

DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA EM
UM PAINEL SUL-AMERICANO

FERNANDA VARGAS VALADARES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2023

DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA EM
UM PAINEL SUL-AMERICANO

FERNANDA VARGAS VALADARES

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientador: Prof. Marcelo Vivas

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V136

Valadares, Fernanda Vargas.

Diversidade genética de linhagens de milho-pipoca em um painel sul-americano /
Fernanda Vargas Valadares. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

64 f.

Bibliografia: 38 - 47.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2023.

Orientador: Marcelo Vivas.

1. pré-melhoramento. 2. *Zea mays everta*. 3. fenotipagem. 4. genotipagem. 5.
endogamia. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA EM UM PAINEL SUL-AMERICANO

FERNANDA VARGAS VALADARES

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 27 de fevereiro de 2023.

Comissão Examinadora:



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



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



Prof. Geraldo de Amaral Gravina (D.Sc., Fitotecnia - Produção Vegetal) - UENF



Prof. Marcelo Vivas (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A Deus, à minha mãe
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que fez e faz em minha vida.

À minha mãe por toda dedicação, sem ela ter lutado como uma mulher guerreira eu não estaria aqui.

Ao meu esposo Alessandro, por todo apoio e suporte para que hoje eu aqui estivesse.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de qualificação profissional e pelas demais oportunidades que me proporcionou ao longo do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil, código de financiamento-001 pela concessão da bolsa e pelo aporte financeiro para condução dos experimentos.

Ao meu professor e orientador Marcelo Vivas por toda paciência, ensinamentos e pelo apoio em todo meu doutorado e nessa pesquisa.

Aos coorientadores, professora Helaine e professor Amaral, por todo apoio didático e profissional.

Aos professores, Monique e Geraldo, pelos ensinamentos ao longo do doutorado, e pela disponibilidade de fazerem parte da banca.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por todo ensinamento e dedicação.

Ao laboratório 225, o qual gostaria de deixar meu imenso agradecimento a Marcela e Fernanda

Aos amigos, os quais foram diversos ao longo dessa grande jornada, meu muito obrigada. Em especial gostaria de citar o meu amigo Rafael Nunes de Almeida, o qual me ajudou, apoiou e incentivou durante todo o doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. CAPÍTULOS	4
3.1.POTENCIAL MORFOAGRONÔMICO E DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A DOENÇAS DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA	4
3.1.1. INTRODUÇÃO	4
3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1.2.1. Milho-pipoca.....	6
3.1.2.2. Importância econômica.....	7
3.1.2.3. Caracterização morfoagronômica e resistência às doenças em milho-pipoca.....	8
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1.3.1. Descrição do material genético e delineamento experimental.....	10
3.1.3.2. Avaliação da ocorrência de doenças fúngicas visando a seleção das melhores linhagens.....	12
3.1.3.3. Avaliação de descritores morfoagronômicos para estudo da divergência.....	14

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1.5. CONCLUSÕES	23
3.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA	25
3.2.1. INTRODUÇÃO	25
3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.2.2.1. Melhoramento genético do milho-pipoca.....	27
3.2.2.2. Caracterização molecular.....	28
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.3.1. Material Vegetal.....	29
3.2.3.2. Extração e Quantificação de DNA.....	29
3.2.3.3. Reação de PCR e Eletroforese.....	31
3.2.3.4. Análise estatística.....	33
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.2.5. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
APÊNDICE	48

RESUMO

VALADARES, Fernanda Vargas; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2023; Diversidade genética de linhagens de milho-pipoca em um painel Sul-Americano; Orientador: D.Sc. Marcelo Vivas. Conselheiros: Prof. Antônio Teixeira do Amaral Junior e Prof.^a Helaine Christine Cancela Ramos.

No primeiro capítulo, o objetivo foi obter uma coleção de trabalho para o desenvolvimento de híbridos com elevada capacidade de expansão da pipoca e resistência a doenças fúngicas. As linhagens foram cultivadas em campo, em duas safras distintas, em ensaios de competição em delineamento de blocos casualizados dentro de sets com utilização de testemunhas comuns. O índice de ocorrência relativa de doença para as manchas foliares ocasionadas por *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis* e *Puccinia polysora* e, a podridão de espiga ocasionada por *Fusarium verticillioides*, a capacidade de expansão da pipoca (PE) e outros 13 caracteres agronômicos foram avaliados. As linhagens que apresentaram valores no quartil inferior para ao menos uma das doenças ou no quartil superior para capacidade de expansão da pipoca foram selecionadas. A partir dos dados para os demais caracteres agronômicos foram estimadas as matrizes de distância pelo método de Gower. Os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA. Foi possível selecionar 122 linhagens que apresentaram potencial para resistência a alguma das doenças ou ainda para maior PE. A divergência

fenotípica das linhagens selecionadas resultou em 11 grupos. A seleção de 122 linhagens para a coleção de trabalho manteve variabilidade suficiente para a produção de híbridos a partir de genitores contrastantes. Dos 11 grupos formados, cinco apresentaram linhagens com PE acima de 30 mg.g⁻¹, no entanto, ao utilizar linhagens desses grupos os melhoristas deverão se atentar para a possibilidade de redução de podridão de espigas devido aos elevados valores de fusariose observado para esses grupos. No segundo capítulo o objetivo foi realizar a caracterização molecular das 169 linhagens de milho-pipoca pertencentes ao Banco de Germoplasma da UENF. Foi realizada uma busca na literatura por *primers* SSRg e EST-SSR polimórficos e informativos. Tais linhagens foram genotipadas com um total de 16 marcadores moleculares e tendo como base a matriz numérica obtida pela atribuição de valores às marcas moleculares, foi gerada uma matriz de distâncias genéticas, possibilitando então obter estimativas como número de alelos e conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada e esperada. Para o estudo da divergência genética entre as 169 linhagens de milho-pipoca, foram utilizados dez marcadores gênicos e seis marcadores genômicos polimórficos. Para os 16 *locos* avaliados, foram identificados 34 alelos, tendo o número de alelos por *loco* variado de 2 a 3, com média de 2,12. Dos 16 *locos* microssatélites, 11 (68,75%) foram moderadamente polimórficos e 06 (31,25%) não apresentaram conteúdo informativo. O valor máximo de PIC observado foi de 0,466 para o *loco* UMC1221 e o menor valor foi atribuído ao *loco* UMC1474 (0,113). Por meio da análise do dendrograma foram obtidos sete grupos. Houve variabilidade genética entre os acessos de milho-pipoca analisados, demonstrando que há possibilidade de exploração dessa variabilidade para desenvolvimento de novas cultivares. A análise de cada linhagem permitiu a identificação de ausência de heterozigosidade, confirmando a alta homozigose esperada em genótipos endogâmicos. A utilização de um número maior de marcadores moleculares bem como estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão do germoplasma avaliado.

Palavras-chave: pré-melhoramento; *Zea mays everta*; fenotipagem; genotipagem; endogamia; coleção de trabalho.

ABSTRACT

VALADARES, Fernanda Vargas; D.Sc.; State University of North Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2023; Genetic diversity of popcorn lineages in a South American panel; Advisor: D.Sc. Marcelo Vivas. Advisors: D.Sc. Antônio Teixeira do Amaral Junior and D.Sc. Helaine Christine Cancela Ramos.

In the first chapter, the objective was to obtain a collection of work for the development of hybrids with high popping expansion capacity and resistance to fungal diseases. For this purpose, the lines were grown in the field, in two different seasons, in competition trials arranged in a randomized block design within sets using common controls. The relative disease occurrence index for leaf spots caused by *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis* and *Puccinia polysora* and ear rot caused by *Fusarium verticillioides*, popcorn expansion capacity (EP) and 13 other agronomic traits were evaluated. The lines that showed values in the lower quartile for at least one of the diseases or in the upper quartile for popcorn expansion capacity were selected. From the data for the other agronomic traits, the distance matrices were estimated by the Gower method. The genotypes were then grouped by the UPGMA method. It was possible to select 122 strains that showed potential for resistance to some of the diseases or even for greater PE. The phenotypic divergence among the selected lines the same divergence study resulted in 11

groups. The selection of 122 inbred lines for the working collection maintained enough variability for the production of hybrids from contrasting parents (different groups). Of the 11 groups formed, five had strains with PE above 30 mg.g⁻¹, however, when using strains from these groups, breeders should pay attention to the possibility of reducing ear rot due to the high values of fusariosis observed for these groups. In the second chapter, the objective was to carry out the molecular characterization of the 169 popcorn inbred lines belonging to the uenf germplasm bank. A search in the literature about polymorphic and informative SSR and EST-SSR primers was performed. Such strains were genotyped with 16 molecular markers and based on the numerical matrix obtained by assigning values to the molecular markers, a matrix of genetic distances was generated, thus making it possible to obtain estimates such as the number of alleles and information content polymorphic (PIC), and expected heterozygosity. To study the genetic divergence among the 169 popcorn inbred lines, ten gene and six polymorphic genomic markers were used. For the 16 evaluated loci, 34 alleles were identified, with the number of alleles per locus varying from 2 to 3, with an average of 2.125. Of the 16 microsatellite loci, 11 (68.75%) were moderately polymorphic and 6 (31.25%) had no informational content. The maximum PIC value observed was 0.466 for locus UMC1221 and the lowest value was attributed to locus UMC1474 (0.113). Through the analysis of the dendrogram, seven groups were obtained. There was genetic variability among the analyzed popcorn accessions, demonstrating that there is the possibility of exploiting this variability for the development of new cultivars. The analysis of each lineage allowed the identification of low heterozygosity, confirming the expected high homozygosity in inbred genotypes. The use of a larger number of molecular markers as well as additional studies are necessary to understand the evaluated germplasm.

Keywords: pre-breeding; *Zea mays everta*; phenotyping; genotyping; inbreeding; work collection.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da pipoca tem grande apelo internacional devido a sua grande aceitação popular, o que gera renda tanto no setor de produção do grão quanto na comercialização do produto final, ou seja, a pipoca estourada (Silva et al., 2019). Em relação ao mercado interno brasileiro, o valor monetário do grão de pipoca é aproximadamente três vezes superior ao do milho comum. Tal diferença está relacionada ao alto custo de produção do grão, levando à importação de sementes principalmente dos Estados Unidos e Argentina (Lima et al., 2020).

Uma das possibilidades de aumentar a produtividade da cultura no país consiste na seleção de populações com alta frequência de alelos favoráveis. Para a cultura do milho-pipoca, a seleção de genótipos com boa aptidão se dá principalmente para produtividade de grãos e capacidade de expansão, que são as principais características para a cultura (Scapim et al., 2002). Por outro lado, a correlação genética negativa existente entre essas duas variáveis é o principal fator limitante para obtenção de genótipos com alta aptidão tanto para produtividade de grãos quanto para capacidade de expansão (Cabral et al., 2016). O ponto de partida para contornar essa problemática e garantir o sucesso de programas de melhoramento é a variabilidade genética, que é maximizada pelo cruzamento de diferentes genótipos (Ertiro et al., 2013).

Reconhecendo a importância dessa cultura, a Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) mantém um Programa de Melhoramento em milho-pipoca para fornecer cultivares melhoradas aos agricultores (Amaral Jr. et al., 2013)

e promover o intercâmbio de materiais genéticos entre instituições de pesquisa. Atualmente, o Banco de Germoplasma de Milho-Pipoca da UENF tem um acervo de 169 linhagens, originadas de 25 genealogias distintas, provenientes de diferentes países da América do Sul.

As pesquisas realizadas com os genótipos do Banco de Germoplasma abrangem diversas áreas como: Avaliação de Doenças, Seleção Recorrente, Déficit hídrico entre outras (Guimarães 2018; Almeida et al., 2021; Kamphorst et al., 2022; Carlos et al., 2022; Ferreira et al., 2022; Saluci et al., 2022). Entretanto, mesmo havendo diversas pesquisas com as linhagens *per se* provenientes do banco, ainda não foi caracterizado todo o seu potencial, bem como não se sabe sobre a distância genética entre as linhagens contidas na Coleção de Germoplasma da UENF.

Pelo exposto, há necessidade de caracterização das linhagens obtidas. Tais estudos são importantes, pois fornecem uma base de dados que venha enriquecer o conhecimento da coleção de germoplasma de milho-pipoca da UENF. Nesse sentido, o investimento em estudo de metodologias que possibilitem a identificação de linhagens divergentes e promissoras, para potenciais cruzamentos, torna-se de fundamental importância para o melhoramento genético da cultura do milho-pipoca, podendo auxiliar, na obtenção de novas cultivares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Acessar a diversidade genética existente entre as linhagens de milho-pipoca da coleção de germoplasma da UENF por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial agronômico de genótipos de milho-pipoca;
- Inferir sobre o potencial das linhagens de milho-pipoca quanto às doenças fúngicas;
- Selecionar genótipos promissores que possam ser utilizados em cruzamentos para obtenção de híbridos produtivos e resistentes às doenças fúngicas;
- Promover a caracterização molecular de linhagens de milho-pipoca via marcadores microssatélites e marcadores EST-SSR; e
- Gerar informações para posterior construção de um banco de dados eletrônico para que seja disponibilizado ao grupo de pesquisa de milho-pipoca na UENF, otimizando assim trabalhos futuros.

3 CAPÍTULOS

3.1. CAPÍTULO 1 - POTENCIAL MORFOAGRONÔMICO E DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A DOENÇAS DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA

3.1.1. INTRODUÇÃO

O milho-pipoca possui propriedades nutritivas e se tornou um petisco popular de alto consumo havendo um aumento de 32% nas vendas de pipoca no varejo de 2012 a 2018 (Paraginski et al., 2016; Parsons et al., 2021). O comércio tem se expandido constantemente por mais de uma década, movimentando um montante estimado em cerca de US\$ 9,06 bilhões em 2016 e projetado para aumentar para mais de US\$ 15 bilhões até 2023 (Dawande, 2018).

