação TCba x TCbe, nota-se que os testadores de base ampla (C8) e base estreita (L159) foram capazes de diferenciar apenas 7 características das 13 avaliadas, sendo elas NP, FF, FM, EMP, NPQ, NPAC e AE.

No que diz respeito à interação Genótipos(G) x Ambientes (A), foram observadas diferenças significativas para as características NP, FF, PED, REND, NPAC e P100, evidenciando uma grande contribuição de fatores ambientais para alteração do ranqueamento dos híbridos nos ambientes em que foram avaliados.

Para as características de maior interesse, casos de PED e REND, são observadas diferenças significativas para as fontes de variação TC “Flint” x Amb., TC “Dent” x Amb., TCFbe x Amb. e TCDba x Amb., evidenciando que, para tais fontes de variação, o ambiente também contribuiu para alterar o ranqueamento dos híbridos.

O fato de a interação ter sido significativa indica a necessidade de recomendar híbridos específicos para cada ambiente (FREITAS JÚNIOR, 2008). Porém, Gabriel (2006) observou ausência de interação no mesmo local, sugerindo poder utilizar recomendação simultânea de híbridos para os dois ambientes. Estes trabalhos denotam que os fatores que favorecem a interação G x A podem não ser somente de natureza ambiental, mas também em função do delineamento adotado ou até mesmo devido ao valor amostral dos híbridos avaliados.

4.1.2 Parâmetros genéticos

De acordo com as estimativas dos parâmetros genéticos para as características morfoagronômicas avaliadas, Tabela 6, observou-se que o procedimento de avaliação dos híbridos Topcrosses apresenta grandes possibilidades de sucesso por apresentarem uma alta variabilidade genotípica, com valores do coeficiente de herdabilidade com base na média das famílias (h^2) variando de 51,67% a 86,48%, com destaque para PED e REND, que são características relacionadas à produtividade, com valores de 79,42% e 78,01%, respectivamente.

Tabela 6 - Média Geral (\bar{X}) com base nos dois ambientes e parâmetros genéticos experimentais para 12 características morfoagronômicas avaliadas em 44 híbridos Topcrosses “Flint” e “Dent”

Características	\bar{X}	CV (%)	C.V.g (%)	Var. Gen.	h^2 (média de famílias)
NP*	21,4	14,07	-	-	-
NE	25,85	13,92	12,80	10,95	73,37
FF	61,68	2,42	2,51	2,39	86,48
AP	2,29	11,72	4,95	0,013	51,67
PED	3,06	17,64	14,07	184,95	79,42
REND	5,58	18,66	14,27	0,63	78,01
EMP	0,54	174	119,10	0,41	73,37
NPQ	1,65	83,41	-	-	-
NPAC	0,40	227,71	101,06	0,16	53,05
FM	62,37	3,06	2,31	2,07	77,35
AE	1,34	10,6	7,69	0,01	75,76
P100	28,68	10,86	7,83	5,05	75,94

* NP=Número de plantas por parcela; NE=Número de espigas por parcela; FF=Número de dias para o florescimento feminino; AP=Altura de plantas (m); PED=Peso de espigas despalhadas (kg.parc.⁻¹); REND=Rendimento de grãos (t.ha⁻¹); EMP=Número de espigas mal empalhadas; NPQ=Número de plantas quebradas; NPAC=Número de plantas acamadas; FM=Número de dias para o florescimento masculino; AE=altura de espiga e P100=Peso de 100 grãos.

Já a característica NPAC apresentou um valor de herdabilidade de 53,05% pois se trata de uma característica mais ligada a fatores ambientais que

genéticos. Vale ressaltar que, de uma forma geral, as estimativas do coeficiente de variação experimental (CV) variaram de 2,42 % à 18,66%, evidenciando assim uma boa precisão experimental, exceto para as variáveis NPQ e NPAC, com as estimativas de 83,41% e 227,71%, respectivamente. Tal resultado se deve ao fato de tais características poderem ser altamente influenciadas pelo ambiente e tomadas de forma numérica, fazendo com que tal característica não siga uma distribuição normal. Gabriel (2006) e Coimbra (2000) também encontraram CVs elevados para NPQ e NPAC.

Hallauer e Lopez-Perez (1979) conduziram um trabalho com 50 famílias S8 derivadas da variedade sintética *Stiff Stalk Synthetic* (BSSS). Utilizaram cinco testadores, sendo dois testadores de base ampla relacionados, um testador de base estreita pobre, um testador de base estreita rico e um testador de base ampla, obtidos pelo método espiga por fileira. Os autores perceberam que, nas estimativas dos componentes da análise de variância, o testador de base ampla apresentou maior magnitude nas estimativas em relação aos testadores de base estreita. Tal dado contraria o esperado, uma vez que quando são avaliadas famílias de meios-irmãos, a tendência é para um testador de base estreita, o coeficiente de endogamia do testador, tender a 1, dobrando a variância aditiva explorada em relação ao testador de base ampla, para o qual o coeficiente de endogamia tende a 0.

Assim sendo, percebe-se que as estimativas dos quadrados médios da maioria das características avaliadas para as fontes de variação TCC ba e TCC be do presente trabalho estão em consonância com o observado por Hallauer e Lopez-Perez (1979). Porém, quando são observadas as fontes de variação TCP ba e TCP be, nota-se que as estimativas dos quadrados médios da maioria das características seguem o esperado com relação à base genética dos genótipos em questão (Tabela 5).

4.1.3 Contrastes ortogonais

Como foi detectada a interação Genótipos x Ambientes na análise de variância conjunta, torna-se necessária a aplicação dos contrastes ortogonais para os grupos de híbridos em separado, considerando cada ambiente em que

foram avaliados, Itaocara e Colégio Agrícola, uma vez que se procura recomendar os híbridos que se destacaram em cada local.

Para o ambiente Itaocara, Tabela 7, o contraste entre os grupos Genótipos x Testemunhas não apresentou diferença significativa para todas as características avaliadas, denotando que, em geral, o conjunto total de híbridos topcrosses avaliados não diferiu das testemunhas comerciais.

Tabela 7 - Valores de F dos contrastes ortogonais entre médias de 11 caracteres morfoagronômicos, avaliados em cinco grupos distintos de genótipos de milho, em Itaocara.

Caracteres	“FLINT” ba x “FLINT” be			“FLINT” ba x “DENT” ba			“FLINT” be x “DENT” be		
	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste
NP	19,06	20,46	1,89 ^{ns}	19,06	21,7500	7,57**	20,46	22,60	5,75 ^{ns}
AP	2,37	2,37	3,10 ^{ns}	2,53	2,53	1,52 ^{ns}	2,37	2,53	3,39 ^{ns}
NE	23,34	23,86	0,18 ^{ns}	23,34	25,11	2,12 ^{ns}	23,86	25,09	0,85 ^{ns}
PED	2,39	2,53	0,72 ^{ns}	2,39	2,76	4,65*	2,53	3,02	7,44**
REND	4,3065	4,6889	1,23 ^{ns}	4,3065	4,9259	3,45 ^{ns}	4,6889	5,3889	4,20*
EMP	0,4666	0,7666	0,63 ^{ns}	0,4666	0,5555	0,06 ^{ns}	0,7666	1,0000	0,42 ^{ns}
NPQ	1,2333	1,1000	0,17 ^{ns}	1,2333	1,2777	0,02 ^{ns}	1,1000	0,6666	1,94 ^{ns}
NPAC	0,7666	0,9666	0,30 ^{ns}	0,7666	0,6944	0,04 ^{ns}	0,9666	0,1944	4,81*
FM	61,9666	62,6000	0,78 ^{ns}	61,9666	63,3888	4,27*	62,6000	59,4444	21,01**
AE	1,4262	1,4141	0,07 ^{ns}	1,4262	1,4400	0,09 ^{ns}	1,4141	1,5046	3,83*
P100	26,2069	25,8333	0,10 ^{ns}	26,2069	25,0555	2,89 ^{ns}	25,8333	28,7142	6,94**
Caracteres	“DENT” ba x “DENT” be			“FLINT” x “DENT”			Genótipos x Testemunhas		
	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste
NP	21,75	22,60	1,29 ^{ns}	19,76	22,77	13,26**	22,13	24,83	5,36 ^{ns}
AP	2,43	2,53	1,68 ^{ns}	2,40	2,48	0,18 ^{ns}	2,45	2,46	0,00 ^{ns}
NE	25,11	25,09	0,01 ^{ns}	23,61	25,04	2,83 ^{ns}	24,39	25,50	0,32 ^{ns}
PED	2,76	3,02	2,32 ^{ns}	2,46	2,89	11,92**	2,69	2,78	0,13 ^{ns}
REND	4,92	5,38	1,99 ^{ns}	4,50	5,14	7,63**	4,85	5,11	0,26 ^{ns}
EMP	0,5555	1,0000	1,67 ^{ns}	0,61	0,78	0,40 ^{ns}	0,70	1,66	2,52 ^{ns}
NPQ	1,2777	0,6666	4,25*	1,17	0,97	0,78 ^{ns}	1,06	2,00	3,14 ^{ns}
NPAC	0,6944	0,1944	2,22 ^{ns}	0,87	0,44	2,88 ^{ns}	0,64	0,50	0,07 ^{ns}
FM	63,3888	59,4444	36,11**	62,28	61,42	3,17 ^{ns}	61,81	60,83	0,76 ^{ns}
AE	1,4400	1,5046	2,15 ^{ns}	1,42	1,47	2,53 ^{ns}	1,45	1,45	0,00 ^{ns}
P100	25,0555	28,7142	0,39 ^{ns}	26,02	26,88	9,38**	27,31	26,66	0,08 ^{ns}

^{ns} Significativo a 5%, 1% e não significativo pelo teste F, respectivamente. NP=Número de plantas por parcela; AP=Altura de plantas (m); NE=Número de espigas por parcela; PED=Peso de espigas despalhadas (Kg.parc⁻¹); REND=Rendimento de grãos (t.ha⁻¹); EMP=Número de espigas mal empalhadas; NPQ=Número de plantas quebradas; NPAC=Número de plantas acamadas; FM=Número de dias para o florescimento masculino; AE=altura de espiga e P100=Peso de 100 grãos.

Tabela 8 - Valores de F dos contrastes ortogonais entre médias de 11 caracteres morfoagronômicos, avaliados em cinco grupos distintos de genótipos de milho. no Colégio Agrícola.

