

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**ALFREDO VIEIRA MONTECELLI**

**Utilização de descritores morfológicos e moleculares na  
caracterização da divergência genética de linhagens de milho**

**MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
JULHO – 2011**

**ALFREDO VIEIRA MONTECELLI**

**Utilização de descritores morfológicos e moleculares na  
caracterização da divergência genética de linhagens de milho**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Alessandro Lucca Braccini.

**MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
JULHO – 2011**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Aos meus pais, Rosa Dulce Vieira Montecelli e Almir Montecelli, pelo apoio,  
carinho e confiança.

Com amor, dedico.

## AGRADECIMENTO

A Deus Todo Poderoso, pela presença paterna e amiga em toda a minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela acolhida e apoio durante todo o curso.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), por disponibilizar as instalações e recursos necessários à realização desse projeto;

Ao professor doutor Alessandro do Lucca e Braccini, pela orientação e oportunidade.

Ao professor doutor Carlos Alberto Scapim, pelos ensinamentos como meu Coorientador.

Ao Dr. Ivan Schuster, pelo incentivo e por compartilhar comigo os conhecimentos acadêmicos.

Ao Dr. Celso Gonçalves de Aguiar, pela amizade, incentivo e ensinamentos, sem os quais não teria alcançado o término deste trabalho.

À minha equipe de trabalho, sem a qual não seria possível implantar os ensaios e realizar as avaliações.

À minha família, por fazer parte de mim.

Aos meus amigos. A vida é muito frágil sem amigos. Obrigado a todos por compartilhar as dificuldades e comemorar comigo as alegrias.

## **BIOGRAFIA**

ALFREDO VIEIRA MONTECELLI, filho de Rosa Dulce Vieira Montecelli e de Almir Montecelli, nasceu em Londrina, estado do Paraná, no dia 6 de abril de 1981.

Concluiu o Ensino Fundamental e o Ensino Médio, respectivamente, em 1996 e 1999, no Colégio Universitário, na cidade de Londrina, estado do Paraná.

Concluiu o Curso de Graduação em Engenharia Agrônômica, em julho de 2001, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba, estado do Paraná.

Em março de 2009, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. A cultura do milho .....	3
2.2. Histórico e desenvolvimento dos híbridos de milho .....	4
2.3. Heterose ou vigor híbrido.....	7
2.4. Avaliação da capacidade de combinação de linhagens.....	8
2.5. Diversidade genética .....	10
2.6. Caracterização morfológica de milho.....	11
2.7. Marcadores moleculares.....	12
2.8. Estimativa da diversidade genética com a utilização de marcadores moleculares .....	15
2.9. Métodos preditivos para inferir a diversidade genética .....	17
2.10. Medidas de dissimilaridade e técnicas de agrupamento.....	18
2.10.1. Distância euclidiana.....	19
2.10.2 Métodos de agrupamento.....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1. Análise de agrupamento .....	26
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## RESUMO

MONTECELLI, Alfredo Vieira, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, julho de 2011. **Utilização de descritores morfológicos e moleculares na caracterização da divergência genética de linhagens de milho.** Professor Orientador: Alessandro Lucca Braccini. Coorientador: Carlos Alberto Scapim.

A análise da divergência genética por métodos preditivos tem sido utilizada como um dos critérios para a escolha de genitores em programas de melhoramento de plantas. Os objetivos deste trabalho consistiram em estimar a divergência genética entre linhagens de milho, utilizando dados morfológicos e moleculares e, por meio de técnicas de análise multivariada, verificar o relacionamento destes procedimentos e correlacionar os agrupamentos formados com grupos heteróticos previamente estabelecidos por meio de topcrosses. Os experimentos foram realizados na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), em Cascavel/PR. O experimento de campo foi conduzido na safra 2009/10, avaliando um conjunto de 46 linhagens-elite de milho. Foram avaliadas dez características morfológicas e utilizados dados moleculares de 44 marcadores microssatélites, compondo as matrizes de distâncias e medidas de dissimilaridade para as análises de agrupamento. As análises de agrupamento evidenciaram a divergência genética entre as linhagens de milho. Os coeficientes de correlação cofenética foram adequados para a avaliação dos agrupamentos, mas poucas concordâncias entre os métodos de agrupamento e os grupos heteróticos previamente formados puderam ser observadas. A utilização de métodos conjuntos que levem em consideração as características morfológicas e moleculares possibilita inferências complementares, constituindo informação relevante no planejamento de combinações para os cruzamentos de milho.