Um fator limitante na cultura, e que dificulta o processo produtivo, são os danos causados por doenças fúngicas. O prejuízo causado por fungos se dá desde a redução na área foliar que prejudica o enchimento de grãos, quanto na deterioração dos grãos após a colheita, o que inviabiliza a comercialização. Dentre as doenças que atacam o milho-pipoca, as doenças foliares causadas por *Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J Leonard e Suggs (1974); teleomorfo *Setosphaeria turcica* (Luttr.) K.J Leonard e Suggs (1974); *Bipolaris maydis* (Nisik e Myiake) Shoemaker (1959); teleomorfo *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler)

Drechsler (1934); *Puccinia polysora* Underw (1897) e também a podridão de espigas por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Nirenberg e O'Donnell 1998) (sinônimo *F. moniliforme*, teleomorfo *Gibberella moniliformis*) têm sido alvo de programas de melhoramento genético (Cruz et al., 2010; Kurosawa et al., 2020; Santos et al., 2020; Almeida et al., 2021).

A forma mais econômica e sustentável de contornar os impactos desses agentes etiológicos é o uso de cultivares resistentes. Para o desenvolvimento e disponibilização dessas cultivares, uma etapa importante é o pré-melhoramento para identificação de acessos que possam ser utilizados na geração de genótipos superiores (Boakyewaa et al., 2019, Teixeira e Trindade, 2021). O estabelecimento de coleções de trabalho é uma estratégia utilizada pelos melhoristas para aumentar a probabilidade de sucesso no desenvolvimento de cultivares.

No caso do milho-pipoca, assim como no milho comum, o desenvolvimento de híbridos a partir do cruzamento de linhagens endogâmicas é um método promissor para geração de novas cultivares (Bombonato et al., 2020; Kurosawa et al., 2020). Ganhos para caracteres, cujo controle gênico é predominantemente resultante de variância aditiva, podem ser explorados durante o processo de desenvolvimento das linhagens, já que os alelos são fixados ao longo desse processo.

Por outro lado, os ganhos genéticos para caracteres onde o controle gênico é predominantemente resultado de variância não aditiva (desvios de dominância e epistasia), poderão ser potencializados a partir da exploração de heterose quando na decorrência dos cruzamentos, na etapa final de desenvolvimento dos híbridos (Santos et al., 2020). Vale ainda ressaltar que, embora os maiores ganhos para esses caracteres sejam obtidos na etapa de cruzamento, a exploração da parcela do efeito gênico aditivo (ainda que menor) deverá ser objeto de seleção durante o desenvolvimento das linhagens, uma vez que partindo de genitores com melhores médias, haverá maior probabilidade de alcançar o valor genético final desejado (Bombonato et al., 2020).

Assim, o estabelecimento de uma coleção de trabalho composta por linhagens endogâmicas de milho deverá observar não somente os valores *per se* das linhagens, como também garantir certo grau de divergência genética entre as linhagens da coleção. A manutenção de divergência genética irá garantir a

possibilidade de explorar maior heterose entre as linhagens quando em cruzamento no programa de melhoramento.

No caso do milho-pipoca, as principais características de interesse são produtividade de grãos e capacidade de expansão da pipoca. Em estudos sobre efeitos gênicos envolvidos na expressão da capacidade de expansão em germoplasma sul-americano, têm-se apontado predominância de herança por efeitos aditivos ou ainda mista (Pereira e Amaral Júnior, 2001; Lima et al., 2019). No caso de doenças fúngicas, não há ainda estudos específicos sobre a herança gênica, mas sabe-se que o uso de linhagens menos suscetíveis é essencial para o processo de produção de sementes. O uso de genitores, principalmente maternos, com elevado grau de resistência a doenças garante às companhias produtoras de sementes, maior produtividade, podendo assim gerar cultivares com preço mais acessível aos produtores.

Neste trabalho, portanto, o objetivo foi obter uma coleção de trabalho em que se tenha variabilidade genética a partir da avaliação morfoagronômica para o desenvolvimento de híbridos com elevada capacidade de expansão da pipoca e resistência às doenças fúngicas.

3.1.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.1.2.1. Milho-pipoca

O milho-pipoca pertence à família Poaceae (Goodman e Smith, 1987), subfamília Panicoide, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* var. *everta* (Sturtev) L.H. Bailey (Galinat, 1979; Paterniani e Campos, 2005). No gênero *Zea*, as espécies são diploides com $2n = 2x = 20$ cromossomos (Paterniani e Campos, 2005; Koo e Jiang, 2008).

Dentre as espécies de milho cultivadas, o milho-pipoca é consumido e apreciado pelo mercado brasileiro. Devido ao aumento do consumo nos últimos anos e sua importância econômica, seu cultivo tem sido economicamente importante para os grandes produtores (Moterle et al., 2012). Smith Júnior et al. (1949) descrevem que o primeiro relato de descoberta do milho-pipoca foi um

exemplar com data estimada de 2500 a.C., encontrado no sítio arqueológico de “Bat Cave”, Novo México. Mangelsdorf (1974) analisando descobertas arqueológicas de doze sítios, localizados no México e no Sudoeste dos Estados Unidos da América, identificou milhos mais antigos como precursores das raças mexicanas de milho-pipoca.

Quando comparado ao milho comum, o milho-pipoca apresenta em geral grãos menores, menor vigor, maior suscetibilidade a pragas, a doenças, ao acamamento e ao quebramento do colmo, conseqüentemente, menor produtividade. Porém, a maior diferença é sua capacidade de expandir (Larish e Brewbaker, 1999). A expansão ocorre quando o grão é submetido à pressão de 930,8 kPa decorrente do aquecimento em torno de 177°C (Hoseney et al., 1983).

A coloração dos grãos pode variar entre amarelo, branco, rosa, roxo, preto, azul, creme e alaranjado. Quanto ao formato pode ser do tipo arroz, que são longos e delgados, com pontas agudas nas extremidades ou do tipo pérola, que são redondos e com uma extremidade suave. Os tipos de maior aceitação comercial são os de grãos redondos, tipo pérola, com endosperma amarelo alaranjado (Ziegler e Ashman, 1994).

A capacidade de expansão do milho-pipoca é explicada pela resistência do pericarpo, associada à presença de óleo e umidade no grão. Quando aquecido em temperatura apropriada (cerca de 180°C), o óleo e a umidade exercem pressão sobre o pericarpo, até que se rompa, expondo o endosperma (Zinsly e Machado, 1987). Caso o pericarpo esteja trincado ou rompido, a pressão ideal poderá não ser atingida e, conseqüentemente, a pipoca não se expandirá totalmente (Luz, 2005).

3.1.2.2. Importância econômica

O milho-pipoca é um aperitivo muito apreciado em todo o mundo, sendo que esse grande sucesso se deve, em parte, à associação da pipoca a locais de diversão como cinemas, parques, circos, entre outros.

A cultura do milho-pipoca sempre foi considerada modesta para atender ao consumo nacional, sendo necessária a importação tanto de sementes quanto de grãos, principalmente dos Estados Unidos da América e Argentina (Freitas Junior et al., 2009).

Dentre os principais requisitos, à boa aceitação do milho-pipoca, a textura e maior maciez, que são correlacionadas positivamente com a capacidade de expansão, são pontos cruciais para o lançamento de bons produtos no mercado. No que se refere a melhor qualidade da pipoca, os norte-americanos superam o Brasil, criando dessa forma, uma dependência na importação para o mercado interno, sem mencionar que as empresas empacotadoras deixam de trabalhar com o milho-pipoca produzido no Brasil, devido à pouca oferta decorrente da falta de sementes nacionais (Cabral et al., 2016).

Por volta de 60% da produção brasileira de milho-pipoca está concentrada no estado de Mato Grosso (IBGE, 2023). Os municípios de Campo Novo dos Parecis-MT e Nova Prata-RS são atualmente os maiores produtores de milho-pipoca do país. Ressalta-se que estas são regiões onde atuam as grandes empresas empacotadoras. Apesar do aumento na produção do milho-pipoca observa-se que a produção nacional está muito aquém da demanda.

O consumo nacional do alimento está em torno de 80 mil toneladas, no entanto, ainda se observa alta dependência estrangeira, uma vez que 75% desse mercado corresponde a sementes do milho-pipoca americano, importado principalmente da Argentina, para suprir a demanda do produto pelas empresas empacotadoras (Carvalho et al., 2015).

3.1.2.3. Caracterização Morfoagronômica e Resistência às doenças em Milho-pipoca

A caracterização agrônômica é o método mais utilizado como descritor de cultivares, por ser de fácil visualização, além de não necessitar de análises laboratoriais, assim diminuindo os custos e facilitando as avaliações. Tendo como base a descrição de várias características (cor, comprimento, diâmetro, peso entre outros.), sendo um método de aplicação simples em comparação aos outros descritores, além de sua eficiência para evidenciar divergência entre os genótipos (Santos et al., 2016 e Fernandes et al., 2018).

Para o melhoramento genético do milho-pipoca, algumas características morfoagronômicas são bastante importantes, tais como: a elevada produtividade, o

baixo acamamento e quebramento das plantas, a resistência às doenças e pragas, a alta capacidade de expansão e boas características organolépticas: maciez, aroma e cor da pipoca (Oz e Kapas, 2011).

Entre as principais características desejáveis em uma cultivar de milho-pipoca está a alta capacidade de expansão, de maior interesse dos consumidores; sendo almejado um valor mínimo de 30 mLg^{-1} (Matta e Viana, 2001; Sawazaki, 2001); bem como o alto rendimento de grãos, desejado pelos produtores (Amaral Júnior et al., 2010). Assim, um grande desafio para o melhoramento dessa cultura é obter ganhos concomitantes nestas duas principais características econômicas, sobretudo devido à existência de correlação negativa entre as mesmas (Freitas Júnior et al., 2009; Hallauer et al., 2010; Cabral et al., 2016). Deste modo, os programas de melhoramento de milho-pipoca têm como principal desafio desenvolver cultivares que associem boa produtividade de grãos com alta capacidade de expansão e qualidade em seu produto final

Em se tratando de doenças, as doenças fúngicas têm provocado uma grande discussão a respeito das estratégias de manejo utilizadas na cultura do milho-pipoca, a fim de adequar um programa de controle eficiente que possa diminuir os prejuízos provocados por essas doenças, através do uso de controle genético e controle químico (Brito et al., 2015).

Entre as doenças fúngicas mais comuns encontradas na cultura, destacam-se a helmintosporiose comum (*Exserohilum turcicum*), a helmintosporiose *maydis* (*Bipolaris maydis*), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora*) e a Podridão de espigas (*Fusarium verticillioides*). Tais doenças causam grande prejuízo à cultura, com redução da área fotossintetizante, em decorrência da colonização dos patógenos em grande parte do tecido foliar, o que resulta na necrose, na senescência precoce e, conseqüentemente, na redução da produtividade de grãos além também na ocorrência de podridão em grãos que afetará a produtividade e a qualidade fitossanitária dos grãos (Gonçalves et al., 2012; Faria et al., 2015; Narro et al., 2017; Moterle e Santos, 2019).

3.1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.3.1 – Descrição do material genético e delineamento experimental

Um total de 169 linhagens de milho-pipoca, originadas de 25 genealogias distintas, provenientes de diferentes países da América do Sul as quais compõem a coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e foram avaliadas em duas safras (verão e inverno). As linhagens foram desenvolvidas por processo de autofecundações sucessivas e se encontram na geração S₇ (Tabela 1).

Tabela 1. Relação das linhagens de milho-pipoca do banco de germoplasma da UENF de acordo com a genealogia.

Genealogia/ Descendência	Inst. Desenvolvimento/Origem	N° Linhagens	ID no Banco
Beija-Flor	UFV, Viçosa (Brasil)	3	L51 a L59
Angela	Sete Lagoas, Embrapa (Brasil)	7	L61 a L71
Viçosa- Viçosa	UFV, Viçosa (Brasil)	6	L74 a L88
IAC 125	Campinas, São Paulo (Brasil)	15	L201 a L230
BOZM.260	Bolívia (CIMMYT)	7	L231 a L260
PARA 172	Paraguai (CIMMYT)	10	L261 a L290
URUG298	Uruguai (CIMMYT)	7	L291 a L320
Barão de Viçosa	UFV, Viçosa (Brasil)	8	L321 a L350

Tabela 1 – Cont.

Genealogia/ Descendência	Inst. Desenvolvimento/Origem	Nº Linhagens	ID no Banco
PR 023	UEM, Maringá, Paraná (Brasil)	16	L351 a L380
SAM	América do Sul/EUA	15	L381 a L410
CHZM 13 134	Chile	1	L411
BOYA 462	Colômbia (CIMMYT)	3	L441 a L470
SE 013	Maringá, Paraná (Brasil)	12	L471 a L500
PA 170	Paraguai (CIMMYT)	11	L501 a
ROXO			L530
ARZM 07 049	Argentina (CIMMYT)	5	L531 a L560
ARZM 05 083	Argentina (CIMMYT)	3	L561 a L590
RS 20	IPAGRO, Porto Alegre (Brasil)	5	L591 a L620
PA 091	Maringá, Paraná (Brasil)	6	L621 a L650
ARZM 13 050	Argentina (CIMMYT)	5	L651 a L680
UENF 14	UENF, Rio de Janeiro (Brasil)	14	L681 a L710
Híbrido Zélia	Repositório UFV	1	P1
CMS-42	Repositório UFV	2	P2 e P3
SAM	Repositório UEM	1	P4
Híbrido Zaeli	Repositório UEM	3	P5 a P7
Híbrido	IAC Repositório UFV	3	P8 a P10
IAC112			
Total	-	169	-

Em cada uma das safras, o ensaio de competição foi implantado seguindo o delineamento de blocos casualizados arranjados dentro de sets com utilização de testemunhas comuns e três repetições (blocos). Cinco sets com número variável de linhagens regulares e três linhagens comuns (L69, L70 e L80) foram implantados. As linhagens testemunha foram dispostas de forma casualizada em cada set.

A unidade experimental foi constituída de uma linha com 15 plantas espaçadas 0,20 m entre plantas e 0,90 m entre linhas, correspondente a densidade de 55,555 plantas / hectare. Os tratos culturais seguiram as recomendações para a cultura. A fertilização mineral foi conduzida com aplicação de 180 kg N, 100 kg de P₂O₅ e 125 kg de K₂O por hectare, em aplicações parceladas da seguinte forma: 80 g de formulado NPK (04:14:08) por metro linear no momento do plantio. Aos 30 dias após a semeadura (DAS) foram aplicados 30 g de formulado NPK (20:00:20) por metro linear e aos 45 DAS foi realizada a última adubação de cobertura com aplicação de 20 g de ureia (45% de nitrogênio) por metro linear.