Caracteres	“FLINT” ba x “FLINT” be			“FLINT” ba x “DENT” ba			“FLINT” be x “DENT” be		
	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste
NP	19,13	22,50	11,55**	19,13	21,44	5,94*	22,50	23,36	0,82 ^{ns}
AP	2,12	2,10	0,14 ^{ns}	2,12	2,11	0,03 ^{ns}	2,10	2,13	0,30 ^{ns}
NE	24,96	26,83	2,28 ^{ns}	24,96	25,05	0,01 ^{ns}	26,83	25,11	2,12 ^{ns}
PED	3,12	3,47	3,60 ^{ns}	3,12	3,54	5,92*	3,47	3,45	0,00 ^{ns}
REND	5,83	6,38	2,63 ^{ns}	5,83	6,53	4,59*	6,38	6,36	0,00 ^{ns}
EMP	0,13	0,47	2,40 ^{ns}	0,13	0,31	0,70 ^{ns}	0,47	0,61	0,49 ^{ns}
NPQ	1,90	2,23	0,55 ^{ns}	1,90	2,72	3,69*	2,23	2,08	0,12 ^{ns}
NPAC	0,13	0,17	0,07 ^{ns}	0,13	0,31	2,13 ^{ns}	0,17	0,11	0,22 ^{ns}
FM	63,13	63,20	0,04 ^{ns}	63,13	63,58	1,90 ^{ns}	63,20	61,89	16,11**
AE	1,27	1,23	0,07 ^{ns}	1,27	1,24	0,01 ^{ns}	1,23	1,26	0,64 ^{ns}
P100	29,40	29,67	0,10 ^{ns}	29,40	31,06	4,17**	29,67	29,89	0,08 ^{ns}

Caracteres	“DENT” ba x “DENT” be			“FLINT” x “DENT”			Genótipos x Testemunhas		
	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste	Média 1 ^o Grupo	Média 2 ^o Grupo	Contraste
NP	21,44	23,36	4,49*	20,81	22,40	5,59*	21,68	24,00	2,23 ^{ns}
AP	2,11	2,13	0,13 ^{ns}	2,11	2,12	0,07 ^{ns}	2,11	2,10	0,04 ^{ns}
NE	25,05	25,11	0,00 ^{ns}	25,90	25,08	0,95 ^{ns}	25,45	26,66	0,01 ^{ns}
PED	3,54	3,45	0,23 ^{ns}	3,30	3,50	2,96 ^{ns}	3,41	3,48	0,08 ^{ns}
REND	6,53	6,36	0,29 ^{ns}	6,11	6,44	2,16 ^{ns}	6,29	6,44	0,09 ^{ns}
EMP	0,31	0,61	2,42 ^{ns}	0,30	0,46	1,18 ^{ns}	0,39	0,83	1,70 ^{ns}
NPQ	2,72	2,08	2,44 ^{ns}	2,06	2,40	1,23 ^{ns}	2,25	2,67	0,36 ^{ns}
NPAC	0,31	0,11	2,92 ^{ns}	0,15	0,21	0,49 ^{ns}	0,18	0,33	0,60 ^{ns}
FM	63,58	61,89	29,59**	63,16	62,73	3,47 ^{ns}	62,93	62,00	2,97 ^{ns}
AE	1,24	1,26	0,39 ^{ns}	1,25	1,25	0,26 ^{ns}	1,25	1,21	0,21 ^{ns}
P100	31,06	29,89	2,28 ^{ns}	29,53	30,47	2,68 ^{ns}	30,04	32,33	2,90 ^{ns}

^{ns} Significativo a 5%, 1% e não significativo pelo teste F, respectivamente. NP=Número de plantas por parcela; AP=Altura de plantas (m); NE=Número de espigas por parcela; PED=Peso de espigas despalhadas (Kg.parc-1); REND=Rendimento de grãos (t.ha-1); EMP=Número de espigas mal empalhadas; NPQ=Número de plantas quebradas; NPAC=Número de plantas acamadas; FM=Número de dias para o florescimento masculino; AE=altura de espiga e P100=Peso de 100 grãos.

Para as características ligadas à produtividade, como NP, PED e REND, as testemunhas expressaram valores superiores aos híbridos, porém sem se distinguirem estatisticamente. Tal fato também foi observado no Colégio Agrícola Tabela 8, onde também não foi observada diferença significativa para todas as características.

Em relação ao contraste “Flint” ba x “Flint” be, embora em média o desempenho não tenha diferido estatisticamente em Itaocara, nota-se que, para as características diretamente ligadas à produção (NP, PED e REND), o grupo de híbridos “Flint” be se mostrou superior ao “Flint” ba. Tal fato era esperado, uma vez que os híbridos gerados pelo cruzamento de linhagens do grupo “Flint” com a linhagem do grupo “Dent” (L6) exploram mais a heterose, pois se trata de um testador de base estreita. Neste tipo de testador, espera-se que a proporção de locos em homozigose seja maior que a do testador de base ampla, ou seja, estimativas que estão relacionadas com os desvios de dominância. Do mesmo modo, foi observado que, no ambiente Colégio Agrícola, as diferenças das médias também não foram significativas para quase todas as características, exceto NP, e que as médias dos grupos envolvendo o testador de base estreita também foram superiores às do grupo no qual se utilizou o testador de base ampla.

Considerando o cruzamento entre os testadores de base ampla e as linhagens dos grupos “Flint” e “Dent” (“Flint” ba x “Dent” ba), em Itaocara, nota-se que para NP e PED houve diferença significativa e que para REND não foi observada diferença significativa, embora o grupo “Dent” ba se mostre, em média, superior ao grupo “Flint” ba para tais características. Tal fato pode estar relacionado à superioridade quanto à frequência de alelos favoráveis encontrados no grupo “Dent” em relação ao grupo “Flint”. Este mesmo comportamento foi observado para o Colégio Agrícola, tendo sido significativo para todas as características diretamente relacionadas à produção, embora tenha prevalecido o desempenho do grupo “Dent” ba sobre o grupo “Flint” ba,.

Considerando o cruzamento entre os testadores de base estreita e as linhagens dos grupos “Flint” e “Dent” (“Flint” be x “Dent” be), nota-se que em Itaocara houve diferenças significativas para quase todas as características, exceto para NP, AP, NE, EMP e NPQ. Para este contraste, também foi observado desempenho superior do grupo “Dent” em relação ao grupo “Flint”, ou seja, o grupo “Dent”, em média, explora mais a heterose em relação ao grupo “Flint”.

Quando se observa o mesmo contraste no Colégio Agrícola, pode-se notar que quase todas as médias das características não apresentaram diferenças significativas, exceto para FM, e que nesse ambiente o grupo “Flint” apresentou superioridade em relação ao grupo “Dent”.

Com relação aos testadores de base ampla (C8) e base estreita (L159) para o grupo “Dent” (“Dent” ba x “Dent” be), nota-se que em Itaocara não houve diferença significativa para quase todas as características, inclusive aquelas diretamente relacionadas à produção. Embora os híbridos não tenham se diferenciado, nota-se que o grupo dos híbridos, no qual estavam envolvidos os testadores de base estreita, teve, em média, um desempenho superior ao grupo de híbridos em que os testadores de base ampla estavam envolvidos. Esta diferença no desempenho também pode estar relacionada ao fato de o testador de base estreita explorar mais a heterose em relação aos testadores de base ampla. Quando se utiliza um testador de base estreita, explora-se metade da variância aditiva, enquanto, quando se utiliza um testador de base ampla, explora-se um quarto da variância aditiva (Hallauer et al., 2010). Tal fato não foi observado no Colégio Agrícola, onde, embora as médias para quase todas as características avaliadas não tenham sido significativamente diferentes, exceto para NP e FM, o grupo de híbridos envolvendo o testador de base ampla (C8) teve uma leve superioridade em relação ao grupo de híbridos envolvendo o testador de base estreita (L159). A causa disso pode estar relacionada a um efeito amostral de híbridos que podem não estar representando o grupo “Dent”.

Tomando-se o contraste “Flint” x “Dent”, observa-se que em Itaocara houve diferenças significativas para as características diretamente ligadas à produção (NP, PED e REND), enquanto no Colégio Agrícola só foi observada diferença significativa para NP. Considerando os testadores de base ampla e de base estreita de cada grupo heterótico, em média o grupo “Dent” superou o grupo “Flint” tanto em Itaocara quanto no Colégio Agrícola, comprovando a superioridade, tanto para os híbridos oriundos de cruzamento com testadores de base estreita quanto para híbridos oriundos de cruzamentos de testadores de base ampla.

Ferreira et al. (2010), trabalhando com híbridos topcrosses visando à extração de linhagens promissoras quanto ao seu valor genético, também

utilizaram contrastes ortogonais para comparar grupos de híbridos de acordo com a origem das linhagens utilizadas na obtenção desses híbridos.

4.1.4 Teste de agrupamento de médias

Considerando o desempenho dos híbridos topcrosses para a característica rendimento de grãos (REND), nota-se que para os dois ambientes, Itaocara e Colégio Agrícola, houve formação de dois grupos distintos, Tabela 9, e que também não foi detectada coincidência no ranqueamento dos tratamentos. Apesar da não coincidência deste ranqueamento, não se faz necessária a condução de dois programas de melhoramento para identificar híbridos adaptados à região Norte e Noroeste Fluminense, porém, torna-se imprescindível que a recomendação seja feita de acordo com o desempenho de cada híbrido nos dois ambientes avaliados, uma vez que os ambientes em que foram avaliados apresentam características edafoclimáticas distintas.

Observa-se que, em Itaocara, os tratamentos 34 (L33xL6), 16 (L5xL159), 26 (L2xL159), 14 (L13xL159) e 9 (L8xC8) se destacaram, com 7851,8; 6592,6; 6222,2; 6222,2 e 6222,1 kg.ha⁻¹, respectivamente. Nota-se também que, de acordo com o ranqueamento, os híbridos que tiveram destaques, em sua maioria, são híbridos nos quais foram utilizados testadores de base estreita, pois se explora mais a heterose. Da mesma forma, para o Colégio Agrícola, nota-se que os tratamentos que se sobressaíram foram o 11 (L14xC8), 25 (L2xC8), 8 (L36xL6), 7 (L36xP8) e o 10 (L8xL159), com 8222,2; 7851,8; 7703,7; 7555,6 e 7407,4 kg.ha⁻¹, respectivamente. O observado em Itaocara já não se aplicou para o Colégio Agrícola, pois não se observou tendência de híbridos oriundos do cruzamento com testadores de base estreita nos melhores ranqueados.

Apesar de as médias não diferirem significativamente pelo teste de Scott-Knott, percebe-se que 16 híbridos tiveram desempenho superior ao da testemunha BR 106 e 21 híbridos, superior à testemunha UENF 506-8, híbrido intervarietal oriundo do programa de seleção recorrente recíproca, em Itaocara. Já no Colégio Agrícola, foram observados 16 híbridos que tiveram desempenho melhor que a testemunha UENF 506-8 e 25 híbridos superiores à testemunha BR106. Nota-se, portanto, que o programa se mostrou bem eficiente na

identificação de materiais que se destacam na região norte e noroeste Fluminense.

Tabela 9 - Ranqueamento das médias para rendimento de grãos (kg.ha⁻¹), agrupadas pelo teste de Scott-Knott nos dois ambientes.