**Palavras-chave:** *Zea mays*; dissimilaridade; grupos heteróticos; análise multivariada.

## ABSTRACT

MONTECELLI, Alfredo Vieira, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, June 2011. **Use of morphological and molecular characterization of the genetic divergence of maize inbred lines.** Adviser: Alessandro Lucca Braccini. Committee Member: Carlos Alberto Scapim.

The analyses of genetic divergence, through predictive methods have been used as a criterion for the choice of parents in plant breeding programs. The objectives of the study were to estimate the genetic divergence among maize lines using morphological and molecular data, using multivariate analysis, check the relationship of these procedures and correlate the clusters formed with heterotic groups previously established by usual method topcross. The experiment was carried out at the Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec), in Cascavel / PR, the field experiment was conducted in 2009/10, evaluating a set of 46 elite maize lines. We assessed 10 morphological traits and used 44 SSR molecular markers to estimate the distance of matrix Euclidean measure for the cluster analysis. Cluster analysis showed the genetic divergence between maize lines. The cophenetic correlation coefficient was providing adequate assessment of groups, however, little agreement between the clustering methods with the previously formed heterotic groups could be observed. Thus, the combined use methods taking into account morphological and molecular enable realizations or further inferences, thus becoming relevant information in planning combinations for maize crosses.

**Keywords:** *Zea mays*, dissimilarity, heteroctic groups,

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de linhagens em programas de melhoramento genético de milho está associada à busca de heterose, fenômeno que proporciona grande produtividade em híbridos provenientes de parentais que exibem alta divergência entre si.

Após a obtenção de linhagens, uma das principais dificuldades dos programas de melhoramento de milho são os estudos da capacidade de combinação para a determinação de grupos heteróticos. Nesse contexto, entre as técnicas disponíveis, destacam-se os cruzamentos dialélicos e os topcrosses, que possibilitam avaliar, nos cruzamentos, os genótipos que apresentam boa capacidade de combinação. Esta é a etapa mais trabalhosa e onerosa dos programas de obtenção de híbridos na cultura do milho.

Uma das ferramentas que podem ser utilizadas para predizer, dentre um grande número de linhagens, as mais divergentes são as análises de divergência genética. Os estudos de divergência genética têm sido de grande importância em programas de melhoramento de milho, pois fornecem informações sobre parâmetros de identificação de genitores que possibilitam grande efeito heterótico e maior probabilidade de recuperar genótipos superiores nas progênies (Cruz e Regazzi, 1997).

A separação de linhagens em grupos permite visualizar com antecedência quais as melhores combinações, podendo assim evitar ou priorizar cruzamentos. Por dispensarem a obtenção de híbridos, os métodos preditivos têm alcançado considerável ênfase. Caracteres morfológicos e moleculares em associação com técnicas multivariadas têm sido amplamente utilizados para quantificação da distância genética em programas de melhoramento de plantas.

O emprego de marcadores moleculares em milho tem se mostrado muito importante na avaliação da diversidade genética entre linhagens e na determinação de grupos heteróticos. Entre as técnicas de análise de diversidade destacam-se os métodos de agrupamento que empregam medidas de dissimilaridade ou similaridades entre as linhagens (Machado, 1999).