Durante os 30 primeiros dias após o plantio, foram realizadas duas aplicações de inseticida químico para controle de lagartas do cartucho. Nenhum fungicida foi aplicado na área experimental. As plantas foram irrigadas por aspersão considerando turno de rega de 2 dias. Capinas mecanizadas foram realizadas aos 20 DAS e aos 60 DAS para controle de plantas espontâneas. A colheita manual das espigas foi realizada aos 120 DAS.

Durante a safra de inverno (Safrá 1) a precipitação acumulada na área foi de 221.6 mm, com temperatura diária média de 23°C (variações de 15°C a 33°C no período) e umidade relativa do ar com média diária de 76.7%. Durante a safra de verão (Safrá 2) a precipitação acumulada foi de 655.6 mm, temperatura média diária de 26°C (variações de 22°C a 38°C no período) e umidade relativa do ar com média diária de 77,6%.

3.1.3.2. Avaliação da ocorrência de doenças fúngicas visando a seleção das melhores linhagens

As doenças fúngicas avaliadas foram: manchas foliares ocasionadas por *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis*, e *Puccinia polysora*; e podridão de espigas ocasionada por *Fusarium verticillioides*. A avaliação da incidência e severidade foi

realizada com o auxílio de escalas diagramáticas. Para incidência das três doenças foliares em estudo, a escala utilizada foi a proposta pela Agroceres (1996), onde a incidência é estimada pela relação entre o número de folhas incididas em relação ao número total de folhas. Para severidade de doença, foram utilizadas as escalas de Vieira et al. (2014) para avaliar *E. turcicum* (NCLB); a escala de James (1971) para *B. maydis* (SCLB) e, a escala proposta por Chester (1950) para avaliação de *P. polysora* (SCR).

A estimativa de incidência de podridão de espiga ocasionada por *F. verticillioides* (FER) foi calculada pela relação entre o número de espigas incididas e o número total de espigas colhidas na parcela. Para severidade de FER foi utilizada uma escala adaptada daquela proposta pelo Cimmyt (1994), onde as espigas receberam notas de 0 a 100% em intervalos escalares de 5% de grãos incididos na espiga.

De posse dos dados, para as variáveis quantitativas, a partir das médias das testemunhas em cada um dos sets, foi realizado o ajuste das médias para os tratamentos regulares, conforme descrito por Guimarães (2016). Os dados referentes a incidência e severidade de cada uma das doenças avaliadas foram sumarizados por um índice de doença (DI) que representa a ocorrência relativa média de doença durante as diferentes safras, o qual foi estimado pela expressão:

$$DI = \frac{1}{j} \sum_1^j \left[\left(\frac{Inc_{ij}}{Inc. Max_j} \right) \cdot \left(\frac{Sev_{ij}}{Sev. Max_j} \right) \right]$$

Onde:

j é o número de safras avaliadas; Inc_{ij} é a incidência média observada no i -ésimo genótipo dentro da j -ésima safra; $Inc. Max_j$ é o valor máximo de incidência observada na j -ésima safra; Sev_{ij} é o valor de severidade média observada no i -ésimo genótipo dentro da j -ésima safra e; $Sev. Max_j$ é o valor máximo de severidade observado na j -ésima safra.

A utilização do DI se deu a fim de facilitar a seleção de linhagens com base na distribuição dos valores médios observados, bem como para facilitar a apresentação dos resultados.

A seleção de linhagens para composição da coleção de trabalho foi realizada sobre as médias das variáveis PE, NCLB, SCLB, SCR e FER. A distribuição dos valores observados para cada um desses caracteres foi observada em gráficos Boxplot. As linhagens selecionadas foram aquelas que apresentaram valores iguais

ou menores ao primeiro quartil para ao menos uma das doenças ou ainda, maior ou igual ao terceiro quartil para PE.

O número de linhagens selecionadas devido ao desempenho para cada um dos caracteres supracitados ou ainda para múltiplos caracteres dentre estes, foi utilizado para construção de um Diagrama de Veen.

3.1.3.3. Avaliação de descritores morfoagronômicos para estudo da divergência.

Além da incidência e severidade para as quatro doenças fúngicas citadas anteriormente, outros 14 descritores morfoagronômicos foram avaliados, dentre estes, dez descritores quantitativos: a) dias decorridos do plantio até o florescimento masculino, b) dias decorridos do plantio até o florescimento feminino; c) intervalo entre florescimento masculino e feminino; d) número de plantas quebradas; e) número de plantas aptas a colheita; f) número de espigas colhidas; g) massa de grãos (kg) colhidos; h) massa de 100 grãos (g) sadios; i) capacidade de expansão da pipoca (mg g^{-1}); e cinco descritores qualitativos: j) coloração do pendão; k) volume do pendão (pouco, médio ou muito volumoso); l) formato do grão (pérola, intermediário ou pontiagudo); m) formato de pipoca (borboleta ou cogumelo) e; n) coloração de pipoca.

A estimativa de capacidade de expansão dos grãos (PE) foi obtida a partir do aquecimento de 30 g de grãos com cerca de 13,5% de umidade em aparelho de micro-ondas com potência de 1200 Watts durante 135 s para rompimento do pericarpo e formação da pipoca. O valor de PE (mg.g^{-1}) foi então obtido pela relação entre o volume de pipoca obtido, mensurado em proveta com capacidade de 2000 mL, e a massa inicial de grãos submetidos ao aquecimento (30 g).

A divergência fenotípica existente entre as linhagens de modo geral e entre as linhagens selecionadas foi estimada a partir das matrizes de distância de Gower considerando as médias entre safras para os outros 13 caracteres agrônômicos avaliados (exclusão das variáveis PE, NCLB, SCLB, SCR e FER). A partir da matriz de distâncias, os genótipos foram agrupados pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA).

As análises e construção de gráficos foram realizadas com auxílio do programa R (R Core Team, 2021) a partir das funções disponíveis nos pacotes *tidyverse* e *ggplot2* (Wickham et al., 2019).

3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição dos valores para o índice de ocorrência relativa de doença (DI) revelou que a maior preocupação foi com a ocorrência de podridão de espigas ocasionada por *Fusarium* (FER), uma vez que mais de 75% das linhagens apresentaram valores superiores a 25% de grãos sintomáticos (Figura 1).

O DI foi menor no conjunto de genótipos para NCLB, em que a mediana obteve o valor próximo a 0% (0,00), seguido de SCR que apresentou a mediana em aproximadamente 7% (0,07) e SCLB com o valor da mediana em torno de 8%. Mesmo com o alto valor DI encontrado para FER, houve também a presença de linhagens com valores baixos, havendo possibilidade de selecionar linhagens como genótipos fonte de alelos de resistência.

Ainda que para as doenças foliares a maior parte dos valores observados tenha sido inferior a 15% (0,15), a seleção de linhagens mais resistentes é uma etapa necessária devido ainda a existência de linhagens com percentuais elevados (> 30%) de ocorrência de doenças.

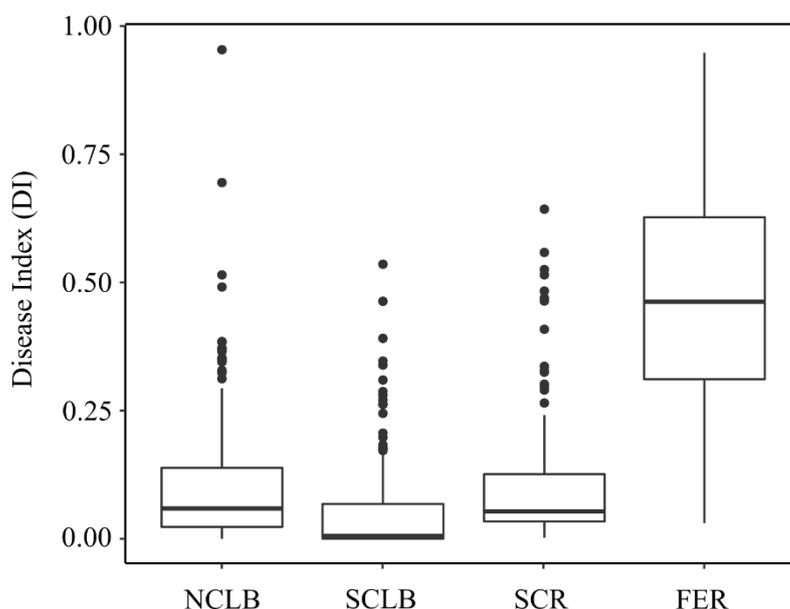


Figura 1 – Distribuição de médias para o índice de ocorrência relativa das doenças (DI): mancha foliar causada por *Bipolaris maydis* (SCLB); mancha foliar causada por *Exserohilum turcicum* (NCLB); mancha foliar causada por *Puccinia polysora* (SCR), e; podridão de espigas causada por *Fusarium verticillioides* (FER).

Na seleção para as linhagens componentes da coleção de trabalho, 122 linhagens foram selecionadas. Dessas linhagens, 68 foram selecionadas exclusivamente pela boa *performance* em uma única característica de interesse a saber: 8 linhagens para PE; 16 linhagens para FER; 15 linhagens para SCR; 11 linhagens para SCLB e 18 linhagens para NCLB (Figura 2).

Ainda, 41 linhagens foram selecionadas devido a melhor *performance* para dois caracteres simultaneamente. As linhagens com melhor *performance* para múltiplas doenças foram três: L656, L688 e L691 que apresentaram valores inferiores para NCLB, SCR e FER, além de valores satisfatórios de PE. Dessas linhagens, L688 e L691 foram extraídas da população UENF 14, a qual foi desenvolvida a partir de sucessivos ciclos de seleção recorrente intrapopulacional (Amaral Júnior et al., 2013). Possivelmente ao longo dos ciclos de seleção houve seleção favorável a maior resistência a doenças foliares e podridão de espigas, sendo esses alelos fixados nestas linhagens. Já a linhagem L656 foi desenvolvida a partir da população ARZM 13-050, a qual constitui de uma população de polinização aberta cultivada na Argentina, descrita como resistência média a FER, e resistência elevada a NCLB (Cimmyt, 2022).

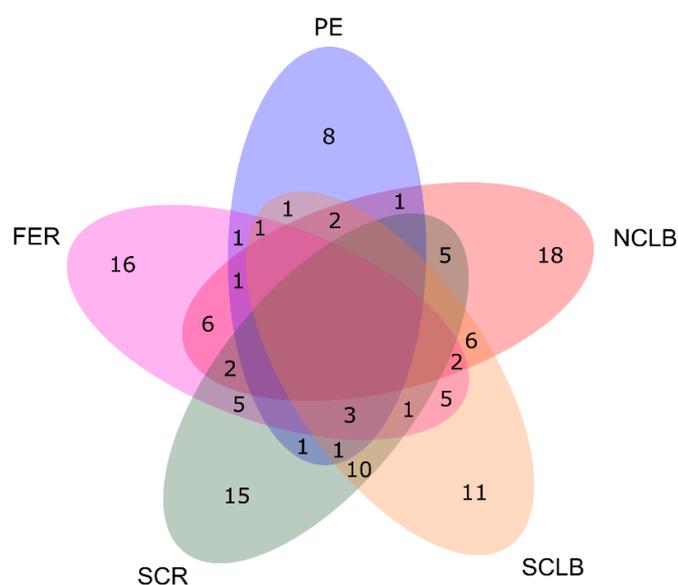


Figura 2 – Diagrama de Veen para o número de linhagens de milho-pipoca selecionadas exclusivamente ou simultaneamente para os caracteres de capacidade de expansão (PE), índice de doenças foliares causadas por *Bipolaris maydis* (SCLB), *Exserohilum turcicum* (NCLB), *Puccinia polysora* (SCR) e podridão de espigas causada por *Fusarium verticillioides* (FER).

A seleção dessas três linhagens para multicares demonstra assim a importância do investimento em pré-melhoramento das populações de polinização aberta, bem como do conhecimento da *performance* das mesmas para geração de linhagens elite nos programas de melhoramento. Ainda assim, não foram observadas linhagens que reunissem valores satisfatórios para todos os cinco caracteres de interesse ou ainda linhagens resistentes às quatro doenças avaliadas. Isso reforça a necessidade de continuidade do programa de melhoramento, o qual poderá reciclar linhagens a partir de populações bi-parentais ou sintéticas obtidas do cruzamento das linhagens com melhor *performance* para multicares.

Dentre as linhagens selecionadas, 20 apresentaram valores de PE acima de 30.02 ml g⁻¹. Isso aponta um futuro promissor para obtenção de híbridos com PE suficiente para comercialização no Brasil, onde a exigência mínima do Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento (MAPA) é de PE ≥ 30.00 ml g⁻¹. É importante ressaltar que embora haja indícios de que a herança desse caráter seja predominantemente de natureza gênica aditiva, há possibilidade de obter ainda algum ganho no desenvolvimento de híbridos (Schegoscheski et al., 2019, Bombonato et al., 2020).

O sucesso na obtenção de híbridos com elevada produtividade, capacidade de expansão, resistência a doenças e outros caracteres, dependerá também do grau de divergência genética entre as linhagens da coleção de trabalho. Isso porque, o grau de divergência de alelos é determinante para o sucesso na exploração dos desvios de dominância (Allard, 1999). Por isso, a composição da coleção de trabalho necessita considerar também a variabilidade genética existente no germoplasma, variabilidade esta, expressa na divergência fenotípica entre os acessos, sendo possível constatar diferentes formatos, tamanhos e cores (Figura 3).



Figura 3. Variabilidade genética fenotípica do Banco de Germoplasma da UENF, (A) Volume do pendão; (B) Formato do Grão; (C) Coloração de pipoca; (D) Formato de pipoca.

A análise de dissimilaridade entre as 169 linhagens avaliadas para os demais 13 caracteres qualitativos e quantitativos descritos, mostrou a possibilidade de divisão dos acessos em 15 grupos distintos (Figura 4).