Ranqueamento	Tratamento	Itaocara	Ranqueamento	Tratamento	Col. Agr.
1	34 (L33xL6)	7851,8 a ^{1/}	1	11 (L14xC8)	8222,2 a
2	16 (L5xL159)	6592,6 a	2	25 (L2xC8)	7851,8 a
3	26 (L2xL159)	6222,2 a	3	8 (L36xL6)	7703,7 a
4	14 (L13xL159)	6222,2 a	4	7 (L36xP8)	7555,6 a
5	9 (L8xC8)	6222,1 a	5	10 (L8xL159)	7407,4 a
6	40 (L10BxL6)	6148,1 a	6	22 (L41xL6)	7333,3 a
7	24 (L10AxL159)	6000,0 a	7	34 (L33xL6)	7333,3 a
8	10 (L8xL159)	5703,7 a	8	6 (L23xL6)	7111,1 a
9	35 (L48xP8)	5703,7 a	9	4 (L15xL159)	7037,0 a
10	43 (B73xC8)	5703,7 a	10	14 (L13xL159)	7037,0 a
11	41 (Comp.Bulk x C8)	5629,6 a	11	15 (L5xC8)	6963,0 a
12	30 (L1032xL159)	5481,5 a	12	24 (L10AxL159)	6963,0 a
13	3 (L15xC8)	5407,4 a	13	21 (L41xP8)	6963,0 a
14	31 (L3br ² br ² x C8)	5407,4 a	14	37 (L26xP8)	6888,9 a
15	22 (L41xL6)	5407,4 a	15	12 (L14xL159)	6888,9 a
16	32 (L3br ² br ² x L159)	5333,4	16	13 (L13xC8)	6814,8 a
17	BR 106	5333,333 a	17	27 (L22xC8)	6740,7 a
18	21 (L41xP8)	5259,3 a	18	16 (L5xL159)	6740,7 a
19	12 (L14xL159)	5259,3 a	19	UENF 506-8	6592,6 a
20	44 (B73xL159)	5259,2a	20	28 (L22xL159)	6592,6 a
21	4 (L15xL159)	5218,5 a	21	39 (L10BxP8)	6518,5 a
22	25 (L2xC8)	4962,9 a	22	36 (L48xL6)	6444,4 a
23	UENF 506-8	4888,887 b	23	26 (L2xL159)	6444,4 a
24	36 (L48xL6)	4814,8 b	24	9 (L8xC8)	6444,4 a
25	11 (L4xC8)	4814,8 b	25	43 (B73xC8)	6370,4 a
26	28 (L22xL159)	4740,7 b	26	40 (L10BxL6)	6370,4 a
27	27 (L22xC8)	4666,7 b	27	BR 106	6296,3 a
28	1 (L29xP8)	4666,7 b	28	41 (Comp.Bulk x C8)	6296,3 a
29	39 (L10BxP8)	4666,6 b	29	5 (L23xP8)	6296,3 a
30	13 (L13xC8)	4518,5 b	30	23 (L10AxC8)	6148,1 a
31	7 (L36xP8)	4518,5 b	31	30 (L1032xL159)	6047,1 a
32	18 (L25AxL6)	4518,5 b	32	33 (L33xP8)	6074,1 a
33	5 (L23xP8)	4518,5 b	33	20 (L35xL6)	5851,9 b
34	37 (L26xP8)	4222,2 b	34	38 (L26xL6)	5777,8 b
35	29 (L1032xC8)	4148,1 b	35	29 (L1032xC8)	5703,7 b
36	23 (L10AxC8)	4074,1 b	36	3 (L15xC8)	5555,6 b
37	20 (L35xL6)	4000,0 b	37	1 (L29xP8)	5555,6 b
38	6 (L23xL6)	3851,9 b	38	35 (L48xP8)	5481,5 b
39	2 (L29xL6)	3777,8 b	39	31 (L3br2br2 x C8)	5259,3 b
40	17 (L25AxP8)	3703,7 b	40	42 (Comp.Bulk. x L159)	5111,1 b

Tabela 9, cont.

Ranqueamento	Tratamento	Itaocara	Ranqueamento	Tratamento	Col. Agr.
41	33 (L33xP8)	3629,6 b	41	32 (L3br ² br ² xL159)	5037,0 b
42	15 (L5xC8)	3555,5 b	42	44 (B73xL159)	5037,0 b
43	38 (L26xL6)	3333,3 b	43	18 (L25AxL6)	4963,0 b
44	8 (L36xL6)	3185,2 b	44	2 (L29xL6)	4963,0 b
45	42 (Comp.Bulk. x L159)	2814,8 b	45	17 (L25xP8)	4963,0 b
46	19 (L35xP8)	2148,1 b	46	19(L35xP8)	2074,0 b

^{1/}Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

4.1.5 Capacidade Combinatória

Nas Tabelas 10 e 11, encontram-se as estimativas dos efeitos da capacidade específica (CEC) e geral (CGC) de combinação para o rendimento de grãos, das linhagens dos dois grupos heteróticos “Flint” e “Dent”. Considerando que as linhagens foram cruzadas com um testador de base ampla e um testador de base estreita para cada grupo, sendo as variedades C8 e L159 para o grupo “Dent” e P8 e L6 para o grupo “Flint”, foram estimadas as capacidades geral e específica de combinação (Hallauer et al., 2010).

As estimativas dos efeitos da CGC referentes ao grupo “Dent” no Colégio Agrícola, Tabela 10, variaram de -1271,60 kg.ha⁻¹ (L3br) a 1691,36 kg.ha⁻¹ (L14), sendo que a linhagem L2 também teve estimativa da CGC superior a 1300 kg.ha⁻¹. Já em Itaocara, as estimativas da CGC, Tabela 11, variaram de -888,89 kg.ha⁻¹ (L10A) a 1259,26 kg.ha⁻¹. Não foi observada coincidência no desempenho das linhagens no que diz respeito à CGC nos dois ambientes avaliados, comprovando que as linhagens sofreram influência ambiental, possuindo elevadas CGC em um local e baixas CGC em outro local, chegando a apresentar valores negativos.

Ainda para o grupo “Dent”, as estimativas da CEC no Colégio Agrícola variaram de -1327,16 kg.ha⁻¹ (L3br e B73) a 1043,21 kg.ha⁻¹, sendo que as linhagens L13, L10A, L15 e L14 também tiveram boa CEC. Para Itaocara, as estimativas da CEC variaram de -2814,81 kg.ha⁻¹ (C. Bulk) a 2222,23 kg.ha⁻¹ (L3br), sendo que as linhagens L5, L13 e L10A também tiveram boa CEC.

Tabela 10 - Capacidades Geral e Específica de combinação obtidas no Colégio Agrícola para rendimento de grãos (kg.ha⁻¹).

Linhasgens "DENT"	Testador base estreita "FLINT" (L159)	CEC	Testador base ampla "FLINT" (C8)	CGC	Linhasgens "FLINT"	Testador base estreita "DENT" (L6)	CEC	Testador base ampla "DENT" (P8)	CGC
L 5	6740,74	376,54	6962,967	432,10	L 29	4962,963	-1422,22	5555,557	-288,89
L 13	7037,037	672,84	6814,813	283,95	L 26	5777,777	-607,41	6888,887	1044,44
L 10 A	6962,963	598,77	6148,147	-382,72	L 23	7111,113	725,93	6370,37	525,93
L 15	7037,04	672,84	5555,557	-975,31	L 41	7333,333	948,15	6962,963	1118,52
L 22	6592,593	228,40	6740,74	209,88	L 25 A	4962,963	-1422,22	4962,96	-881,48
L 3 br	5037,04	-1327,16	5259,26	-1271,60	L 36	7703,703	1318,52	7555,557	1711,11
L 2	6444,443	80,25	7851,85	1320,99	L 10 B	6370,37	-14,82	6518,52	674,08
L 14	6888,887	524,69	8222,22	1691,36	L 35	5851,853	-533,33	2074,073	-3770,37
L 8	7407,407	1043,21	6444,443	-86,42	L 33	7333,333	948,15	6074,073	229,63
B 73	5037,037	-1327,16	6370,37	-160,49	L48	6444,443	59,26	5481,483	-362,96
C. Bulk	5111,11	-1253,09	6296,297	-234,57					
L 1032	6074,077	-290,12	5703,703	-827,16					

Tabela 11 - Capacidades Geral e Específica de combinação obtidas em Itaocara para rendimento de grãos (kg.ha⁻¹).

Linhagens "DENT"	Testador base estreita "FLINT" (L159)	CEC	Testador base ampla "FLINT" (C8)	CGC	Linhagens "FLINT"	Testador base estreita "DENT" (L6)	CEC	Testador base ampla "DENT" (P8)	CGC
L 5	6592,593	962,97	5259,257	296,29	L 29	3777,777	-911,11	4666,667	362,97
L 13	6222,15	592,53	3555,557	-1407,41	L 26	3333,333	-1355,56	4222,147	-81,55
L 10 A	6222,223	592,60	4074,073	-888,89	L 23	3851,853	-837,04	4518,517	214,82
L 15	5185,187	-444,44	5407,41	444,45	L 41	5407,407	718,52	5259,26	955,56
L 22	4740,74	-888,88	4666,667	-296,30	L 25 A	4518,517	-170,37	3703,703	-599,99
L 3 br	7851,85	2222,23	5407,407	444,44	L 36	3185,183	-1503,71	4518,52	214,82
L 2	6222,223	592,60	4666,667	-296,30	L 10 B	6148,147	1459,26	4666,663	362,97
L 14	5259,26	-370,36	4814,813	-148,15	L 35	4000	-688,89	2148,15	-2155,55
L 8	5703,703	74,08	6222,223	1259,26	L 33	7851,85	3162,96	3629,63	-674,07
B 73	5259,257	-370,37	5703,703	740,74	L48	4814,817	125,93	5703,703	1400,01
C. Bulk	2814,813	-2814,81	5629,63	666,67					
L 1032	5481,483	-148,14	4148,147	-814,82					

Embora as linhagens L10A e L13 tenham boas estimativas de CEC para os dois ambientes, nota-se que as demais linhagens analisadas para o grupo “Dent” tiveram desempenhos distintos nos dois ambientes avaliados, evidenciando também uma forte influência ambiental para a CEC.

Tomando-se agora o grupo “Flint”, as estimativas da CGC no Colégio Agrícola variaram de $-3770,37 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L35) a $1118,52 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L41), observando-se também boa CGC para as linhagens L26 e L36. Em Itaocara, as estimativas da CGC variaram de $-2155,55 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L35) a $1400,01 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L48), porém a linhagem L41 também teve boa CGC. Nota-se que a linhagem L41 apresentou ótima CGC para os dois ambientes, evidenciando que tal linhagem é pouco influenciada pelo ambiente em relação à CGC, enquanto as demais linhagens do grupo “FLINT” apresentam alta flutuabilidade no que diz respeito à CGC, confirmando uma alta influência ambiental para tal estimativa.

Levando em consideração a CEC, ainda para o grupo “Flint”, as estimativas para o Colégio Agrícola variaram de $-1422,22 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L29 e L25A) a $1318,52 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L36). Nota-se que as linhagens L41 e L33 também tiveram boas estimativas de CEC. Em Itaocara, as estimativas variaram de $-1501,71 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L36) a $3162,96 \text{ kg.ha}^{-1}$ (L33), sendo que as linhagens L41 e L10B também tiveram boa CEC. Tal fato mostra que a linhagem L41, além de possuir uma boa CGC, também possui uma boa CEC para os dois ambientes, evidenciando seu alto valor genético, ou seja, esta linhagem apresenta um bom comportamento em combinações híbridas para o grupo “Flint”.

4.1.6 Correlação entre desempenho de Linhagens *per se* versus híbridos topcrosses

A metodologia para as correlações entre linhagens *per se* e híbridos topcrosses foi aplicada às características PG, NE, PED, REND, FM, NP e P100, e os valores das suas correlações se encontram na Tabela 12.

Quando comparamos os híbridos do grupo “Dent” com as linhagens envolvidas do mesmo grupo, o valor de r foi significativo para FM ($r = 0,63$), mas para PG, NE, PED, REND, NP e P100 os valores de r não foram significativos com r igual a 0,25; -0,17; 0,35; 0,25; 0,22 e 0,53, respectivamente. Quando são comparadas as correlações para os híbridos do grupo “Flint” com as linhagens

envolvidas do mesmo grupo, observa-se que não houve diferenças significativas de r para nenhuma característica avaliada, sendo r igual a -0,21; 0,23; -0,04; -0,21; -0,56; 0,31 e -0,04 para PG, NE, PED, REND, FM, NP e P100, respectivamente.

Tabela 12 - Coeficientes de correlação de Spearman entre linhagens per se e Híbridos Topcrosses de grupos heteróticos distintos (“Dent” e “Flint”) para sete características morfoagronômicas.