Os objetivos deste trabalho foram estimar a divergência genética em 46 linhagens de milho, por meio de características morfológicas e moleculares;

verificar o relacionamento destes dois métodos e correlacionar os agrupamentos formados pelos métodos hierárquico de UPGMA e de otimização de Tocher com grupos previamente definidos por topcrosses.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A cultura do milho

O milho é uma planta pertencente à família Poaceae, Gênero *Zea* e espécie *Zea mays*. É taxonomicamente identificado como *Zea mays* L. ssp. *mays*, para distingui-lo do seu parente silvestre mais próximo, o teosinto, atualmente considerado da mesma espécie e com várias subespécies (Paterniani e Campos, 2005). É originário das Américas, onde por milhares de anos serviu a nações indígenas de diferentes regiões, propiciando o surgimento de inúmeras raças e constituindo assim uma ampla e diversa base genética. Pode ser encontrado material com ciclos que podem ir de dois meses até mais de um ano, variedades com grãos grandes (milho cuzco), ou minúsculos (milho pinto), material com espigas de 2,5 a 45 cm, entre outros (Fancelli, 1994).

Cultivado mundialmente entre as latitudes 58° norte e 40° sul, o milho está distribuído nas mais diversas altitudes e em localidades situadas desde abaixo do nível do mar até de 2.500 metros de altitude (Fancelli e Dourado Neto, 2000). A necessidade de adaptação a diferentes ambientes resultou em uma ampla variabilidade genética, caracterizada pela existência de cerca de 300 raças descritas, além de milhares de populações e amostras preservadas nos bancos de germoplasmas (Hallauer e Miranda Filho, 1995). É, sem dúvida, a principal espécie alógama cultivada, não só pela sua importância econômica, mas também pela sua importância em termos científicos e tecnológicos. Toda a base referente à genética e ao melhoramento de espécies alógamas foi desenvolvida com essa espécie (Araújo e Paterniani, 1999).

Devido à separação das inflorescências masculina e feminina (monoícia), ao número de sementes produzidas, à facilidade de manipulação, à natureza dos cromossomos e ao baixo número de cromossomos ( $n=10$ ), de acordo com Borém e Giúdice (2004), o milho constitui-se em excelente material para aplicação de estudos genéticos.

No contexto da agropecuária, o milho é um dos cereais de maior importância econômica. Em razão de sua ampla distribuição e adaptação geográfica, é cultivado em todos os continentes, tendo grande participação na alimentação humana e animal (Fancelli, 1994).

No Brasil, o milho é uma das espécies de plantas mais cultivadas. Está presente em todo o território nacional e, conforme estimativas da primeira e segunda safras de 2010/11, foi cultivado em 13,4 milhões de hectares, tendo produção de aproximadamente 56 milhões de toneladas e produtividade média de 4.156 kg/ha. O Estado do Paraná é o maior produtor deste cereal, com produção de 12,47 milhões de toneladas e produtividade média de 4.574 kg/ha. Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão como alimentação animal representa 70% do consumo deste cereal (Embrapa, 2002).

Além da importância econômica do milho como principal componente na alimentação de aves, suínos e bovinos, o milho cumpre papel técnico importante para a viabilidade de outras culturas, como a soja e o algodão, por meio da rotação de culturas, minimizando possíveis problemas com nematoides de galhas, nematoide do cisto da soja e doenças, como o mofo branco e outras, dando sustentabilidade para diferentes sistemas de produção em muitas regiões agrícolas do Brasil e do mundo (CIB, 2009).

## **2.2. Histórico e desenvolvimento dos híbridos de milho**

A hibridação, em sentido mais amplo, tem sido de interesse para o melhoramento de grande parte das espécies cultivadas, tanto para explorar o vigor do híbrido na geração  $F_1$  como para promover o aparecimento de variabilidade genética em populações (Miranda Filho e Nass, 2001).

A cultura do milho é, sem dúvida, o exemplo mais notável da utilização do processo da hibridação, devido ao fenômeno da heterose. O milho híbrido pode ser conceituado como a primeira geração do cruzamento entre linhagens endogâmicas e/ou variedades. Desta forma, é explorada ao máximo a heterose do cruzamento (Guimarães, 2007).