Observou-se que a formação dos grupos não seguiu um padrão relacionado à população de origem das linhagens ou ainda à região de coleta dessas populações. A maior variabilidade entre linhagens, ainda que de mesma origem genética é um evento esperado devido ao processo de fixação de alelos para garantir maior uniformidade dentro das linhas e maior divergência entre as linhas de uma mesma população (Gethi et al., 2002, Hallauer et al., 2010).

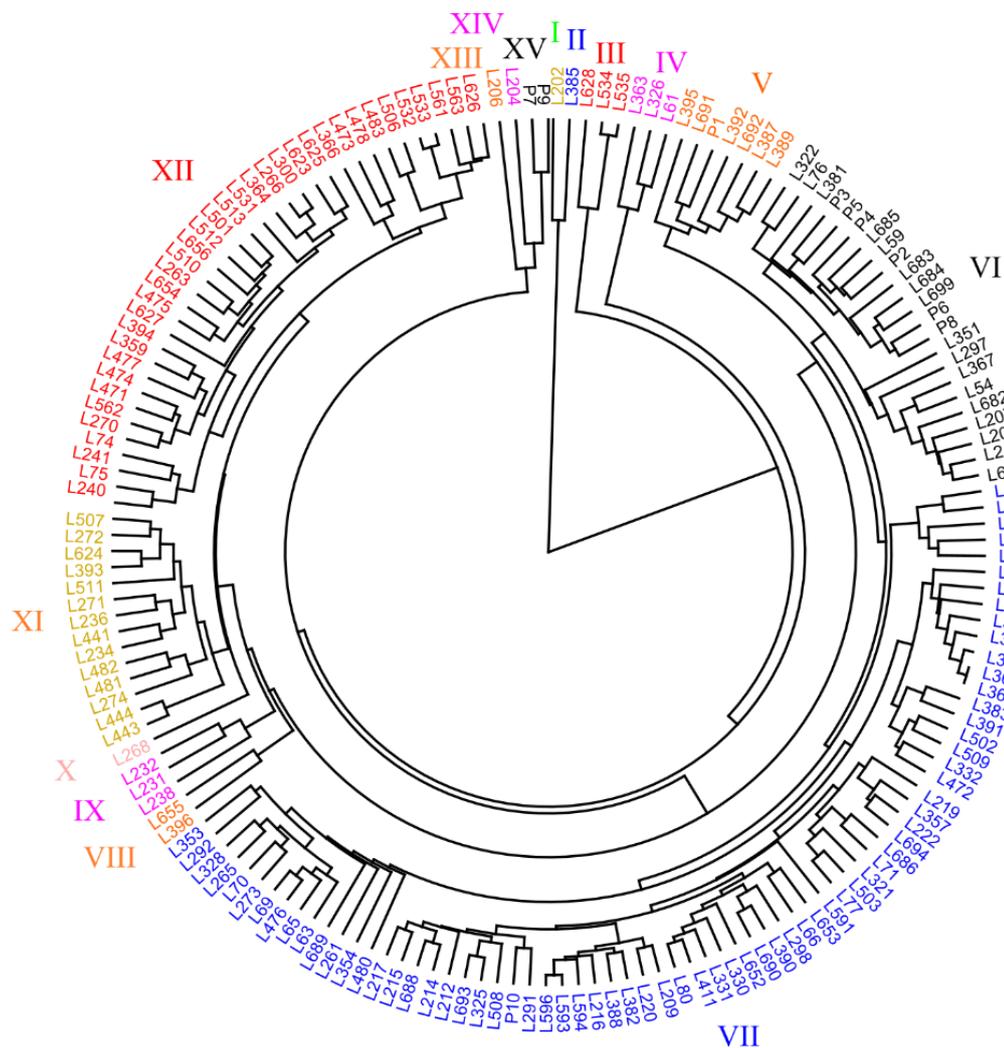


Figura 4 – Agrupamento por dissimilaridade entre 169 linhagens de milho-pipoca de acordo com a distância de Gower para 13 caracteres agrônômicos e morfológicos.

Em painéis com elevado número de acessos, é esperado que haja a formação de maior número de grupos de dissimilaridade, principalmente quando

avaliado maior número de caracteres. Por outro lado, a formação de alguns grupos que reúnam um maior quantitativo de linhagens também é um fato esperado uma vez que o processo de desenvolvimento das linhagens tenha sido conduzido em um mesmo ambiente, houve alguma seleção comum a todas as linhagens para alguns caracteres utilizados na estimativa de dissimilaridade. A existência de seleção comum a todas favorece também a menor dissimilaridade entre algumas linhagens. Já para o agrupamento de dissimilaridade entre as 122 linhagens selecionadas, houve a possibilidade de divisão dos acessos em 11 grupos distintos, dos quais se destacou o grupo IX com 46 linhagens (Figura 5).

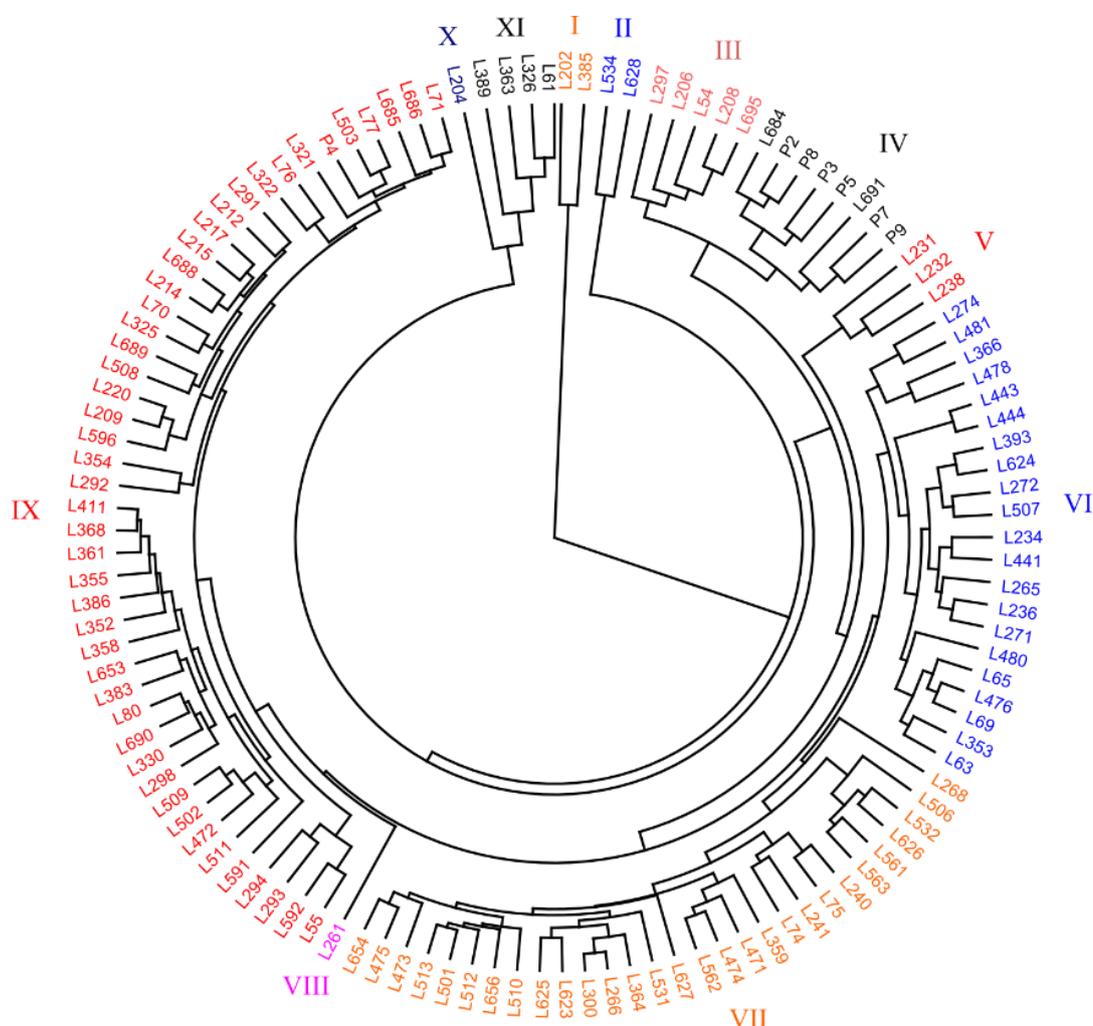


Figura 5 – Agrupamento por dissimilaridade entre 122 linhagens de milho-pipoca selecionadas com base em caracteres de resistência a doenças fúngicas e capacidade de expansão, a partir de divergência quanto a 13 atributos agrônômicos e morfológicos de interesse.

Os resultados observados a partir do agrupamento das linhagens no dendrograma, evidenciam a divergência genética existente entre os genótipos testados, sugerindo que há possibilidade de obter cruzamentos entre linhagens geneticamente contrastantes para aqueles *loci* relacionados aos caracteres avaliados.

Todos os 15 grupos inicialmente formados com as 169 linhagens tiveram pelo menos uma linhagem selecionada, estando assim representado nos 11 grupos formados na coleção de trabalho. Esse resultado mostra que além da possibilidade de manutenção da variabilidade genética entre as linhagens selecionadas, foi possível excluir algumas com maior grau de similaridade quanto a caracteres agrônômicos no geral, mas que não apresentaram valores satisfatórios para PE, NCLB, SCLB, SCR ou FER.

Ainda assim, pelo fato de não haver linhagens selecionadas para os cinco caracteres de interesse de forma simultânea, cada um dos grupos formados após a seleção da coleção de trabalho apresenta particularidades quanto ao potencial para resistência a alguma doença ou para aumento da PE (Figura 6)

Os grupos G1 (grupo I no dendrograma), G2, G4, G5, G6, G8, G10 e G11 foram aqueles que reuniram as linhagens com menor DI para SCLB. Os grupos G1, G2, G3, G5, G8 e G10 foram os que reuniram genótipos com menor DI para NCLB. As linhagens com menores valores de DI para SCR foram alocadas nos grupos G2, G5, G8 e G10. Para FER, as linhagens com menores DI foram aquelas dos grupos G1, G8 e G10. Já para PE, apenas os grupos G3, G4, G7, G9 e G11 apresentaram algumas linhagens com valores acima de 30 mg g⁻¹. Em especial, destacou-se o grupo G4, o qual a média de PE do grupo atingiu o valor desejado de 30 mg g⁻¹.

O grupo G4 reuniu as linhagens de populações pré-melhoradas pelo grupo de melhoramento da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e as duas linhagens da cultivar UENF 14 com melhor *performance* para PE. Esse resultado reforça novamente a vantagem de melhorar as populações de polinização aberta antes de iniciar o processo de extração de linhagens.

Os grupos G8 e G10, compostos apenas pelas linhagens L261 e L204, respectivamente, ainda que tenham apresentado valores um pouco elevados para FER, foram os grupos com menor valor para todas as doenças avaliadas. O uso dessas linhagens para o desenvolvimento de híbridos e populações sintéticas com

múltipla resistência a doenças fúngicas é uma estratégia interessante para o programa de melhoramento.



Figura 6 – Gráfico Radar para os valores máximos, médios e mínimos de capacidade de expansão dos grãos (PE), índice de doença para mancha foliar causada por *Bipolaris maydis* (SCLB), *Exserohilum turcicum* (NCLB), *Puccinia polysora* (SCR) e podridão de espigas por *Fusarium verticillioides* (FER) de cada um dos grupos de linhagens de milho-pipoca selecionados para a coleção de trabalho.

A linhagem L261 foi extraída da população PARA 172, coletada *on farm* no Paraguai, a qual é apontada como fonte de alelos de resistência a doenças fúngicas, de acordo com os dados de passaporte do banco de germoplasma do Cimmyt (Cimmyt, 2012). Já a linhagem L204 foi extraída da população IAC 125, gerada a partir do híbrido intervarietal IAC 125, o qual foi desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas. Essas informações reforçam a importância e efetividade dos trabalhos de melhoramento para obtenção de alelos para resistência a múltiplas doenças em novas cultivares, bem como o potencial do germoplasma sul-americano para contribuir no avanço genético para resistência às doenças em milho-pipoca.

Os grupos G2, G5, G8 e G10 foram os que reuniram as linhagens com maior grau de resistência a múltiplas doenças, no entanto, nenhum desses grupos apresentou linhagens com valores satisfatórios de PE. O cruzamento entre linhagens desses quatro grupos com linhagens dos demais grupos poderá ser uma estratégia a ser investigada visando o sucesso na obtenção de híbridos e ou populações sintéticas com elevada PE e resistência múltipla a NCLB, SCLB, SCR e FER.

No geral, a quantidade de linhagens selecionadas para a coleção de trabalho foi elevada. A dificuldade em selecionar um número menor de linhagens se dá neste caso pelo objetivo de obter parentais capazes de gerar cultivares com ganhos simultâneos para cinco caracteres agrônômicos. Os resultados obtidos suportam a hipótese de que o investimento no pré-melhoramento de populações poderá facilitar a seleção de menor número de acessos para coleções de trabalho com esse mesmo objetivo.

3.1.5. CONCLUSÕES

A seleção para capacidade de expansão de grãos e potencial de resistência a doenças fúngicas resultou na seleção de 122 linhagens (72% da coleção inicial) para a nova coleção de trabalho.

Dentre as linhagens selecionadas, foram observados grupos de linhagens com potencial para composição de blocos de cruzamento para obtenção de

híbridos e novas populações com elevada capacidade de expansão e resistência múltipla a doenças fúngicas.

O estudo da divergência genética para caracteres agronômicos e morfológicos auxiliou para o diagnóstico sobre o impacto da seleção na variabilidade entre as linhagens, de modo a viabilizar a exploração de divergência em etapas posteriores.

3.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA

3.2.1. INTRODUÇÃO

O milho-pipoca surgiu como uma cultivar geradora de um dos lanches mais populares em todo o mundo, a pipoca (Ren et al., 2018). É uma importante fonte de renda para a comunidade agrícola. Um maior número de grãos estourados e volume de pipoca expandida são os principais fatores que determinam a aceitabilidade pelos consumidores (Zunjare et al., 2015).