Características	Grupos Heteróticos	
	Híbridos “Dent” x Linhagens “Dent”	Híbridos “FLINT” x Linhagens “FLINT”
PG	0,25398	-0,21885
NE	-0,17585	0,23386
PED	0,35150	-0,04242
REND	0,25398	-0,21885
FM	0,63122*	-0,56837
NP	0,22454	0,31629
P100	0,53067	-0,04767

*: significativo a 5% pelo Teste t. Peso de grãos por parcela (PG), Número de espigas por parcela (NE), Peso de espiga despalhada (PED), Rendimento (Rend), Florescimento masculino (FM), Número de plantas por parcela (NP) e Peso de 100 grãos (100).

Em um estudo sobre a relação entre o desempenho de linhagens per se e o comportamento dos híbridos topcrosses, Smith (1986) encontrou resultados que indicam que para caracteres condicionados por um grande número de locos que possuem dominância completa, espera-se que as correlações entre as linhagens per se e o comportamento dos híbridos topcrosses sejam menores que 0,5. Tal estimativa pode ser decorrente do fato de uma ação gênica não aditiva estar afetando o comportamento dos híbridos.

Já outros trabalhos (LONNQUIST & LINDSEY, 1964; MORERA, 1989) correlacionaram progênies em diferentes níveis de endogamia (S_1 e S_2) com seus respectivos híbridos topcrosses com a intenção de antecipar a previsibilidade na obtenção de híbridos com características agrônomicas desejáveis. Todos estes autores encontraram correlações significativas entre linhagens e híbridos topcrosses para características envolvendo a produção.

SOUZA et al. (2001), em trabalho com famílias S_1 e em híbridos topcrosses, encontraram correlações significativas para PED, contrariando, assim, o presente trabalho. Porém, MITTELMAN (2001) afirma que todas as

correlações devem ser interpretadas com cuidado, devido ao efeito amostral, ou seja, ao pequeno número de observação empregada na estimativa, além de essas estimativas não poderem ser extrapoladas para outras populações.

Portanto, para a característica FM na população “Dent”, é possível prever o comportamento dos híbridos sem necessidade de cruzamentos pra comprová-los. Já para as demais características (PG, NE, PED, REND, NP e P100), assim como para todas as características do grupo “Flint”, as chances de obter êxito são baixas, tornando-se imprescindível a estimação das capacidades de combinação para identificação de linhagens que, em cruzamento, resultarão em híbridos superiores.

4.2 Dados moleculares

Um total de 165 marcadores microssatélites foi analisado a fim de distinguir as linhagens do grupo “Flint” e “Dent” a nível molecular. Dos 165 marcadores utilizados, 34 (20,6%) foram capazes de distinguir essas linhagens e, portanto, utilizados para analisar todo o conjunto de linhagens do presente estudo.

Como se pode observar na Tabela 13, os marcadores foram distribuídos em 9 dos 10 grupos de ligação do milho, e apenas o grupo de ligação 10 não foi representado. O número de marcadores por grupo de ligação variou de 2 (GL 6 e GL 7) a 8 (GL 1), garantindo, assim, uma boa cobertura do genoma.

Tabela 13 – Características dos 34 pares de iniciadores microssatélites utilizados na análise das 24 linhagens “Flint” e “Dent”.

Loco	Sequência do Primer (5'...3')	G.L.	Ta(°C)	Nº de alelos	H _E	H _O	PIC
umc1166	F: CGATCAGATCATAACACAACCTTGC R: GAGGATCGATTCTTGGCGAGT	1	58,1	7	0,82	0,04	0,78
umc2149	F: AGCAGCACCATCGTAATAAGCAC R: TACATGCAAAGCTAGCTAGTCGGA	1	58,1	6	0,75	0,22	0,70
umc1073	F: CACCAACGCCAATTAGCATCC R: GTGGGCGTGTTCTCCTACTACTCA	1	68,1	6	0,83	0,33	0,81
umc1917	F: ACTTCCACTTCACCAGCCTTTTC R: GGAAAGAAGAGCCGCTTGGT	1	68,1	7	0,85	0,38	0,39
umc1811	F: ACTCACTCGACGGACTTCTCGAC R: AGATAGCCGCCGAGACCAAG	1	68,1	8	0,83	0,19	0,58
umc2145-r1	F: GTAGTAGAGGCAGGGCTTCCAAC R: TAGGAGTTCGTCAAGTCAACGAGC	1	63,5	4	0,64	0,04	0,70
umc2145-r2	F: GTAGTAGAGGCAGGGCTTCCAAC R: TAGGAGTTCGTCAAGTCAACGAGC	1	63,5	3	0,66	0	0,69
umc1924	F: CTACAACAAGTCTGCTCCCG R: GGATGCGGTCGTACAGTACAAGTAT	1	63,5	5	0,74	0,08	0,65
umc1108	F: ATGATGAAGCCTCACACATACGAA R: TAAAGAGAGAGGAAACAAGCTGCG	2	60,8	3	0,47	0	0,79
phi96100	F: AGGAGGACCCCAACTCCTG R: TTGCACGAGCCATCGTAT	2	55,5	7	0,83	0,08	0,72
ole1	F: AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC R: GCGGCGATATATACGAGGTTGT	2	55,5	3	0,6	0	0,78

Loco	Sequência do Primer (5'...3')	G.L.	Ta(°C)	Nº de alelos	H _E	H _O	PIC
umc2071	F: ACTGATGGTGTCTTGGGTGTTTT R: ATACACGCAGTTACCCGAAGGTT	3	58,1	9	0,84	0,37	0,56
umc1594	F: CACTGCAGGCCACACATACATA R: GCCAGGGGAGAAATAAAATAAAGC	3	55,5	5	0,63	0	0,80
umc1135	F: CGCTAGCTTAGCTCCATCGTTTTA R: TTTTAACTCACGAGCATCGTCT	3	53,2	4	0,66	0	0,60
umc2152	F: CCTTTGTCTCCGCTATCTTCCTT R: TAGCTTCACCTGATGATCTTGAC	3	60,8	8	0,79	0,70	0,78
umc1117	F: AATTCTAGTCCTGGGTCGGAAGTC R: CGTGGCCGTGGAGTCTACTACT	4	58,1	9	0,74	0,34	0,79
umc1031	F: ACGTGGACAACCAGTCTATCAACA R: TTGGGTTTCATACCTCCTAGGAACA	4	60,8	6	0,64	0,09	0,74
umc1899	F: GAAACTAATCAGTGCGCCACAGTA R: TGCATACAGGTTACAGCAGGACTC	4	53,2	8	0,82	0	0,56
umc1775	F: GAGGACAACGCTGCTATTCTCG R: GGAACTCCGTCAAATCCCATC	4	53,2	6	0,73	0	0,55
umc1328	F: ATCCAGTCTCCGACTTCCAAC R: TACAAGGAGGAGGCCGCTGT	4	70,5	4	0,34	0,04	0,68
umc1221	F: AAACAGGCACAAAGCATGGATAG R: GCAACAGCAACTGGCAACAG	5	58,1	6	0,76	0,16	0,61
umc1155	F: CCTGAGGGTGATTTGTCTGTCTCT R: TCTTTTATTGTGCCCGTTGAGATT	5	58,1	7	0,78	0,21	0,78
gln4	F: AGCAGAACGGCAAGGGCTACT R: TTTGGCACACCACGACGA	5	58,1	7	0,89	0,21	0,76

Loco	Sequência do Primer (5'...3')	G.L.	Ta(°C)	Nº de alelos	H _E	H _O	PIC
umc1325	F: ATATTGTACAGGAGCAGCTGGGAC R: GGAGGTCATGCGTGTAATAGGTC	5	63,5	5	0,61	0	0,54
umc2170	F: CACTGCAAGCCTCTACAGACAATG R: GAGAGTTCTCCAGGCGAGGTG	6	60,8	6	0,70	0,08	0,55
umc1250	F: CTGCTGCTTTTGGTGTGTCTCT R: GAGGCAAGAGCTAGGTCTCGATAG	6	53,2	7	0,81	0,11	0,68
umc1837	F: AAGTGTGGGAAAGAAGGGGACT R: TGGTCGGGGCTTCCTATAGTTAAA	7	53,2	4	0,63	0,16	0,52
umc1412	F: CTCAGCTTGCAGGTTATCGCTT R: GCATCTGTAGCCTTTTTGTGTGTG	7	60,8	6	0,69	0,34	0,58
umc1268	F: ACGAACAACCTAGCACAGTCCTAAA R: CAAGGCGGTTACCAAGTTTACATC	8	53,2	4	0,62	0	0,75
umc1483	F: GTTAGGGGGTAGAAGACAGGGATG R: GTTCAAGGCCATTGTAATCCTCCT	8	70,5	5	0,43	0,15	0,62
umc1974	F: ACAAGGAGACCCTCCTCAGCTAGT R: GTAAGCTGTGGCCATACTACCACC	8	70,5	8	0,69	0,08	0,82
umc1789	F: ACCTCTCCTTTTTCTCGCCTT R: GTCAGAGAAGAGGCCGGGTC	9	68,1	7	0,79	0,12	0,65
umc1634	F: GTAGCCTGCAAAACATCCAAGAAC R: TCCGTTGAGGACACTCGAATTTAT	9	63,5	6	0,68	0,08	0,31
umc1743	F: GAGAGGAGGAGCTTCACGAGC R: TGGACTTCGAAAATTCTCTTCAGC	9	60,8	8	0,85	0,66	0,39

G.L.: Grupo de Ligação; Ta: Temperatura de Anelamento; H_E: Heterozigose Esperada; H_O: Heterozigose Observada e PIC: Conteúdo Polimórfico de Informação.

Sobre a amostra total de linhagens, 24 genótipos, foi gerado um total de 204 alelos, indicando alto grau de polimorfismo, Tabela 13, com um número de locos variando entre três e nove, e média de alelos por loco igual a seis. Observa-se que o número de alelos por loco encontrado foi muito alto, porém, de acordo com GAUT & DOEBLEY (1997) e SOLTIS & SOLTIS (1999), o milho sempre foi considerado um organismo diploide, mas, atualmente, por meio de várias abordagens citogenéticas e moleculares, sabe-se que tal organismo tem origem poliploide e que, ao longo do tempo, com sua domesticação, sofreu um extensivo rearranjo cromossômico.

Em todos os locos, os valores da heterozigosidade observada (H_O) foram baixos e inferiores aos valores da heterozigosidade esperada (H_E), uma vez que tal estimativa é feita tomando-se como base uma população em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A H_E variou de 0,34 (umc 1328) a 0,89 (gln4), apresentando uma média de 0,71, enquanto a H_O variou de 0 (umc2145-r2, umc1108, ole1, umc1594, umc1135, umc1899, umc1775, umc1325 e umc1268) a 0,70 (umc2152), apresentando média de 0,16. O valor nulo de tal estimativa está relacionado ao valor unitário do índice de fixação (F), representando 26,47% dos locos analisados. Para os demais locos, também foi observado alto índice de fixação, fato este que pode estar diretamente ligado ao baixo valor da H_O . Laborda et al. (2005), em trabalho com 85 locos utilizando SSR testados em 85 linhagens de milho tropical mantidas por várias gerações de autofecundações, também encontraram resultados semelhantes, em que 96% dos locos analisados apresentaram presença de heterozigose, sendo que apenas cinco locos apresentaram alta frequência de heterozigotos.