O investimento no melhoramento genético desta cultura tem crescido consideravelmente, o que permite reduzir a importação de sementes e promover o aumento do desenvolvimento de novas cultivares adaptadas a diferentes regiões do país (Ribeiro et al., 2016). Entretanto, a variabilidade genética existente entre os genótipos disponíveis dentro de um programa de melhoramento é que vai promover o sucesso.

Diversas estratégias têm sido usadas, ao longo dos anos, para avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações, com base em diferenças morfológicas, agronômicas, geográficas, bioquímicas e moleculares. A caracterização fenotípica fornece uma gama de informações sobre a variabilidade genética. Entretanto, os efeitos do ambiente, a interação genótipos x ambientes e os erros de medição também contribuem para as diferenças observadas entre os genótipos (Silva et al., 2017; Adu et al., 2019).

Por outro lado, a caracterização molecular é livre de efeitos ambientais e tem sido uma ferramenta indispensável para caracterizar recursos genéticos e fornecer aos melhoristas informações mais detalhadas que podem auxiliar na seleção de linhagens mais divergentes (Leal et al., 2010). Vários autores relataram que o uso combinado das informações de marcadores moleculares e de caracteres fenotípicos podem ser mais eficientes para quantificar as diferenças genéticas entre as linhagens de milho (Hartings et al., 2008; Wu et al., 2014; Mundim et al., 2015).

Em se tratando da avaliação molecular, os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) são ideais para a análise genética em plantas devido sua disponibilidade e abundância ao longo do genoma, serem de natureza polimórfica, co-dominantes e detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Muller et al., 2014).

Entre os marcadores SSR, aqueles presentes em sequências expressas (*Expressed Sequence Tag* -EST) têm-se destacado devido a sua forte ligação a genes de função conhecida. Os EST-SSR são um tipo de microssatélites provenientes de áreas mais conservadas do genoma e, portanto, podem ser obtidos livremente de EST da mesma espécie ou transferidos de outras espécies e podem ser aplicados na genômica funcional, mapeamento genético, análise de QTL e análise de biodiversidade (Zhang et al., 2014).

Para um bom progresso em qualquer programa de melhoramento, obter informações sobre a divergência genética do germoplasma de base são cruciais (Boakyewaa et al., 2019). Deste modo, é necessário avaliar a diversidade dos recursos genéticos disponíveis para o melhoramento, uma vez que, é imprescindível que o germoplasma inicial apresente as características de interesse, a fim de conhecer o potencial desse material para o melhoramento via exploração de heterose. (Leng et al., 2019).

Diante do acima exposto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar 169 linhagens de milho-pipoca pertencentes ao Banco de Germoplasma da UENF por meio de marcadores microssatélites e marcadores EST-SSR.

3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.2.1. Melhoramento genético do milho-pipoca

Até o início dos anos 2000, o consumo nacional de milho-pipoca girava em torno de 80 mil toneladas e cerca de 75% desse mercado correspondia ao milho-pipoca americano importado da Argentina. Embora o milho-pipoca seja mais precoce e prolífico em relação ao milho comum, em geral, é mais suscetível a pragas e doenças, mais propenso à formação de perfilhos e com sistema radicular menos desenvolvido, o que torna as plantas mais propensas ao acamamento e aos efeitos prejudiciais da seca (Miranda et al., 2003; Sawazaki 2010).

A contribuição do melhoramento genético no Brasil tem sido expressiva quando se refere ao desenvolvimento de variedades e híbridos de milho-pipoca. Contudo, mesmo com forte indício de crescimento interno, não tem sido significativo os avanços no que se refere aos objetivos dos programas de melhoramento genético. Assim, é de suma importância que os programas das empresas públicas e privadas liberem cultivares com alto potencial produtivo nas diferentes regiões do Brasil, fazendo com que se reduza a dependência por sementes dos mercados estrangeiros, principalmente variedades híbridas norte-americanas (Carvalho et al., 2013; Silva et al., 2013).

Cultivares comerciais de milho-pipoca no Brasil não receberam muita atenção dos programas de melhoramento em comparação com outros tipos de milho, de modo que são relativamente mais suscetíveis a doenças e superprecoces no ciclo, apresentam, em geral, mais depressão endogâmica, caule frágil e maior prolificidade, reduzida capacidade de expansão, além de emitir perfilhos com maior frequência e ter sistema radicular menos desenvolvido, tornando-os mais suscetíveis ao acamamento (Vendruscolo et al., 2000; Miranda et al., 2003).

A limitada diversidade genética da pipoca entre as cultivares modernas e a pouca diversidade representada nos principais bancos de germoplasma do país têm restringido os avanços nos programas de melhoramento de milho-pipoca no Brasil (Silva et al., 2015). Uma das formas de tornar os programas de melhoramento mais eficientes é para expandir a diversidade genética e, portanto, a identificação de materiais geneticamente contrastantes com potencial variabilidade para seleção é fundamental, sendo um dos pilares do melhoramento.

Assim, a qualificação e quantificação da diversidade genética presente em bancos de germoplasma, com base em características agronômicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares, permitem definir as prioridades das atividades relacionadas com a conservação de germoplasma, melhoramento genético participativo e conhecer o potencial desse germoplasma em programas convencionais de melhoramento genético (Munhoz et al., 2009; Paula et al., 2010).

3.2.2.2. Caracterização molecular

Os marcadores de DNA podem auxiliar indiretamente na predição do desempenho dos híbridos, pois permitem a obtenção de estimativas de distância genética. Tais estimativas são importantes pela suposição de que uma maior dissimilaridade entre as linhagens, do ponto de vista molecular, corresponde a uma maior probabilidade de geração de híbridos superiores (Serafini et al., 2001).

Com o rápido aperfeiçoamento das técnicas moleculares, fundamentadas na amplificação de fragmentos de DNA, grandes avanços têm sido alcançados na área dos marcadores de DNA (Padilha et al., 2003). Os marcadores moleculares têm sido empregados extensivamente e com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade existente entre os indivíduos. Com o desenvolvimento dessas ferramentas para as análises genéticas, tornou-se possível examinar com maiores detalhes a origem evolucionária dos genomas vegetais, bem como acessar o grau de variabilidade genética relatado em grupos de plantas (Borém e Miranda, 2005; Beckmann, 2006).

A diversidade genética de um *loco* marcador corresponde à ocorrência de polimorfismo entre indivíduos. Para estimar essa diversidade, vários índices que representam o conteúdo informativo de um *loco* podem ser utilizados (Azevedo, 2007). O número de alelos por *loco*, a heterozigosidade esperada (H_e) e a heterozigosidade observada (H_o) são os parâmetros genéticos mais utilizados para estimar a diversidade genética em populações de plantas. A H_e diz respeito à heterozigosidade esperada segundo o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e a H_o representa a real heterozigosidade existente na população (Meiros, 2009).

Desta forma, os marcadores moleculares podem ser usados para a obtenção de inferências sobre o potencial heterótico interpopulacional, contribuindo para a seleção das populações que poderão ser utilizadas, tanto para o seu melhoramento

per se como para o desenvolvimento de híbridos a partir da condução de métodos interpopulacionais, particularmente os de seleção recorrente recíproca, capitalizando os efeitos aditivos e de dominância (Borém e Miranda, 2005; Paterniani e Campos, 2005).

3.2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.3.1. Material Vegetal

Cada genótipo, que corresponde as linhagens, foi semeado em um vaso de cinco litros, e as folhas jovens, saudáveis e em fase ativa de crescimento foram coletadas e enroladas em papel alumínio, identificadas e imediatamente mergulhadas em N₂ líquido para que não ocorresse a degradação do DNA. Uma vez no laboratório, este material foi macerado em nitrogênio líquido até formar um pó bastante fino e seguiu-se com o procedimento de extração.

3.2.3.2. Extração e Quantificação de DNA

A extração, quantificação do DNA genômico, bem como a genotipagem dos indivíduos foram feitas no Setor de Marcadores de DNA/LMGV da UENF. A extração de DNA foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

1ª etapa - Cerca de 200 mg de tecido macerado foi transferido para tubos de 1,5 mL, sendo realizado de forma rápida para evitar oxidação;

2ª etapa – Foi adicionado aos tubos contendo as amostras, 700µL do tampão de extração pré-aquecido contendo CTAB 2%, NaCl 1,4 mol L⁻¹, EDTA 20 mmol L⁻¹, Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ (pH 8,0), PVP sólido 2% e β- mercaptoetanol 0,2%, estes dois últimos necessários para remoção dos compostos fenólicos;

3ª etapa - Incubação em banho-maria a 65°C por 30-40 minutos. Durante a incubação, os tubos foram suavemente homogeneizados a cada 10 minutos. O material foi colocado em temperatura ambiente durante um período de 20 minutos;

4ª etapa – Foi adicionado ao sobrenadante 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico. Os microtubos foram agitados por inversões suaves, por

aproximadamente 5 minutos até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugações por 5 minutos a 14.000 rpm;

5° etapa – Procedeu-se a transferência da fase superior (aquosa) para um novo tubo devidamente identificado, tendo cuidado de não transferir a interfase e a fase inferior (foi transferido aproximadamente 350 μ L);

6° etapa - Foi adicionado isopropanol gelado ao sobrenadante. Inversões suaves foram realizadas e o material incubado a -20°C, por 2 a 3 horas;

7° etapa - O material foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, sendo removido o sobrenadante. O precipitado resultante foi lavado uma vez com etanol 70% e uma vez com etanol 95%. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 30 minutos;

8ª etapa - O precipitado foi ressuspenso em 200 μ L de tampão de extração contendo RNase na concentração final de 40mg/mL, e em seguida, incubado em banho-maria a 37°C por uma hora e meia. Ao final deste passo o DNA está ressuspenso na solução.

Para averiguar a qualidade e realizar a quantificação, o DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose metaphor 1% sob voltagem constante de 100 V (Figura 7). A quantificação das amostras de DNA se deu através da utilização do software GelQuant. As amostras foram diluídas para a concentração 5 ng μ L⁻¹.

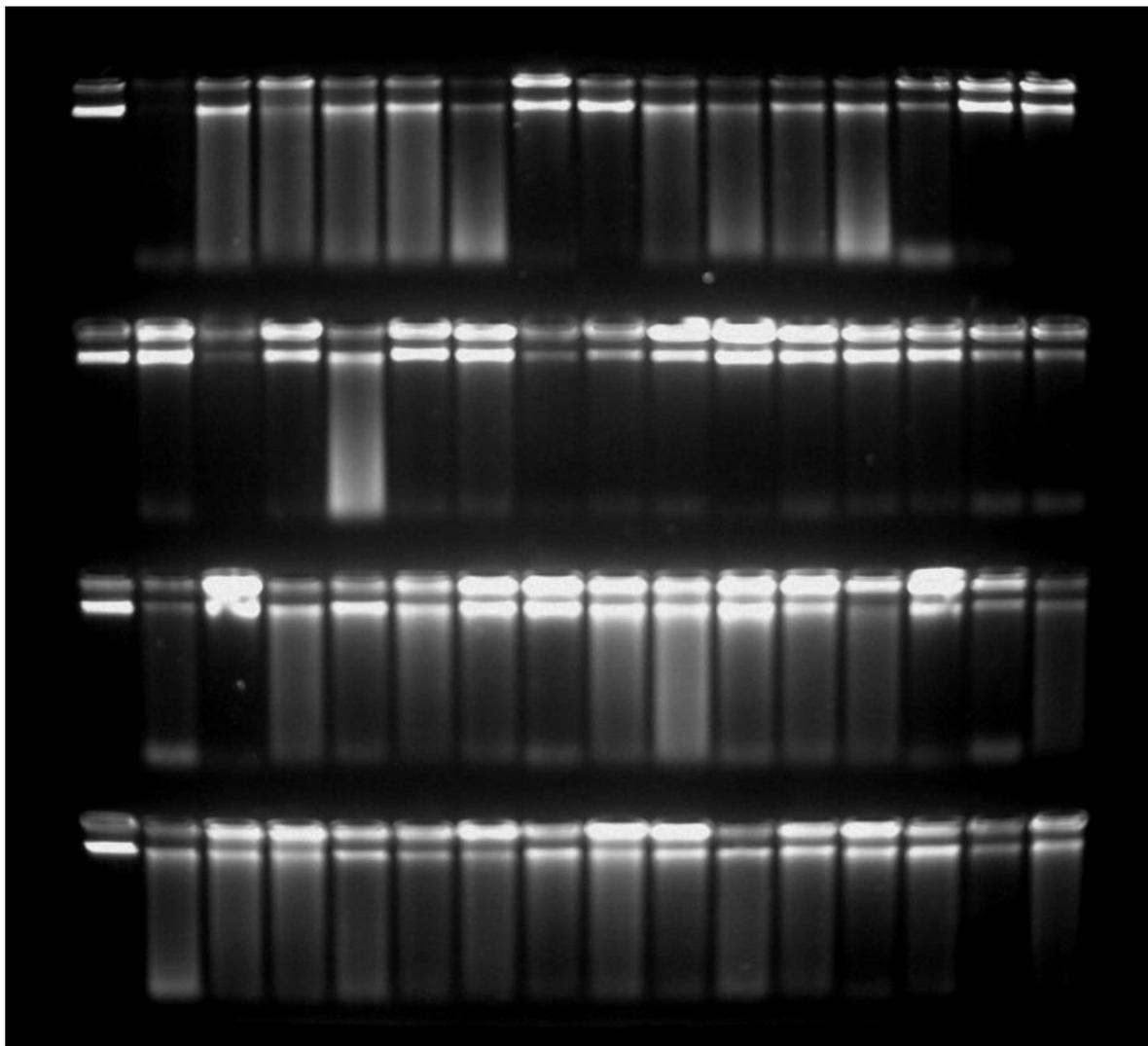


Figura 7. Qualidade do DNA extraído.

3.2.3.3. Reação de PCR e Eletroforese

Foram realizadas buscas na literatura de *primers* SSR e EST-SSR que fossem polimórficos e informativos para a genotipagem das linhagens, além de levar em consideração a localização genômica, buscando selecionar *primers* em todos os cromossomos e, assim, alcançar uma boa cobertura do genoma da espécie (Tabela 02).