Assim como a heterozigose, o conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) também pode ser utilizado para averiguar a magnitude do polimorfismo genético de cada loco. O maior valor de PIC foi encontrado para o loco umc1974 (0,82), e o menor, para o loco umc1634 (0,31), com média de 0,66. Tais valores mostram que o loco umc1974 possui um maior poder discriminatório entre os outros locos analisados devido ao maior número de alelos encontrados para aquela determinada região genômica.

Segundo Ott (1992), um loco será considerado polimórfico quando $H_O \geq 0,1$, que corresponde, aproximadamente, à situação em que o alelo mais frequente tem frequência menor que 0,95, e altamente polimórfico quando $H_O \geq$

0,7. Verifica-se na Tabela 13 que, embora o loco umc1974 não apresente um $H_0 \geq 0,1$, assim como o loco umc1073 possui um PIC elevado, ele é considerado um loco polimórfico.

O índice de Shannon-Wiener, também conhecido como índice de Shannon-Weaver, é um índice bastante utilizado em estudos ecológicos quando se deseja avaliar a biodiversidade dentro de uma área, ou seja, a riqueza das espécies. No entanto, este índice tem sido empregado especificamente em estudos genéticos como uma medida de diversidade dentro da população e se assemelha a um índice de riqueza genotípica (Holcomb et al., 1977; Picoli et al., 2004). Este índice nos diz que quanto mais próxima estiver a estimativa do valor unitário, maior será a divergência dentro das populações analisadas.

Observa-se que para tal índice, considerando todos os genótipos, os valores variaram de 1,42 a 1,95 (Tabela 14). O valor médio de 1,73 revelou que existe grande variabilidade dentro das populações, suficiente para dar continuidade ao programa de melhoramento. Quando consideramos as duas populações separadamente, “FLINT” e “Dent”, percebemos que houve uma pequena diferença na magnitude das estimativas, sendo que a média para o grupo “Dent” foi de 1,75, com valor mínimo de 1,60 (L3br-D) e valor máximo de 1,88 (C. Bulk-D), e para o grupo “FLINT”, a média foi de 1,71, com o valor mínimo de 1,42 (L26-FC) e valor máximo de 1,95 (L159-F).

As estimativas da heterozigose entre os genótipos mostraram que os valores esperados foram maiores que os observados para todos os genótipos, sendo que a média da heterozigose observada foi de 0,16, enquanto a média da heterozigose esperada foi de 0,80. Tal fato já era de se esperar, pois a estimativa da heterozigose esperada é feita levando-se em consideração uma população em equilíbrio de Hardy & Weinberg, enquanto a heterozigose observada é estimada levando-se em consideração os locos analisados das linhagens. As estimativas de heterozigose esperada variaram de 0,68 (L26-FC) a 0,86 (L159-F), enquanto a observada variou de 0,03 (L26-FC) a 0,34 (C. Bulk-D) (Tabela 14). Segundo Oliveira et al. (2010), tais estimativas reduzidas da heterozigose observada muito reduzida podem ser resultado de alelos nulos, uma vez que se trabalhou com marcadores codominantes, porém, é um problema que pode ser contornado com a utilização de um grande número de marcadores.

Tabela 14 - Descrição dos genótipos avaliados e respectivos valores da heterozigose observada (H_O), heterozigose esperada (H_E), Índice de Shannon (I) e coeficiente de endogamia (F).

Genótipos	H_O	H_E	I	F
L29-FC	0,13	0,83	1,82	0,84
L26-FC	0,03	0,68	1,42	0,95
L23-FC	0,14	0,80	1,76	0,8
L41-FC	0,08	0,79	1,67	0,89
L25A-FC	0,30	0,83	1,86	0,63
L36-FC	0,09	0,82	1,80	0,88
L10B-F	0,18	0,77	1,49	0,76
L35-FC	0,08	0,83	1,85	0,89
L33-FC	0,06	0,76	1,54	0,92
L48-FC	0,12	0,79	1,68	0,84
L159-F	0,25	0,86	1,95	0,71
L5-DP	0,06	0,80	1,65	0,92
L13-DP	0,09	0,81	1,73	0,88
L10A-DP	0,10	0,82	1,71	0,88
L15-DP	0,16	0,79	1,72	0,79
L22-DP	0,16	0,79	1,66	0,80
L3br-D	0,17	0,77	1,60	0,78
L2-DP	0,05	0,80	1,74	0,92
L14-DP	0,20	0,81	1,76	0,74
L8-DP	0,17	0,82	1,83	0,79
B73-D	0,27	0,82	1,76	0,67
C. Bulk-D	0,34	0,84	1,88	0,59
L1032-DP	0,33	0,82	1,86	0,60
L6-DP	0,26	0,83	1,86	0,68
Média	0,16	0,80	1,73	0,80
Índice de Shannon “Flint” (FC e F)		Média: 1,71	Mínimo: 1,42	Máximo: 1,95
Índice de Shannon “Dent” (DP e D)		Média: 1,75	Mínimo: 1,60	Máximo: 1,88

Quando são comparados os grupos heteróticos separadamente, constata-se que a média da heterozigose observada para o grupo “FLINT” foi de 0,13, enquanto o grupo “Dent” apresentou média de 0,18. Tal evento pode ser explicado pelo fato de o grupo “Dent” conter um maior número de indivíduos, cuja origem não se sabe ao certo, portanto, não se pode afirmar quais são suas características no que diz respeito à sua estrutura genética, caso das linhagens L3br, B73 e o C. Bulk. Também tem o fato de a linhagem L6 estar na geração S5, aumentando a probabilidade de encontrar locos em heterozigose.

Segundo Weir (1996), a frequência de heterozigotos é uma maneira de representar a existência de variabilidade genética, desde que contenham diferentes alelos. Porém, há situações em que a variação é resultante da presença contínua de diferentes locos em homozigose, a exemplo das populações submetidas a vários processos de autofecundação.

O coeficiente de endogamia (F) é um dos parâmetros mais importantes em genética de populações, pois ele mede o balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações. Quando os cruzamentos, em uma população, ocorrem entre indivíduos aparentados, chama-se a este padrão de acasalamento de endogamia (Falconer, 1987; Hartl & Clark, 1997). Tal estimativa é obtida pela soma do numerador com o denominador, separadamente, obtendo-se o quociente a partir dessas duas somas (Lewis & Zaykin, 2002).

De acordo com a Tabela 14, pode-se verificar que o índice de fixação variou de 0,59 (C. Bulk-D) a 0,95 (L26-FC), com média de 0,80. Os valores elevados dos índices já eram esperados, uma vez que se trata de linhagens. A análise do índice de fixação entre os indivíduos pertencentes aos dois grupos heteróticos mostrou um valor médio para o grupo “Flint” de 0,83, tendo sido observado valor máximo de 0,95 (L26-FC) e mínimo de 0,63 (L25A-FC), enquanto para o grupo “Dent”, foi observada média de 0,77, sendo que o valor máximo observado foi de 0,92 (L5-DP) e o valor mínimo, de 0,59 (C. Bulk-D). Da mesma forma, nota-se que o nível de homozigose das linhagens também apresentou valores elevados, Figura 2, que variaram de 97% (L26-FC e L5-P) a 65,6% (C. Bulk-D), com média de 83,62%.

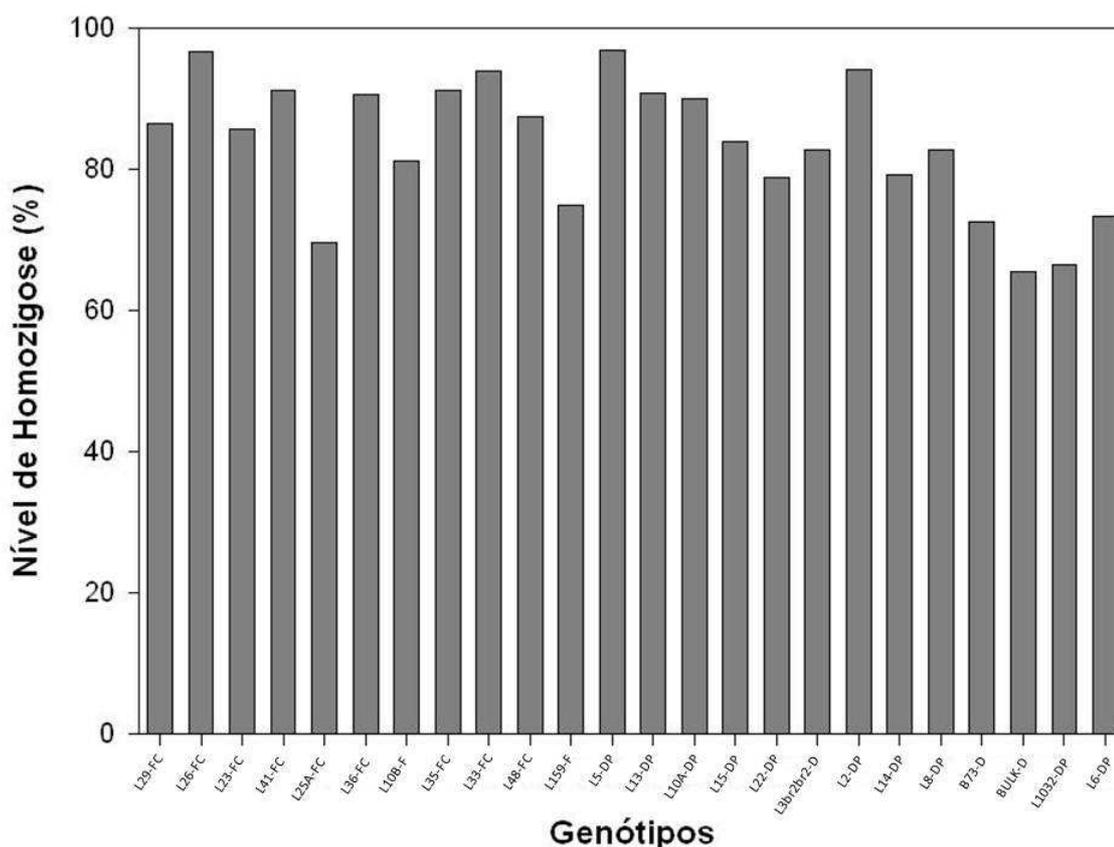


Figura 2 – Nível de homozigose (%) das 24 linhagens utilizadas no topcross.

Segundo Kageyama et al. (2003), a explicação para populações ou espécies que contêm maior número de locos em homozigose e menor em heterozigose deve estar associada ao sistema reprodutivo e, ou, à deriva genética, pois o principal efeito da endogamia é diminuir a heterozigosidade da população quando comparada à heterozigosidade esperada.

Neste trabalho, a causa do elevado nível de homozigose se deve ao fato de termos trabalhado com linhagens submetidas a vários ciclos de autofecundação, aumentando, assim, o número de locos em homozigose e, conseqüentemente, diminuindo os locos em heterozigose.

A análise de variância molecular (AMOVA) é uma metodologia capaz de estimar a diversidade entre e dentro de populações a partir de dados moleculares e também de testar hipóteses a respeito das medidas de diversidade (EXCOFFIER et al., 1992).

De acordo com a Tabela 15, percebe-se que houve predominância da variação dentro dos grupos heteróticos (“Flint” e “Dent”), sendo que tal estimativa representa 91,41% da variação total dos indivíduos, enquanto o restante da

variação (8,59% da variação total) ficou a cargo da variação entre os grupos heteróticos, ou seja, apesar de se trabalhar com grupos heteróticos distintos, foi observada maior variabilidade nos indivíduos dentro dos grupos quando se comparam os grupos separadamente.

Tabela 15 – Análise de variância molecular e porcentagem da variância entre e dentro de grupos de Linhagens “Flint”(FC e F) e “Dent”(DP e D).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Variância Estimada	Porcentagem de Variância Molecular
Entre Grupos	1	3,0361	3,0361	0,1346	8,59%
Dentro dos Grupos	22	31,5112	1,4323	1,4323	91,41%
Total	23	34,5473		1,5669	100 %

Em um trabalho visando a validar um subgrupo Dentado da coleção do núcleo do Banco Ativo de Germoplasma de Milho da Embrapa Milho e Sorgo utilizando técnicas de marcadores moleculares, Netto et al. (2010) também encontraram maior porcentagem de variação dentro (80,35%) das coleções, evidenciando alta variabilidade entre os acessos.

Já em outro trabalho, Almeida (2003), com o objetivo de estimar a variabilidade genética entre e dentro de populações de milho e teosinte através de marcadores moleculares, utilizando iniciadores SSR associados com genes envolvidos em rotas bioquímicas de metabolismos básicos fisiológicos, detectou que 56% da variação total foi observada entre populações e que apenas 11,5% da variação se situa entre os indivíduos dentro de cada população.

A análise da estrutura genética das linhagens envolvidas no topcross também teve o auxílio do aplicativo computacional *Structure* (Figura 3).

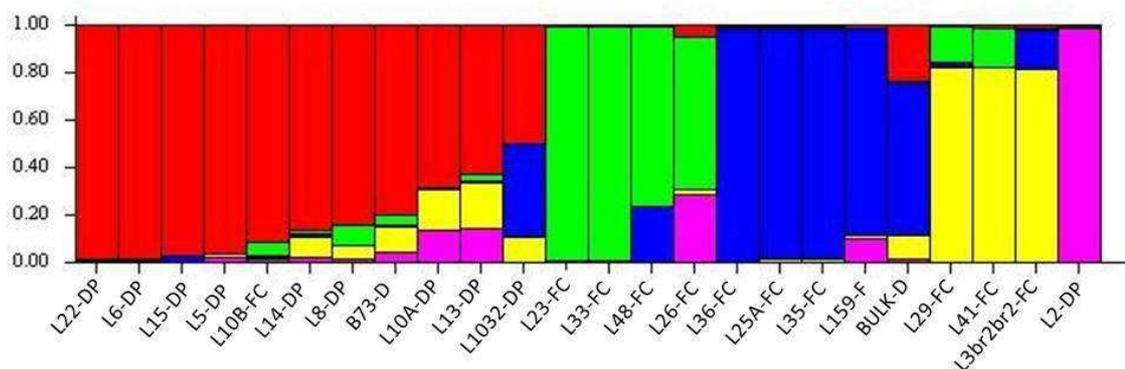


Figura 3 – Análise da estruturação genética das 24 linhagens de milho de diferentes grupos heteróticos (“Dent” e “FLINT”).

Observa-se que a análise evidencia distinção dos grupos heteróticos no que diz respeito aos locos analisados, uma vez que este aplicativo nos informa quais indivíduos compartilham uma mesma região genômica. De acordo com a análise, nota-se também que o grupo heterótico Dentado se apresentou com menor variabilidade no que diz respeito à estrutura genômica, formando um grupo homogêneo (vermelho) em relação ao grupo “Flint”, que, por sua vez, apresenta maior variabilidade causada por um maior número de regiões genômicas compartilhadas entre os indivíduos dentro deste grupo. Nota-se que a linhagem L2-DP e C. Bulk, ambos pertencentes ao grupo Dentado, também compartilha regiões genômicas pertencentes ao grupo “Flint” para os locos analisados, e o contrário também ocorre quando se observa a Linhagem L10B-FC.

Ramos et al. (2011), em trabalho com gerações de retrocruzamento em mamoeiro, constataram que gerações avançadas de retrocruzamento apresentaram maior nível de hibridação na estrutura dos indivíduos, porém, grande parte compartilhada com o genitor recorrente.

Através da análise de agrupamento com base na média das distâncias entre todos os pares de genótipo (UPGMA), Figura 4, foi observado que a distância de 0,37 foi suficiente para separar os genótipos avaliados em três grupos distintos. O primeiro grupo (azul) ficou composto basicamente por linhagens pertencentes ao grupo “Dent”, com exceção da linhagem L10B-F, enquanto que no segundo grupo (vermelho), as linhagens pertencentes ao grupo “Flint”, também permaneceram no mesmo grupo, com exceção da linhagem L2-DP. Já para o terceiro grupo, foi detectada somente a linhagem L159-F. O fato de as linhagens L10B-F e L2-DP terem sido consideradas contaminantes, segundo o

dendograma, pode estar relacionado com o fato de a linhagem L10B-F não ter uma origem definida, ou seja, não ser uma linhagem originada do programa de seleção recorrente recíproca da UENF. Já o fato de a linhagem L2-DP também não se agrupar dentro do conjunto de genótipos que era de se esperar, também pode ser explicado por tal genótipo compartilhar um grupo específico de locos pertencentes ao grupo “Flint” e “Dent”, como evidenciado pela análise da estrutura genética (Figura 3). Embora a linhagem L159-F compartilhe de um grupo de locos específicos pra o grupo “Flint” e ”Dent”, Figura 3, o dendograma, Figura 4, mostra que tal genótipo foi alocado em um grupo diferente dos demais. O fato de este genótipo também não ter origem no programa de seleção recorrente recíproca também confirma o resultado obtido através do dendograma.

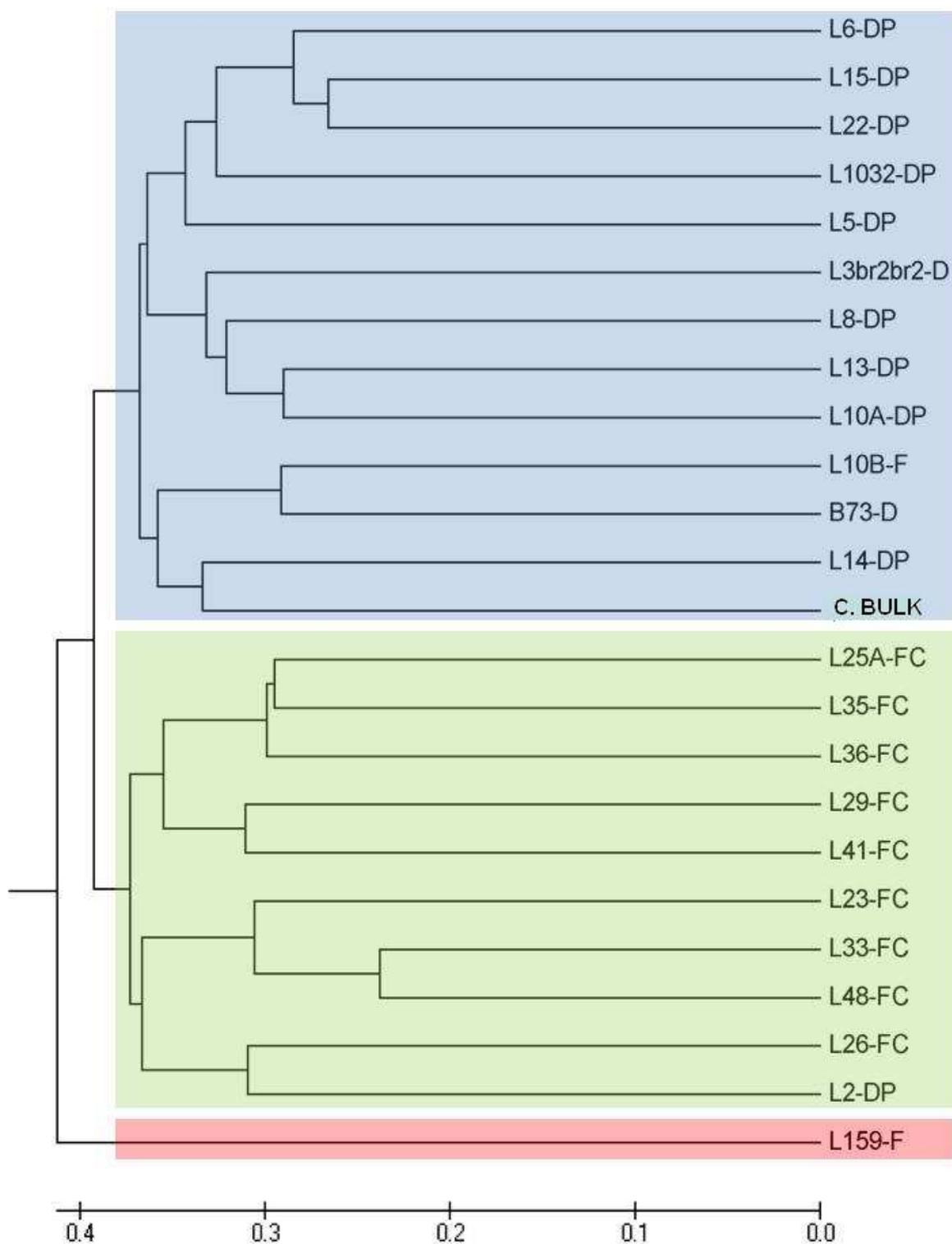


Figura 4 – Dendrograma de dissimilaridade obtido com base nas médias das distâncias (UPGMA), ilustrando a relação genética entre 24 linhagens pertencentes a 2 grupos heteróticos distintos (“Flint” e “Dent”).

A técnica de dispersão gráfica via PCA (*Principal Coordinate Analysis*) também foi utilizada para comparar as relações genéticas dos genótipos

avaliados (Figura 5). As duas coordenadas explicaram 43,70% da variação total dos dados: 25,44% dessa variação é explicada pela coordenada 1 e 18,26%, explicada pela coordenada 2. Os resultados obtidos com esta análise confirmam aqueles apresentados no dendograma, Figura 4, ficando clara a separação dos genótipos em dois grupos.