Tabela 02. Distribuição dos *primers* SSR e SSR-EST's

Primers	Cromossomo	TM°C	Identificação
Bip2	4	64	SSR-EST's
Glb1	1	62	SSR-EST's
UMC1714	9	57	SSR-EST's
UMC1221	5	59	Genômico
UMC1642	7	57	Genômico
UMC1474	6	53	Genômico
BNLG1331	3	51	SSR-EST's
UMC1160	1	57	Genômico
UMC1685	1	54	Genômico
UMC1225	5	56	Genômico
UMC1139	8	63	SSR-EST's
UMC1252	2	63	SSR-EST's
UMC1982	9	63	SSR-EST's
PHI96100	2	59	SSR-EST's
UMC2112	1	63	SSR-EST's
UMC1241	7	63	SSR-EST's

As reações de amplificação (PCR) foram feitas em um volume final de 12 µL por reação, contendo 1,2 reação 10X (*Thermo Scientific, Fermentas, USA*), 1,0 µL de MgCl₂ a 25 nM (*Thermo Scientific, Fermentas, USA*), 1,2 µL de dNTP a 2 mM (*Aldrich Sigma, USA*), 1,0 µL de *primer* R+F (*Aldrich Sigma, USA*), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (*Thermo Scientific, Fermentas USA. 5 U.µL⁻¹*) e 2,0 µL de DNA (5 ng.µL⁻¹), além de 6,4 µL de água ultra purificada. As amplificações foram feitas obedecendo, respectivamente, a temperatura ideal de anelamento (T_m) dos iniciadores, em um termociclador *Applied Biosystems/ Veriti 96 well*. Foi utilizado um programa de 35 ciclos, obedecendo às seguintes temperaturas e tempo: 94°C durante 4 minutos (desnaturação inicial); 94°C por 1 minuto (desnaturação cíclica); temperatura específica de cada iniciador (58 a 65) em °C, por 1 minuto (anelamento); 72°C por 3 minutos (extensão cíclica); 72°C por 7 minutos (extensão final); e 4°C *forever*.

Os produtos resultantes da amplificação foram corados com solução GelRed + Blue juice (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose metaphor 4% em tampão de corrida TAE 1X. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz ultravioleta, e as imagens foram capturadas por fotodocumentação.

3.2.3.4. Análise estatística

Os dados obtidos a partir da amplificação dos 16 *locos* foram convertidos em uma matriz numérica, conforme descrito por Ramos et al. (2014). A partir desta matriz, foi estimada a distância genética pelo Índice não ponderado, com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013). A matriz de dissimilaridade genética foi exportada para o programa Mega X (Kumar et al., 2018), no qual foram realizadas as análises de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Mean).

A matriz numérica foi submetida ao programa Powermarker 3.5 (Liu e Muse, 2005), em que foram estimadas as seguintes medidas de diversidade: número de alelos por *loco* (NA), heterozigosidade esperada (HE), heterozigosidade observada (HO), índice de conteúdo polimórfico (PIC).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca pela quantificação da diversidade genética, buscou-se inferir sobre a estrutura genética com algumas medidas descritivas, assim a Tabela 03 traz as informações referentes 16 *locos* SSR e SSR-EST avaliados.

Tabela 03. Análise descritiva da variabilidade genética dos 16 *locos* analisados nos 172 genótipos de milho-pipoca, onde Na: número de alelos observados; HE: heterozigosidade esperada; HO: heterozigosidade observada; PIC: índice de conteúdo polimórfico

Locos	Na	H_E	H_O	PIC
Bip2	3	0.474	0.000	0.427
Glb1	2	0.338	0.000	0.281
UMC1714	2	0.257	0.000	0.224
UMC1221	3	0.533	0.000	0.466
UMC1642	2	0.422	0.000	0.333
UMC1474	2	0.120	0.000	0.113
BNLG1108	2	0.303	0.000	0.257
UMC1160	2	0.223	0.000	0.198
UMC1685	2	0.150	0.000	0.138
UMC1225	2	0.232	0.000	0.205
UMC1139	2	0.273	0.000	0.235
UMC1252	2	0.467	0.000	0.358
UMC1982	2	0.407	0.000	0.324
PHI96100	2	0.280	0.000	0.241
UMC2112	2	0.273	0.000	0.235
UMC1241	2	0.397	0.000	0.318
Médias	2.125	0.322	0.000	0.272

Para o estudo da divergência genética entre as 169 linhagens de milho-pipoca, foram utilizados dez marcadores gênicos (SSR-EST) e seis marcadores genômicos (SSR) polimórficos, que cobriram oito dos dez pares de cromossomos da cultura. Para os 16 *locos* avaliados, foram identificados 34 alelos, tendo o número de alelos por *loco* variando de 2 a 3, com média de 2,125. Tais resultados podem ter sido obtidos devido a mais de 60% dos marcadores utilizados no presente trabalho tenderem a apresentar um menor grau de polimorfismo (EST-SSR), quando comparados à sua contraparte genômica, devido à maior conservação de sequências de DNA localizadas em regiões transcritas (Ramu et al., 2013).

A média de número de alelos encontrado para este conjunto de linhagens está de acordo com a quantidade encontrada em outros estudos de diversidade

genética de milho-pipoca. Vittorazzi (2016) avaliando 38 genótipos de milho-pipoca (do mesmo grupo de linhagens estudadas no presente trabalho), utilizando 15 *primers* SSR-ESTs, encontrou a média de alelos por *loco* de 2,80 valor próximo ao aqui encontrado.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) quantifica o polimorfismo genético presente em cada *loco* da população em estudo e indica o nível de informação nos *locos* e seu potencial para detectar diferenças entre genótipos, com base em suas relações genéticas (Rajendran et al., 2014).

Segundo Botstein et al. (1980), um *loco* pode ser classificado como altamente informativo ($PIC > 0,5$), moderadamente informativo ($0,5 > PIC > 0,25$) e não informativo ($PIC < 0,25$). Dos 16 *locos* microssatélites, 11 (68,75%) foram moderadamente polimórficos e 6 (31,25%) não apresentaram conteúdo informativo. O valor máximo de PIC observado foi de 0,466 para o *loco* UMC1221 e o menor valor foi atribuído ao *loco* UMC1474 (0,113).

Um reduzido valor de PIC pode indicar que a região é conservada para o grupo de genótipos em estudo. (Terra et al., 2011). Este conhecimento é importante, pois permite otimizar o número de marcadores a serem utilizados e priorizados nos mais diversos estudos moleculares (Liu, 1997).

Dado que o valor PIC depende do número de alelos encontrados e de suas frequências relativas, é possível identificar valores PIC em outros estudos iguais ou diferentes para um mesmo *loco* de microssatélite. Esse foi o caso, onde no presente estudo foram utilizados oito *locos* iguais ao trabalho de Vittorazzi (2016), dos quais dois (UMC1139 e UMC1241) apresentaram o mesmo número de alelos, e seis apresentaram números diferentes de alelos encontrados (Glb1, Bip2, UMC1252, UMC1982, PHI96100 e UMC2112), tendo destaque o *locos* PHI96100 que no estudo de Vittorazzi (2016) apresentou cinco alelos e neste estudo apresentou dois alelos.

Nenhum dos *locos* apresentaram a heterozigosidade observada maior que zero, isso já era esperado, pois os genótipos em estudo são linhagens e já se encontram no sétimo ciclo de autofecundação e assim há o indicativo que praticamente todos os *locos* estejam fixados.

Analisando os resultados obtidos pelo agrupamento, é possível observar a variabilidade genética entre as linhagens pela formação de sete grupos distintos (Figura 8). Todavia, não foi possível separar as linhagens de cada genealogia em seu respectivo grupo exceto para o grupo II, que alocou as linhagens L291 e L297 pertencentes à mesma genealogia (URUG298). Fato este ocorrido provavelmente pelo limitado número de marcadores polimórficos aplicados nas análises.

O grupo I alocou três linhagens (1,75%), a L361, L369 e L443 provenientes de duas genealogias diferentes, sendo a L361 e L369 da genealogia PR023 oriundas de Maringá/Brasil e a L443 da genealogia BOYA462 oriunda da Colômbia. Já o grupo II reuniu como já mencionado anteriormente duas linhagens (1,16%) a L291 e L297 provenientes da mesma genealogia URUG298 e oriundas do Uruguai. O grupo III alocou também duas linhagens (1,16%) a L411 e L441, mas de genealogias diferentes, sendo CHZM13134 oriunda do Chile e BOYA462 oriunda da Colômbia, respectivamente.

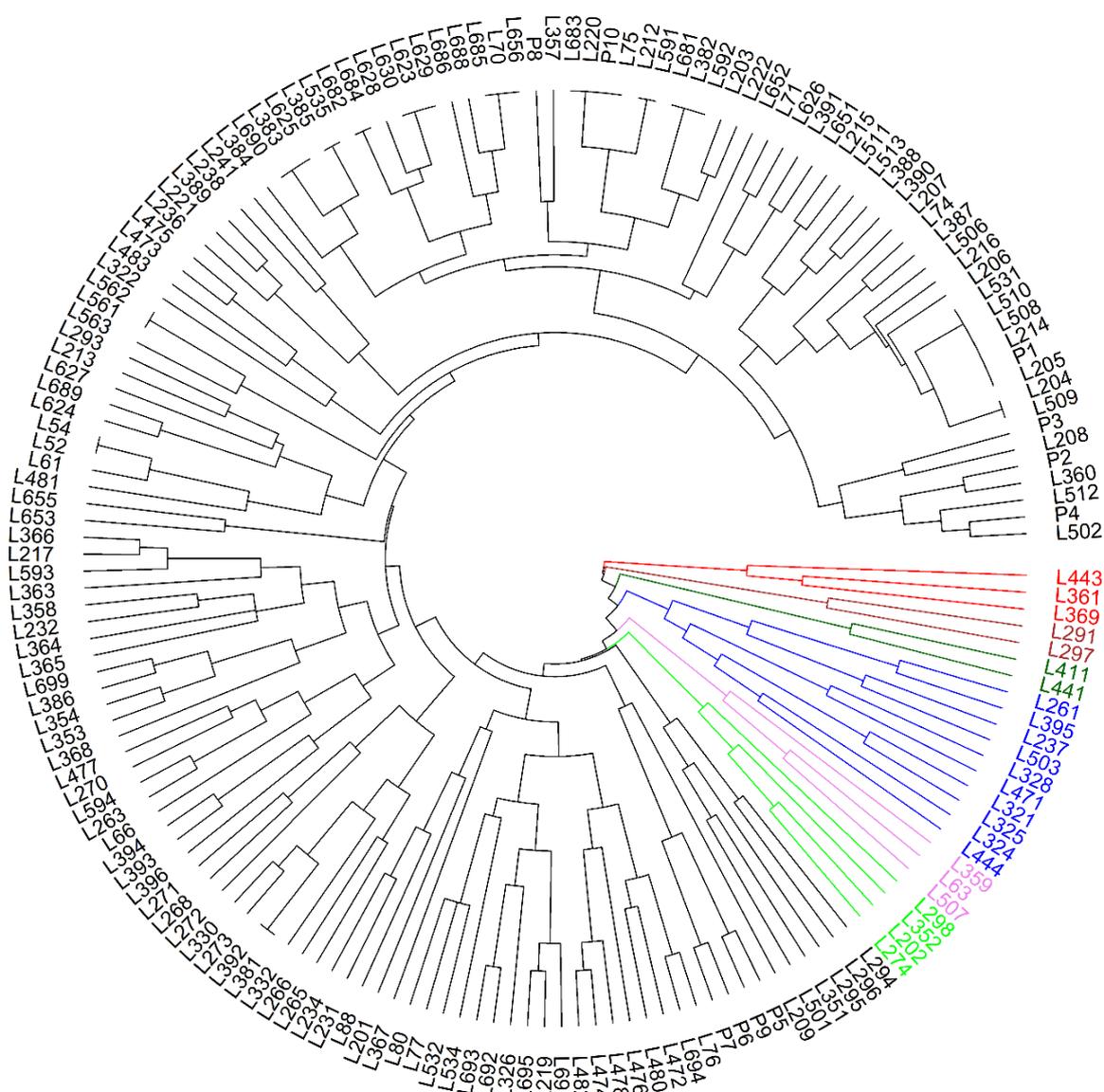


Figura 8. Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA com base na análise de 169 genótipos de milho-pipoca (coeficiente de correlação cofenética = 0,65).

Em relação ao grupo IV foi o segundo maior grupo, composto por dez linhagens (5,81%) e neste grupo houve a presença de sete genealogias distintas. O grupo V alocou três linhagens (1,75%), sendo elas a L63 da genealogia Angela oriunda da Embrapa/Brasil, a L359 da genealogia PR023 oriunda de Maringá/Brasil e a L507 da genealogia PA170ROXO oriunda do Paraguai. Para o grupo VI, foram reunidas quatro linhagens (2,32%), sendo a L202 da genealogia IAC125 oriunda do Instituto de Campinas, SP/Brasil, a L274 da genealogia PARA172 oriunda do Paraguai, a L298 da genealogia URUG298 oriunda do Uruguai e L352 da genealogia PR023 oriunda de Maringá/Brasil. Já o grupo VII foi o maior grupo com um total de 145 linhagens (86,05%), contendo linhagens de todas as genealogias avaliadas.

Este alto número de genótipos encontrados neste último grupo pode ter relação da cultura do milho-pipoca possuir reduzida base genética, decorrente de sua evolução proveniente de seleções apenas do milho comum tipo “flint”, (Kantety et al., 1995). Para além disso, é necessário o aumento do número de marcadores moleculares para avaliação das linhagens já pertencentes ao banco.

A realização de estudos sobre divergência genética é fundamental para a definição de estratégias de melhoramento genético, uma vez que estes estudos são os mais indicados para se obter uma maior heterose.

3.2.5. CONCLUSÕES

Houve variabilidade genética entre os acessos de milho-pipoca analisados, demonstrando que há possibilidade de exploração dessa variabilidade para desenvolvimento de novas cultivares.

A análise de cada linhagem permitiu a identificação de ausência de heterozigidade, confirmando a alta homozigose esperada em genótipos endogâmicos.