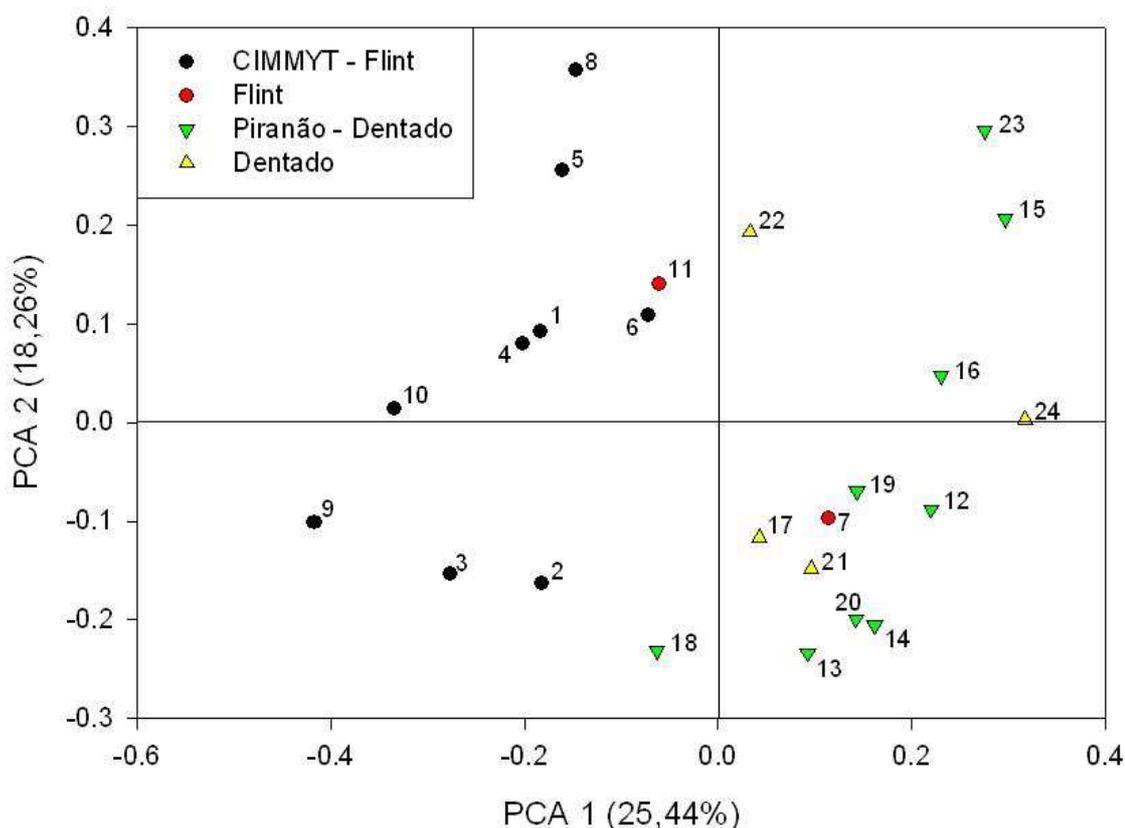


Figura 5 – Análise das Coordenadas Principais, considerando 24 Linhagens de Milho pertencentes a 2 grupos heteróticos (“Flint” e “Dent”), com base na matriz de distância obtida pelas análises dos marcadores microssatélites.

Ainda em relação à dispersão gráfica, nota-se que os grupos heteróticos mostraram grande variabilidade, confirmando o que foi apresentado na análise de variância molecular (AMOVA), em que houve uma predominância da variação dentro dos grupos heteróticos.

Segundo Pinto et al. (2001), tanto a análise de coordenadas principais como a análise de agrupamento (dendograma) podem gerar dúvidas na alocação de linhagens aos seus grupos heteróticos e que, na análise das coordenadas principais, geralmente são utilizadas as três primeiras coordenadas, que podem não conter a maior parte da variação, e no dendograma podem ocorrer dificuldades na interpretação. Dessa forma, utilizando em conjunto as duas metodologias, as chances de ocorrerem dúvidas nas alocações das linhagens em

seus respectivos grupos heteróticos diminuem. Portanto, para obter um resultado mais preciso, é necessária a utilização dos dois métodos.

Trabalho conduzido pelo mesmo autor, com o objetivo de avaliar 18 linhagens S3 de milho em cruzamentos dialélicos interpopulacionais e alocá-los em grupos heteróticos distintos, verificou que as linhagens pertencentes às populações BR-105 (“Flint”) e BR-106 (“Dentado”) foram alocadas em quatro grupos heteróticos distintos, sendo dois grupos formados somente por linhagens da população BR-105 e outros dois grupos formados por linhagens da população BR-106.

Guimarães (2011), trabalhando com populações segregantes (“Flint” e “Dent”) de milho visando à extração de linhagens, também observou separação das duas populações plotadas no gráfico de dispersão.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve por objetivo identificar e selecionar linhagens que possuam boa capacidade específica de combinação (CEC) e boa capacidade geral de combinação (CGC), além de medir a divergência genética entre linhagens de diferentes grupos heteróticos, utilizando marcadores microssatélites. Cada grupo de linhagens (“Flint” e “Dent”) foi cruzado com dois testadores: um de base ampla, que permite inferir sobre a capacidade geral de combinação (CGC), e um de base estreita, que permite inferir sobre a capacidade específica de combinação (CEC). Os testadores utilizados para as linhagens do grupo “Dent” são a linhagem L 159 br e uma variedade, ambos pertencentes ao grupo “Flint”, que testam para CEC e CGG, respectivamente. Para as linhagens do grupo “Flint”, os testadores utilizados são a linhagem L6 e uma variedade, ambas pertencentes ao grupo “Dent”, que também testam para CEC e CGG, respectivamente. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições, com 46 tratamentos: 44 híbridos Topcrosses e duas testemunhas comerciais (BR106 e UENF 508-8). Cada parcela foi constituída por uma linha de cinco metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,9 metros e cinco sementes por metro linear, totalizando 25 plantas por parcela. Foram avaliadas 12 características de interesse agrônômico nos híbridos obtidos via Topcross, incluindo, entre estas características, Rendimento de grãos (REND), Peso de espiga

despalhada (PED), Número de plantas por parcela (NP) e Número de espigas por parcela (NE), entre outras. Para análise molecular, foram utilizados 34 primers SSR-ESTs com base no seu grau de polimorfismo e na qualidade de amplificação. Para análise dos dados morfoagronômicos, a fonte de variação genótipos foi desdobrada a fim de separar os grupos de híbridos de acordo com cada testador de cada grupo heterótico (híbridos Topcrosses do grupo “Flint” e híbridos Topcrosses do grupo “Dent”, ambos testando para base ampla e estreita, e a interação entre eles) e verificar a diferença significativa entre os grupos. Além disso, foi testada a capacidade específica e geral de combinação para cada grupo de testador utilizado. Para a análise molecular, inicialmente foram feitas uma análise molecular de variância (AMOVA), coordenadas principais (PCA), e uma análise de agrupamento via UPGMA a fim de verificar a variabilidade dos genótipos entre e dentro dos grupos heteróticos. Posteriormente, foi estimada a Heterozigosidade Esperada (H_E) e observada (H_O) para o grupo de genótipos em questão, além do Índice de Shannon (\mathcal{I}), Nível de homozigose, coeficiente de endogamia (F) e estrutura genética das linhagens.

Com base nos dados obtidos, observou-se separação das linhagens de acordo com os seus respectivos grupos heteróticos. A AMOVA apontou existência de variabilidade genética dentro dos grupos, confirmando os dados obtidos na análise morfoagronômica (ANOVA). Pelos dados obtidos, podemos concluir que:

1. O desempenho agrônômico dos híbridos topcrosses obtidos está pareado com o das testemunhas comerciais.
2. Observou-se baixa correlação entre as linhagens *per se* e os híbridos topcrosses.
3. Os híbridos topcrosses avaliados apresentaram alta variabilidade para as características diretamente ligadas à produção.
4. Os 34 locos analisados foram suficientes para conseguir discriminar as linhagens em seus respectivos grupos heteróticos (“Flint” e “Dent”).

5. Os parâmetros de diversidade genética indicaram que os genótipos avaliados são altamente divergentes entre si, além de a maioria dos locos analisados dos genótipos se encontrar em homozigose.
6. De acordo com as estimativas da capacidade combinatória, para o Colégio agrícola, as linhagens que apresentaram maior CGC do grupo “Dent” foram a L14 e L2 e para o grupo “Flint”, as melhores linhagens foram a L41, L26 e L36. Já para a CEC, as melhores linhagens do grupo “Dent” foram a L3br²br², B73, L13, L10A, L15 e L14 e para o grupo “FLINT”, foi a L36.
7. Em Itaocara, a linhagem L10A foi a que apresentou maior CGC do grupo “Dent” e para o grupo “Flint”, as melhores linhagens foram a L48 e L41. Já para a CEC, as melhores linhagens do grupo “Dent” foram L3br, L5, L13 e L10A e para o grupo “Flint”, foram as linhagens L33, L41 e L10B.
8. Nota-se que a L41, além de possuir uma boa CGC, também possui uma boa CEC para os dois ambientes, o que evidencia seu alto valor genético, ou seja, esta linhagem apresenta um bom comportamento em combinações híbridas para o grupo “Flint”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C. C. de S. *Análise citogenética e molecular em milho (Zea mays subsp. mays), teosinto (Zea mays subsp. mexicana) e em seus híbridos*. 2003. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- Allison, J. C. S., and R. W. Curnow. 1966. On the choice of tester parent for the breeding of synthetic varieties of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6:541–4.
- Amorim, E.P.; Souza, J.C. Híbridos de milho inter e intrapopulacionais obtidos a partir de populações S0 de híbridos simples comerciais. *Bragantia*, Campinas, v.64, n. 3, p.561-567, 2005.
- Barbosa-Neto, J. F.; Bered, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas: In: MILACH, S. C. K. (Ed.) *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 29-40.
- Bastos, I. T.; Barbosa, M. H. P.; Cruz, C. D.; Burnquist, W. L.; Bressiani, J. A.; SILVA, F. L. da. Análise dialélica em clones de cana-de-açúcar. *Bragantia*, Campinas, v. 62, n. 2, p. 199-206, abr./jun. 2003.

- Bered, F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. *Genética, para que te quero?* Porto Alegre: Ed. UFRGS, p. 99-104, 1999.
- Blair, M. W.; Pedraza, F.; Buendia, H. F.; Gaitan-Solis, E.; Beebe, S. E.; Gepts, P.; Tohme, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 107, p. 1362-1374, 2003.
- Borém, A.; Caixeta, E.T. *Marcadores Moleculares*. 2ª Ed, Viçosa, MG, 2009, 532p.
- Bornet, B.; Branchard, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. V. 19, p. 209-215, 2001.
- Brammer, S. P. *Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha em cultivares brasileiras de trigo (Triticum aestivum L. em Thell)*. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2000.
- Bull, L. T. (1993) Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 301 p.
- Castellanos, J. S.; Hallauer, A. R. Cordova, H. S. Relative performance of testers to identify elite lines of corn (*Zea mays* L.) *Maydica*, v. 43, n. 03, p. 217-226, 1998.
- Coimbra, R. R. *Seleção entre famílias de meios irmãos da população DFT-1 Ribeirão de milho-pipoca. 2000. 54 f.* Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.
- Comstock, R.E.; Robinson, H. F. (1948) The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics*. 4:254-266.

CONAB (2008) Acompanhamento da safra da brasileira de grãos 2008/2009 – Primeiro levantamento. Disponível em http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf. Acesso em 20 de Dezembro. 2011.

CONAB (2010) Sexto levantamento da safra de grãos 2010/2011 Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_11_10_11_28_48_boletim_portugues_-_nov_de_2010..pdf Acesso em 20 de Fevereiro. 2011.

CONAB (2012) Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012 – Quarto Levantamento - Janeiro/2012. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_10_10_53_02_boletim_graos_4o_levantamento.pdf Acesso em 20 de Fevereiro. 2012.

Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. UFV, 2001. 390p.

Cruz, C. D.; Regazzi, A. J.; Carneiro, P. C. S. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. v. 1.

Cruz, C. D. (2008) *Programa GENES: Diversidade genética*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Gabriel, A. P. C. *Melhoramento de milho: seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos-completos*. 2006. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.

Griffing, B.A. (1956). Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austr. J. Biol. Sci.* 9: 463-493.

Davis, R.L. Report of the plant breeder. *Puerto Rico Agricultural Experimental Station Annual Reporter*, Puerto Rico, p.14-15, 1924.

- Duarte, I. A.; Ferreira, J. M.; Nuss, C. N. Potencial discriminatório de três testadores em top crosses de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.3, p.365-372, mar.2003.
- Eberhart, S.A.; Salhuana, W.; Sevilla, R.; Taba, S. Principles for tropical maize breeding. *Maydica, Bergamo*, v. 40, p. 339-355, 1995.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2002. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>. Acesso em 02/01/2011.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics, Baltimore*, v. 131, p. 479-491, 1992.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics .Online*. 1: 47-50. 2005.
- Fancelli, A. L.; Dourado Neto, D. Produção de milho. *Guaíba: Agropecuária*, 2000. p. 97-146.
- Falconer, D.S. (1987). *Introdução à genética quantitativa*. Viçosa: Editora UFV, 279p.
- Ferreira, E. A. et al. Desempenho de híbridos top crosses de linhagens S3 de milho em três locais do Estado de São Paulo. *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 2, p. 319- 327, 2009.
- Freitas Júnior, S.P. (2008) *Seleção recorrente entre famílias de irmãos completos em geração avançada da população UNB-2U de milho-pipoca*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Campos dos Goytacazes - RJ, UENF, 96p.

- Gama, E. E. G.; Marriel, I. E.; Guimarães, P. E. O.; Parentoni, S. N.; Santos, M. X.; Pacheco, C. A. P.; Meireles, W. M.; Ribeiro, P. H. E.; Oliveira, A. C. Capacidade de combinação para uso de nitrogênio de um grupo de linhagens selecionadas de uma população de milho tropical. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 68-77, 2002.
- Gaut, B.S.; Doebley, J.F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Washington, v. 94, p. 6809-6814. 1997.
- Gomes, M. S. (1999) *Heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho*. Tese de mestrado em produtividade Vegetal. Lavras: UFLA. 78p.
- Guimarães, Lauro José Moreira ; MENDES, FF ; Guimarães, PEO ; Parentoni, S.N. ; Pacheco, CAP ; Machado, JRA ; Gomes, PHF ; Oliveira, KG ; Reis, DP ; Tavares, RB . Definição de grupos heteróticos de populações de milho por análise gráfica. In: *6º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2011, Búzios. 6º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2011*.
- Gupta M.; Chyi, Y.-S.; Romero-Severson, J.; Owen, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single *primers* of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998–1006, 1994.
- Hallauer, A.R.; Lopez-Perez, E. Comparisons among testers for evaluating lines of corn. *Proceedings of Annual Hybrid Corn Industry Research Conference*, Chicago, v. 34, p. 57 - 75, 1979.
- Hallauer, A. R. 1975. Relation of gene action and type of tester in maize breeding procedures. *Annu. Corn Sorghum Res. Conf. Proc.* 30:150–65.
- Hallauer AR, Miranda Filho JB AND Carena MJ (2010) *QUANTITATIVE GENETICS IN MAIZE BREEDING*. SPRINGER, NEW YORK, 663P.

- Hartl, D. L.; Clark, A. G. Principles of Population Genetics. 3rd edition. Sunderland (MA): *Sinauer Associates*, 1997. 542 p.
- Holcomb, J.; Tolbert, D. M.; Jain, K. A diversity analysis of genetic resources in rice. *Euphytica*. v. 26, p. 441-449, 1977.
- Johnson, I. J., and H. K. Hayes. 1936. The combining ability of inbred lines of Golden Bantam sweet corn. *J. AM. SOC. AGRON.* 28:246–52.
- Kageyama, P. Y.; et al. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis*. v. 64, p. 93-107, 2003.
- Kumar, S.; Nei, M.; Dudley, J.; Tamura, K. (2009) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 9: 299-306.
- Laborda, P.R.; Oliveira, K.M.; Garcia, A.A.F.; Paterniani, M.E.A.G.Z.; Souza, A.P. Tropical maize germoplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? *Theoretical and Applied Genetics*, v.111, p.1288–1299, 2005.
- Lewis, P. O; Zaykin, D. GDA - Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. 2002. Disponível em: <<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. Acesso em: 26 nov. 2011.
- Liu, K.; Muse, S. V. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128–2129.
- Litt, M.; Luty, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics*, v. 44; p. 397-401, 1989.

- Lonquist, J. H.; Lindsey, M. F. Topcross versus S1 line performance in corn (*Zea mays* L.). *Crop Science, Madison*, v. 4, p. 580-584, 1964.
- Luna, S. S.; Figueroa, J.; Baltasar, B.; Gomes, R.; Townsend, R.; Schoper, J.B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for 84 effective pollen control. *Crop Science, Madison*, v.41, n. 5, p. 1551-1557, Sept./Oct. 2001.
- Marcos Filho, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ, 2005.
- Matzinger, D. F. 1953. Comparison of three types of testers for the evaluation of inbred lines of corn. *Agron. J.* 45:493–5.
- Miranda Filho, J.B.; Viégas, G.P. Milho Híbrido. In: Paterniani, E.; Viégas, G.P. (Eds.) *Melhoramento e produção do milho*. 2 ed. Campinas, Fundação Cargill, 1987. p.277-340.
- Mittelman, A. *Variação genética para qualidade nutricional em milho com endosperma normal*. 2001. 93 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Morera, J.A. Comparison of two breeding methods in corn. In effect of breeding method on combining ability of third-cycle lines. *Turrialba, San Jose*, v. 39, n. 1, p. 63-68, jan.-mar., 1989.
- Muthusamy, S. Kanagarajan, S. Ponnusamy, S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology, Valparaíso – Chile*, n.3, V.11, 2008.
- Netto, D., Souza, I., Oliveira, A.. Validação da Coleção Núcleo de Milho Brasileira Subgrupo Endosperma Dentado. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo, América do Norte*, 8, may. 2010. Disponível em:

<http://rbms.cnpms.embrapa.br/index.php/ojs/article/view/288>. Acesso em: 08 Feb. 2012.

- Nurmburg, P.L.; Souza, J.C.; Ramalho, M.A.P.; Ribeiro, P.H.E. Desempenho de híbridos simples como testadores de linhagens de milho em top crosses. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS*, 1., 2000, Goiânia. Resumos... (CD-Rom)
- Ott, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*. v.51, p.283-290, 1992.
- Padilha, L. *Marcadores moleculares semiautomatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical*. 2002. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Paterniani, E., Miranda Filho, J.B. Melhoramento de populações. In: Paterniani, E., Viegas, G.P. (Eds.). *Melhoramento e produção de milho*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.1, p.217-264.
- Paterniani, E.; Nass, L. L.; Santos, M. X. O valor dos recursos genéticos do milho para o Brasil. In: UDRY, C. V.; DUARTE, W. Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos. Brasília: *Paralelo 15*, 2000. p. 1-41.
- Peakall, R.; Smouse, P. (2009) GenAIEx Tutorials – Part 1: Introduction to Population Genetic Analysis. *Australian National University*, Australia.
- Picoli, E. A. T.; et al. Influence of RAPD number of markers and sample size on Eucalyptus genetic distance and diversity. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. v.4, p. 384-390, 2004.
- Pinto, R. de M.C.; Garcia, A.A.F.; Souza Júnior., C.L. de Alocação de linhagens de milho derivadas das populações BR-105 e BR-106 em grupos heteróticos. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 541-548, jul./set. 2001.

- Ramos, H. C. C.; Pereira, M. G.; Gonçalves, L. A. G.; Pinto, F. O.; Silva, F. F.; Amaral Júnior, A. T. (2011c) Comparison of multiallelic distances on the genetic diversity quantification in papaya. *Acta Scientiarum*, 33: 59-66.
- Raposo, F. V. *Seleção recorrente recíproca em populações derivadas de híbridos simples de milho*. 2002. 106f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) –Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras.
- Ratnaparkhe, M. B.; Tekeoglu, M.; Muehlbauer, F. J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 97, n. 4, p. 515-519, 1998.
- Rawlings, J. O., and D. L. Thompson. 1962. Performance level as criterion for the choice of maize testers. *Crop Sci.* 2:217–20.
- Reedy, M.P; Sarla, N. Reedy, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application plant breeding. *Euphytica*, v. 128, p 09 – 17, 2002.
- Rojas, B.A.; Sprague, G.F. A comparison of variance components in corn yield trials. III. General and specific combining ability and their interaction with location and years. *Agronomy Journal, Madison*, v.44, p. 462-466, 1952.
- Santos, M. X.; Pollak, L. M.; Carvalho, H. W. L.; Pacheco, C. A. P.; Gama, E. E. G.; Guimarães, P. E. de O.; Andrade, R. V. Heterotic responses of tropical elite maize accessions from Latin America with Brazilian testers. *Scientia Agricola, Piracicaba*, v. 58, n. 4, p. 767-775, 2001
- Singh, S. P.; Gepts, P.; Debouck, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Fabaceae*). *Economic Botany*, New York, v. 45, n. 3, p. 379-396, 1991.

- Smith, O.S. Covariance between line *per se* and testcross performance. *Crop Science, Madison*, v.26, n.3, p.540-543, May/June 1986.
- Soltis, D.E., Soltis, P. S. The dynamic nature of polyploidy genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, New York*, v. 92, p. 8089-8091. 1995. SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution, Oxford*, v.14, p. 348-352. 1999.
- Souza, E.D. *Divergência genética e avaliação de famílias S₁ e top crosses de milho, utilizando-se caracteres agronômicos e marcadores RAPD*. 2000. 88p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Souza, E.D.; Santos, J.B. dos; Carvalho, S.P. Avaliação de famílias s1 e top crosses de milho monitorada por meio de marcadores RAPD. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS*, 1., 2001, Goiânia, GO. *Resumo expandido...* Goiânia: Embrapa, 2001. [CD-Rom] A. Pailazul Multimídia.
- Souza, G.A. DE, Carvalho, M.R.O., Martins, E.R., Guedes, R.N.C.; Oliveira, L.O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.43, n.7, p.843-849, 2008.
- Souza Júnior, C.L. Seleção recorrente no melhoramento do milho. In: *SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS*, 9., 2005, Lavras. Anais. Lavras: UFLA, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, 2005. p.29-42.
- Souza Júnior, C.L. de; Pinto, R.M.C. Responses to a short-term reciprocal recurrent selection procedure in maize. *Maydica*, v.45, p.21-28, 2000.

- Song, Q. J.; Marek, L. F.; Shoemaker, R. C.; Lark, K. G.; Concibido, V. C.; Delannay, X.; Specht, J. E. A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 109, p. 122-128, 2004.
- Sprague, G.F.; Eberhart, S. A. Corn breeding. In: SPRAGUE, W. F. (Ed.). *Corn and Corn Improvement*. Madison: American Society of Agronomy, 1977. p. 335-336.
- Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Resources*, v.17, p. 6463-6471, 1989.
- Vencovsky, R. Herança quantitativa. In: Paterniani, E.; Viegas, G. P. (Ed.). *Melhoramento e produção do milho*. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 5, p.137-214.
- Vencovsky, R., Ramalho, M.A.P. Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: PATERNIANI, E. (ed.). *Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária*. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.57-89.
- Vencovsky, R.; Barriga, P. *Genética biométrica no fitomelhoramento*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486 p.
- Weir, B. S. *Genetic data analysis II. 2nd edition*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 1996. 445p.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- Wolfe, A.D. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzimology*, v. 395, p. 134 – 144, 2005.

- Wolfe, A. D.; LISTON, A. *Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology*. In: Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Doyle, J.J. (Ed.). *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Boston: Kluwer, p.43-86, 1998.
- Wu, K.; Jones, R.; Dannaeburger, L.; SCOLNIK, P.A. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acid Research*, v. 22: p. 3257-3258, 1994.
- Yeh, F. C.; Boyle, T.; Rongcai, Y.; Ye, Z.; Xiyan, J. M. (1999) *POPGENE. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis*. Version 1.31, Manual.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v. 20, p. 176-183, 1994.