A utilização de um número maior de marcadores moleculares, bem como estudos adicionais são necessários para compreensão do germoplasma avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adu, G.B.; Badu-Apraku, B.; Akromah, R; Garcia-Oliveira, A. L.; Awuku, F. J.; Gedil, M. Genetic diversity and population structure of early-maturing tropical maize inbred lines using SNP markers. *Plos One*. p.1-12, 2019.
- Agrocere. (1996) Guia Agrocere de sanidade. São Paulo: Sementes Agrocere, 72p.
- Allard, R.W. (1999) Principles of Plant Breeding. 2nd Edition, John Willey and Sons Inc., New York.
- Almeida, R. N. D., Vivas, M., Santos Junior, D. R. D., Saluci, J. C. G., Carlos, M. C., Santos, J. S., Scapim, C. A. (2021) Combining abilities analysis for ear rot resistance in popcorn hybrids development. *Revista Ceres*, 68, 61-70.
- Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S.P., Rangel, R.M., Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Morais, R.C., Schuelter, A.R. (2010) Improvement of a popcorn population using selection indexes from a fourth cycle of recurrent selection program carried out in two different environments. *Genetics and Molecular Research*, 9: 340-370.
- Amaral Júnior AT, Gonçalves LSA, Freitas Júnior SP, Candido LS, et al. (2013) UENF 14: a new popcorn cultivar. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 13: 218-220.
- Azevedo, V.C.R. (2007) *Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cp DNA 79 e modelagem computacional para estudos da estrutura e*

- dinâmica genética de maçaranduba – Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae. Universidade de Brasília, Brasília. 202p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular).
- Beckmann, M.Z., Luz, F.J.F., Pivetta, K.F.L. (2006) Marcador AFLP na identificação da diversidade genética de mini roseiras. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 6:139-143.
- Boakyewaa Adu, G., Badu-Apraku, B., Akromah, R., Garcia-Oliveira, A.L., Awuku, F.J., Gedil, M. (2019) Genetic diversity and population structure of early-maturing tropical maize inbred lines using SNP markers. *Plos one*, 14(4).
- Bombonato, A. L., Carvalho, H. F., Rocha, D. S., Sawazaki, E., de Barros, V. L. N. P., & Zagatto Paterniani, M. E. A. (2020). Selection Index and Genetic Parameters in Tropical Popcorn Hybrids. *Tropical Plant Biology*, 13(4): 382-388.
- Borém, A., Miranda, G.V. (2005) *Melhoramento de plantas*. Viçosa: UFV. 525p.
- Brito, A. H., Von Pinho, R. G., Pereira, J. L.A. R., Balestre, M. (2015) Controle químico da Cercosporiose, Mancha Branca e dos Grãos Ardidos em milho. *Revista Ceres*, v. 60, n.5, p. 629-635.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
- Cabral, P.D., A.T., Amaral Júnior, I.L.J., Freitas, R.M., Ribeiro T.R.C., Silva. (2016) Relação de causa e efeito de caracteres quantitativos sobre a capacidade de expansão do grão em milho-pipoca. *Revista Ciência Agronômica* 47: 108.
- Carlos, M. C., Vivas, M., Costa, A. C., Vasconcelos, L. C., Lima, W. L. D., Almeida, R. N. D., Valadares, F. V. (2022) Resistance to multiple leaf diseases in popcorn lines with potential for baby corn production. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 44.
- Carvalho, C., Kist, B. B., Santos, C. E., Muller, I., Beling, R. R. (2015) *Anuário brasileiro de milho*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz LTDA., 112 p.

- Carvalho, M. S. N., Mangolin, C. A., Scapim, C. A., Da Silva, T. A., Da Silva, M. D. F. P. (2013) A collection of popcorn as a reservoir of genes for the generation of lineages. *Molecular biotechnology*, v. 53, n. 3, p. 300-307.
- CYMMYT (2012) - Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo. Cimmyt bank passport information: CIMMYTMA 4157. <https://doi.org/10.18730/GCFPQ>.
- CYMMYT (2022) - Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo – Germoplasm Bank – Passport data. <https://doi.org/10.18730/H1C4V>.
- CRUZ, C.D. (2013) GENES: software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. *Acta Scientiarum Agronomy*, 35(3):271-276.
- Cruz, J.S., Pereira Filho, I.A., Alvarenga, R.C., Contijo Neto, M.M., Viana, J.H.M., Oliveira, M.F., Matrangolo, W.J.R., Albuquerque Filho, M.R. (2010) Sistema de Produção 1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Embrapa Milho e Sorgo, Versão Eletrônica 6^a edição.
- Dawande, R. (2018) Mercado de pipoca por tipo (pipoca de micro-ondas e pipoca pronta para comer) e usuário final (doméstico e comercial) - Análise de oportunidades globais e previsão do setor, 2017-2023. Portland: Pesquisa de Mercado Aliada.
- ERTIRO, B. T., TWUMASI-AFRIYIE, S., BLÜMMEL, M., FRIESEN, D., NEGERA, D., WORKU, M., ABAKEMAL, D. AND KITENGE, K. (2013) Genetic variability of maize stover quality and the potential for genetic improvement of fodder value. *Field Crops Research*, 153, 79-85.
- Faria, M.V., Mendes, M.C., Rossi, E.S., Possatto Junior, O., Rizzardi, D.A., Gralak, E., Silva, C.A., Faria, C.M.D.R. (2015) Análise dialéctica da produtividade e do progresso da severidade de doenças foliares em híbridos de milho em duas densidades populacionais. *Semin. Cienc. Agrar.* 36: 123-134.
- Ferreira, C. M., Saluci, J. C. G., Vivas, M., Santos, J. S., de Andrade Junior, M. S., Vivas, J. M. S., Gravina, G. A. (2022). Characterization of the *Bipolaris maydis*: symptoms and pathogenicity in popcorn genotypes (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Biology*, 84.

- Fernandes, M. D. O., Bianchi, P. A., Silva, L. R. A. D., Vianna, L. S., Santos, E. A., & Moulin, M. M. (2018). Morpho-agronomic characterization and analysis of genetic divergence among accessions of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Ciência Rural*, 48(11).
- Freitas Júnior, S.P., Amaral Júnior, A.T., Rangel, R.M., Viana, A.P. (2009) Genetic gains in popcorn by full-sib current selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 1-7.
- Gethi, J.G., Labate, J.A., Lamkey, K.R., Smith, M.E., Kresovich, S. (2002) SSR variation in important US maize inbred lines. *Crop science*, 42(3):951-957.
- Gonçalves, M. E. M. P., Gonçalves Júnior, D., Silva, A. G., Campos, H. D., Simon, G. A., Santos, C. J. L., Sousa, M. A. (2012) Viabilidade do controle químico de doenças foliares em híbridos de milho no plantio de safrinha. *Nucleus*, v. 9, n. 1, p. 49-61.
- Guimarães, A.G. (2016). *Ganhos genéticos por seleção recorrente e estreitamento genético na população UENF 14 de milho-pipoca por marcadores SSR-ESTs*. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 89 p.
- Guimarães, A. G., Amaral Júnior, A. T. D., Almeida Filho, J. E. D., Pena, G. F., Vittorazzi, C., Pereira, M. G. (2018). Estrutura populacional e impacto da seleção recorrente em milho-pipoca por marcadores SSR-EST. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 40.
- Hallauer AR, Carena MJ, Miranda Filho JD (2010) Quantitative genetics in maize breeding. Springer Science & Business Media, 6(1).
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento de safras. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php>>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- Kamphorst, S.H., Amaral Junior, A.T., Vergara-Diaz, O., Gracia-Romero, A., Fernandez-Gallego, J. A., Chang-Espino, M.C., Buchailot, M.L., Rezzouk, F.Z., Lima, V.J., Serret, M.D., Ortega, J.L.A. (2022) Heterosis and reciprocal effects

- for physiological and morphological traits of popcorn plants under different water conditions. *Agricultural Water Management*, 261:1-14.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Hartings, H., Berardo, N., Mazzinelli, G.F., Valoti, P., Verderio, A., Motto, M. (2008) Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP. *Theor Appl Genet*, v.117, p.831–842.
- Hoseney, R., Zeleznak, K., Abdelrahman, A. (1983) Mechanism of popcorn popping. *Journal of Cereal Science*, v. 1, n. 1, p. 43-52.
- Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J., Zehr, B.E. (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding*, 1: 365-373.
- Koo, D.H., Jiang, J. (2008) Extraordinary Tertiary Constrictions of *Tripsacum dactyloides* Chromosomes: Implications for Karyotype Evolution of Polyploids Driven by Segmental Chromosome Losses. *Genetics* 179: 1119–1123.
- Kurosawa, R.N.F., Amaral Junior, A.T., Vivas, J.M.S., Vivas, M., Kamphorst, S.H., De Lima, V.J., Almeida, R.N. (2020) Selection of popcorn hybrids resistant to southern corn leaf blight grown in distinct N availability. *European Journal of Plant Pathology*, 157(1).
- Larish, L. B., Brewbaker, J. L. (1999) Diallel analyses of temperate and tropical popcorn. *Maydica*, Bergamo, v. 44, 279-284.
- Leal, A., Mangolin, C., do Amaral Júnior, A., Gonçalves, L., Scapim, C., Mott, A., Eloi, I., Cordovés, V., Da Silva, M. (2010) Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genet Mol Res*, v. 9, p.9-18.
- Leng, Y., Lv, C., Li, L., Xiang, Y., Xia, C., Wei, R., Lan, H. (2019) Heterotic grouping based on genetic variation and population structure of maize inbred lines from

- current breeding program in Sichuan province, Southwest China using genotyping by sequencing (GBS). *Molecular Breeding*, 39(3):1-19.
- Lima, V.J., Viana, A.P., Amaral Júnior, A.T., Kamphorst, S.H., Leite, J.T., Santos, P.H.A.D., Bispo, R.B., Santos, T.O. (2020). Exploring the use of testers to maximize selection accuracy of partially inbred S3 popcorn progenies. *Rev. Bras. Cienc. Agrar.* 15, 1–11.
- Lima, V.J., Amaral Júnior, A.T., Kamphorst, S.H., Bispo, R.B., Leite, J.T., Santos, T.D.O., Guimarães, L.J.M. (2019) Combined dominance and additive gene effects in trait inheritance of drought-stressed and full irrigated popcorn. *Agronomy*, 9(12):782.
- LIU, B.H. (1997) Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton: CRC Press, 611p.
- Luz, M.L.S., DalpasqualE, V.A., Scapim, C.A., Braccini, A.L., Royer, M.R., Mora, F. (2005) Influência da umidade das sementes na capacidade de expansão de três genótipos de milho-pipoca (*Zea mays* L.). *Acta Scientiarum-Agronomy*, 27:549-553.
- Mangelsdorf, P. C. (1974) Corn its origin, evolution and improvement. Cambridge: Harvard University, p. 262.
- Matta, P.P., Viana, J.M.S. (2001) Testes de capacidade de expansão em programas de melhoramento de milho-pipoca. *Scientia Agricola*, 58: 845-851.
- Meireles, P.G. (2009) *Divergência genética entre linhagens de milho estimada por microssatélites e correlação com desempenho de híbridos simples*. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia).
- Miranda, G. V., Coimbra, R. R., Godoy, C. L., Souza, L. V., Guimarães, L. J. M., Melo, A. V. (2003) Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.681–688.
- Moterle, L. M., dos Santos, R. F. (2019) Época de aplicação de fungicida na cultura do milho segunda safra. *Colloquium Agrariae*. 15: 61-71.

- Moterle, L. M., Braccini, A. D. L., Scapim, C. A., Pinto, R. J. B., Gonçalves, L. S. A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T. (2012) Combining ability of popcorn lines for seed quality and agronomic traits. *Euphytica*, v. 185, n. 3, p. 337-347.
- Muller, B. S., Sakamoto, T.; Menezes, I. P. P., Prado, G. S., Martins, W. S., Brondani, C., Barros, E. G., Vianello, R. P. (2014) Analysis of BAC end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs SSRs. *Biologia Molecular de Plantas*, v. 86, n. 45, p. 455-470.
- Mundim, G.B., Viana, M.S., Maia, C., Paes, G.P., Delima, R.O., Valente, M.S.F. (2015) Inferring tropical popcorn gene pools based on molecular and phenotypic data. *Euphytica*, v.202, p. 55-68.
- Munhoz, R. E. F., Priori, A. J., Amaral Júnior, A. T., Scapim, C. A., Simon, G. A. (2009) Genetic distances among popcorn populations based on molecular marker and the correlations with the heterosis estimates on the hybrids made by diallel analysis. *Genetics and Molecular Research*, v.8, p.321-328.
- Narro, T., Medina, A., Vencovsky, R. (2017) Selección para incrementar rendimiento y resistencia a pudrición de mazorca en maíz amiláceo. *Arch. Académicos USFQ*, 9: 65.
- Oz, A., Kapar, H. (2011) Determination of grain yield, some yield and quality traits of promising hybrid popcorn genotypes. *Turkish Journal of Field Crops*, 16: 233-238.
- Paraginski, R.T., De Souza, N.L., Alves, G.H., Ziegler, V., De Oliveira, M., Elias, M.C. (2016) Sensory and nutritional evaluation of popcorn kernels with yellow, white and red pericarps expanded in different ways. *Journal of Cereal Science* 69:383–391.
- Parsons, L., Rodriguez, O., Holding, D.R. (2021) Improved taste and texture in novel popcorn varieties compared to conventional lines. *Journal of Sensory Studies*, e12687.
- Paterniani, E.; Campos, M.S. (2005) *Melhoramento do milho*. In: BORÉM, A. (ed.). *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: UFV, p. 491-552.

- Paula, T. O. M., Gonçalves, L. S. A., Amaral Júnior, A. T. (2010) Magnitude of the genetic base of commercial popcorn and in recommendation in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.10, p.289–297.
- Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T. (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. *Crop breeding and Applied biotechnology*, 1(1).
- Rajendran, A., Muthiah, A., Joel, J., Shanmugasundaram, P., Raju, D. (2014) Heterotic grouping and patterning of quality protein maize inbreds based on genetic and molecular marker studies. *Turkish Journal of Biology*, 38: 10-20.
- Ramos, H.C.C., Pereira, M.G., Pereira, T.N.S., Barros, G.B.A., Ferreguetti, G.A. (2014) Genetic-molecular characterization of backcross generations for sexual conversion in papaya (*Carica papaya* L.). *Genetics and Molecular Research*, 13(4): 10367-10381.
- Ramu, P., Billot, C., Rami, J.F., Senthilvel, S., Upadhyaya, H.D., Ananda, R. L., Hash, C.T. (2013) Assessment of genetic diversity in the sorghum reference set using EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 126:2051– 2064.
- Ren Y., Yobi A., Marshall L., Angelovici R., Rodriguez O. and Holding D. R. 2018. Generation and evaluation of modified *opaque-2* popcorn suggests a route to quality protein popcorn. *Front. Plant Sci.*, 9: 1803. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01803>.
- Ribeiro RM, Amaral Júnior ATD, Pena GF, Vivas M, Kurosawa RN, Gonçalves LSA (2016) History of northern corn leaf blight disease in the seventh cycle of recurrent selection of an UENF-14 popcorn population. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38:447-455.
- Santos JS, Souza Y P, Vivas M, Amaral Junior AT, Almeida Filho JE, Mafra GS, Viana AP, Gravina GA, Ferreira FRA (2020) Genetic merit of popcorn lines and hybrids for multiple foliar diseases and agronomic properties. *Functional Plant Breeding Journal*, 2:33-47.
- Santos, J.S., Teixeira, A., Amaral, D.O., Vivas, M., Vivas, J.M.S., Nascimento, R., Kurosawa, F., Felipe, S. (2016) Características culturais e patológicas de

- Bipolaris maydis* em diferentes meios de cultura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 15(3):461-469.
- Sawazaki, E. (2001) A cultura do Milho-pipoca no Brasil. *O Agrônomo*, Campinas, 53: 11-13.
- SAWAZAKI, E. Milho-pipoca. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo. http://www.abms.org.br/eventos_antteriores/cnms2010/palestras/010.pdf. 2010. Accessed 17 april 2019.
- Schegoscheski Gerhardt IF, Amaral Junior AT, Ferreira Pena G, Guimarães, LJM, de Lima VJ, Vivas M, Kamphorst SH (2019) Genetic effects on the efficiency and responsiveness to phosphorus use in popcorn as estimated by diallel analysis. *PloS one*, 14(5).
- Serafini, L.A., Barros, M.N., Azevedo, J.L. (2001) *Biotechnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Livraria e editora Agropecuária Ltda., 463b.
- Scapim, C. A., Pacheco, C. A. P., Tonet, A., Braccini, A. L. E., Pinto, R. J. B. (2002) Análise dialélica e heterose de populações de milho-pipoca. *Bragantia*, v. 61, n. 3, p. 219-230.
- Silva, M. J., Pastina, M. M.; Souza, V. F.; Schaffert, R. E.; Carneiro, P. C. S.; Noda, R. W.; Carneiro, J. E. S.; Damasceno, C. M. B.; Parrella, R A. C. (2017) Phenotypic and molecular characterization sorghun accessions for bionergy. *Plos One*.
- Silva, T.A., Cantagalli, L.B., Saavedra, J., Lopes, A.D., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P.S., Scapim, C.A. (2015) Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. *Eletronic Journal of Biotechnology*, v.18, p.181-187.
- Silva, T. R.C., do Amaral Júnior, A. T., de Almeida Filho, J. E., Freitas, M. S. M., Guimarães, A. G., Kamphorst, S. H. (2019). Contrasting phosphorus environments as indicators for popcorn breeding lines. *Functional Plant Breeding Journal*, 1(1).

- Teixeira, F.F., dos Santos Trindade, R. (2021) Recursos genéticos de milho: importância e uso no melhoramento. *Revista Ifes Ciência*, 7(3):01-22.
- Terra, T.F., Wietholter, P., Almeida, C.C., Anjos e Silva, S.D., Bered, F., Sereno, M.J.C.M., Barbosa Neto, J.F. (2011) Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. *Ciência Rural*, 41:205-211.
- Vendruscolo, E.C.G., Scapim, C.A., Pacheco, C.A.P., Oliveira, V.R., Braccini, A.L., Vidigal, M.C.G. (2000) Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho-pipoca na região centro-sul do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.123-130.
- Vittorazzi, C. (2016). *Grupos heteróticos em germoplasma de Milho-pipoca*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF – Campos dos Goytacazes - RJ. 71p.
- Wu, X., Li, Y., Shi, Y., Song, Y., Wang, T., Huang, Y., Li, Y. (2014) Fine genetic characterization of elite maize germplasm using high-throughput SNP genotyping. *Theor Appl Genet* 127:621–631.
- Zhang, M., Mao, W., Zhang, G., Wu, F. (2014) Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley . *Plos One*, China, v. 9, 2014.
- Ziegler, K. E.; Ashman, B. (1994) Popcorn. In: Hallauer, A. R. (Ed.). Specialty corns. Iowa: CRC, p. 189-223.
- Zinsly, J.R., Machado, J.A. (1987) Milho-pipoca. In: Paterniani, E.; Viegas, G.P. (eds.). Melhoramento e produção do milho. Campinas: Fundação Cargill, p. 413-717.
- Zunjare R., Hossain F., Muthusamy V., Choudhary M., Kumar P., Sekhar J. C., Guleria S. K., Singh N. K., Nepolean T. and Gupta H. S. (2015). Popping quality attributes of popcorn hybrids in relation to weevil (*Sitophilus oryzae*) infestation. *Indian J. Genet.*, 75: 510-513. <http://dx.doi.org/10.5958/0975-6906.2015.00081.4>.

APÊNDICE

Tabela 1A. Análise descritiva da variabilidade genética dos 172 genótipos analisados de milho-pipoca Na: número de alelos observados; H_E : heterozigosidade esperada; H_O : heterozigosidade observada; e F: índice de fixação

Genótipos	Locos	Na	H_E	H_O	F
P1	16	2	0.492	0.000	1.000
P2	16	3	0.555	0.000	1.000
P3	16	3	0.555	0.000	1.000
P4	16	3	0.555	0.000	1.000
P5	16	3	0.508	0.000	1.000
P6	16	3	0.555	0.000	1.000
P7	16	3	0.555	0.000	1.000
P8	16	2	0.469	0.000	1.000
P9	16	3	0.461	0.000	1.000
P10	16	2	0.469	0.000	1.000
L52	16	2	0.469	0.000	1.000
L54	16	2	0.469	0.000	1.000
L61	16	2	0.492	0.000	1.000
L63	16	3	0.531	0.000	1.000
L66	16	3	0.555	0.000	1.000
L70	16	2	0.500	0.000	1.000
L71	16	2	0.492	0.000	1.000
L74	16	2	0.492	0.000	1.000
L75	16	2	0.469	0.000	1.000
L76	16	2	0.500	0.000	1.000
L77	16	2	0.492	0.000	1.000
L80	16	2	0.492	0.000	1.000
L88	16	2	0.430	0.000	1.000
L201	16	2	0.375	0.000	1.000
L202	16	2	0.469	0.000	1.000
L203	16	2	0.469	0.000	1.000
L204	16	2	0.469	0.000	1.000
L205	16	2	0.492	0.000	1.000
L206	16	2	0.500	0.000	1.000
L207	16	2	0.492	0.000	1.000
L208	16	3	0.555	0.000	1.000
L209	16	3	0.555	0.000	1.000
L212	16	2	0.492	0.000	1.000
L213	16	2	0.500	0.000	1.000
L214	16	2	0.492	0.000	1.000
L215	16	2	0.492	0.000	1.000
L216	16	2	0.500	0.000	1.000
L217	16	3	0.555	0.000	1.000
L219	16	3	0.539	0.000	1.000
L220	16	2	0.469	0.000	1.000
L221	16	2	0.492	0.000	1.000

Tabela 1A. Cont.

Genótipos	Locos	Na	H_E	H_O	F
L222	16	2	0.492	0.000	1.000
L231	16	2	0.469	0.000	1.000
L232	16	3	0.555	0.000	1.000
L234	16	2	0.500	0.000	1.000
L236	16	2	0.430	0.000	1.000
L237	16	2	0.492	0.000	1.000
L238	16	2	0.430	0.000	1.000
L241	16	2	0.492	0.000	1.000
L261	16	2	0.469	0.000	1.000
L263	16	3	0.539	0.000	1.000
L265	16	2	0.492	0.000	1.000
L266	16	2	0.492	0.000	1.000
L268	16	2	0.469	0.000	1.000
L270	16	3	0.539	0.000	1.000
L271	16	2	0.500	0.000	1.000
L272	16	2	0.492	0.000	1.000
L273	16	2	0.492	0.000	1.000
L274	16	2	0.469	0.000	1.000
L291	16	3	0.508	0.000	1.000
L293	16	2	0.469	0.000	1.000
L294	16	3	0.555	0.000	1.000
L295	16	2	0.492	0.000	1.000
L296	16	3	0.461	0.000	1.000
L297	16	2	0.492	0.000	1.000
L298	16	2	0.500	0.000	1.000
L321	16	2	0.469	0.000	1.000
L322	16	2	0.469	0.000	1.000
L324	16	2	0.500	0.000	1.000
L325	16	2	0.469	0.000	1.000
L326	16	2	0.492	0.000	1.000
L328	16	2	0.492	0.000	1.000
L330	16	2	0.469	0.000	1.000
L332	16	2	0.469	0.000	1.000
L351	16	2	0.469	0.000	1.000
L352	16	3	0.555	0.000	1.000
L353	16	2	0.469	0.000	1.000
L354	16	2	0.492	0.000	1.000
L357	16	2	0.500	0.000	1.000
L358	16	3	0.508	0.000	1.000
L359	16	3	0.602	0.000	1.000
L360	16	3	0.555	0.000	1.000
L361	16	3	0.539	0.000	1.000
L363	16	2	0.469	0.000	1.000
L364	16	3	0.555	0.000	1.000

Tabela 1A. Cont.

Genótipos	Locos	Na	H_E	H_O	F
L365	16	3	0.539	0.000	1.000
L366	16	3	0.555	0.000	1.000
L367	16	2	0.492	0.000	1.000
L368	16	2	0.492	0.000	1.000
L369	16	3	0.539	0.000	1.000
L381	16	2	0.492	0.000	1.000
L382	16	2	0.500	0.000	1.000
L383	16	2	0.469	0.000	1.000
L384	16	2	0.375	0.000	1.000
L385	16	2	0.430	0.000	1.000
L386	16	2	0.492	0.000	1.000
L387	16	2	0.500	0.000	1.000
L388	16	2	0.500	0.000	1.000
L389	16	2	0.469	0.000	1.000
L390	16	2	0.492	0.000	1.000
L391	16	2	0.492	0.000	1.000
L392	16	2	0.492	0.000	1.000
L393	16	3	0.555	0.000	1.000
L394	16	3	0.539	0.000	1.000
L395	16	2	0.469	0.000	1.000
L396	16	2	0.469	0.000	1.000
L411	16	3	0.461	0.000	1.000
L441	16	3	0.398	0.000	1.000
L443	16	3	0.555	0.000	1.000
L444	16	2	0.500	0.000	1.000
L471	16	2	0.500	0.000	1.000
L472	16	2	0.500	0.000	1.000
L473	16	2	0.430	0.000	1.000
L474	16	2	0.500	0.000	1.000
L475	16	2	0.375	0.000	1.000
L476	16	3	0.555	0.000	1.000
L477	16	3	0.555	0.000	1.000
L478	16	2	0.500	0.000	1.000
L480	16	2	0.469	0.000	1.000
L481	16	2	0.469	0.000	1.000
L482	16	2	0.492	0.000	1.000
L483	16	2	0.469	0.000	1.000
L501	16	2	0.492	0.000	1.000
L502	16	3	0.539	0.000	1.000
L503	16	3	0.555	0.000	1.000
L506	16	2	0.469	0.000	1.000
L507	16	3	0.602	0.000	1.000
L508	16	2	0.492	0.000	1.000
L509	16	2	0.469	0.000	1.000

Tabela 1A. Cont.

Genótipos	Locos	Na	H_E	H_O	F
L510	16	2	0.492	0.000	1.000
L511	16	2	0.500	0.000	1.000
L512	16	3	0.555	0.000	1.000
L513	16	2	0.469	0.000	1.000
L531	16	2	0.492	0.000	1.000
L532	16	2	0.492	0.000	1.000
L534	16	2	0.500	0.000	1.000
L535	16	2	0.430	0.000	1.000
L561	16	2	0.500	0.000	1.000
L562	16	2	0.500	0.000	1.000
L563	16	2	0.500	0.000	1.000
L591	16	2	0.492	0.000	1.000
L592	16	2	0.500	0.000	1.000
L593	16	3	0.539	0.000	1.000
L594	16	3	0.508	0.000	1.000
L623	16	2	0.500	0.000	1.000
L624	16	2	0.492	0.000	1.000
L625	16	2	0.469	0.000	1.000
L626	16	2	0.500	0.000	1.000
L627	16	2	0.492	0.000	1.000
L628	16	2	0.492	0.000	1.000
L629	16	2	0.500	0.000	1.000
L630	16	2	0.500	0.000	1.000
L651	16	2	0.500	0.000	1.000
L652	16	2	0.469	0.000	1.000
L653	16	2	0.492	0.000	1.000
L655	16	2	0.492	0.000	1.000
L656	16	2	0.500	0.000	1.000
L681	16	2	0.500	0.000	1.000
L682	16	2	0.492	0.000	1.000
L683	16	2	0.469	0.000	1.000
L684	16	2	0.492	0.000	1.000
L685	16	2	0.500	0.000	1.000
L686	16	2	0.500	0.000	1.000
L688	16	2	0.492	0.000	1.000
L689	16	2	0.500	0.000	1.000
L690	16	2	0.469	0.000	1.000
L691	16	3	0.555	0.000	1.000
L692	16	2	0.492	0.000	1.000
L693	16	2	0.500	0.000	1.000
L694	16	2	0.492	0.000	1.000
L695	16	3	0.555	0.000	1.000
L699	16	2	0.469	0.000	1.000
Médias	16	2	0.496	0.000	1.000