Existem diversos tipos de híbridos de milho, originados de parentais diferentes, conforme Quadro 1.

O interesse pela heterose teve início em 1877, com os trabalhos de autofecundação e cruzamentos realizados por Darwin, o qual foi influenciado por Beal a propor a utilização de cruzamentos intervarietais na produção comercial de

milho (Sprague e Eberhart, 1977). A manifestação da heterose na produção de grãos híbridos intervarietais foi muito estudada no início do século XX, porém a grande contribuição prática para a agricultura iniciou-se com os trabalhos básicos de Shull (1908, 1909) e East (1908) e a introdução dos híbridos duplos por Jones (1918 e 1922).

Quadro 1 – Tipos de híbridos e parentais que os originam

Híbridos	Parentais
Intervarietal	Variedade A x Variedade B
<i>Topcross</i>	Linhagem x Variedade
Híbrido simples	Lin. A x Lin. B
Híbrido simples modificado	(Lin. A x Lin. A') x Lin. B
Híbrido triplo	(Lin. A x Lin. B) x Lin. C
Híbrido triplo modificado	(Lin. A x Lin. B) x (Lin. C x Lin. C')
Híbrido duplo	(Lin. A x Lin. B) x (Lin. C x Lin. D)

Fonte: Paterniani e Campos (2005).

Em 1909, o botânico e geneticista norte-americano Shull observou que, quando se fecundava a planta com o próprio pólen, produziam-se descendentes menos vigorosos. Repetindo-se este processo nas sete ou dez gerações seguintes, os descendentes fixavam características agrônômicas importantes. As plantas, que geravam descendentes geneticamente semelhantes, passaram a ser chamadas de linhas puras. Shull notou que duas linhas puras diferentes, ao serem cruzadas entre si, produziam descendentes com grande vigor, chamado de vigor híbrido ou heterose, dando origem assim ao milho híbrido (CIB, 2009).

Shull (1908) sugeriu uma metodologia para seleção e produção comercial de híbridos, que consistia nas seguintes etapas: autofecundação, obtenção de linhas puras, realização de cruzamentos entre as linhagens e avaliação dos cruzamentos para seleção de genótipos superiores. Entretanto, devido ao baixo vigor das linhagens e à produção de baixas quantidades de sementes híbridas, a indústria sementeira não se desenvolveu (Machado, 2007).

Jones (1918) sugeriu a produção de híbridos duplos a partir de híbridos simples. Entre 1920 e 1930, nos Estados Unidos, foram sintetizados os primeiros híbridos duplos do mundo, mais produtivos e de maior estabilidade e tolerância a

condições ambientais adversas. Por volta de 1950, 100% da área plantada na Região do *Corn Belt* era cultivada com híbridos duplos (Hallauer, 1990).

Desde a metade da década de 1960, os híbridos simples vêm substituindo os duplos nos EUA e, atualmente, quase a totalidade dos híbridos cultivados são do tipo simples (Souza Sobrinho, 2001).

Os primeiros trabalhos de melhoramento com milho no Brasil tiveram início em 1932 no IAC - Instituto Agrônomo de Campinas, no estado de São Paulo, sendo o Brasil o segundo país a adotar o milho híbrido (Sawazaki e Paterniani, 2004). No IAC, Carlos Arnaldo Krug e colaboradores inicialmente conduziram trabalhos, procurando a obtenção de linhagens de milho Cateto, o mais popular entre os produtores. Mas os primeiros híbridos conseguidos a partir de 1939 não foram muito produtivos, embora mais produtivos que o milho Cateto. O cruzamento Cateto por Cateto deu origem ao primeiro híbrido duplo brasileiro, o H.3531 (Viégas, 1989).

Gladstone e Antônio Secundino, em 1935, iniciaram trabalhos de pesquisa com milho na Universidade Federal de Viçosa, produzindo, em 1938, o primeiro híbrido comercial, um cruzamento das variedades Cateto e Amarelão. Os trabalhos destes últimos pesquisadores tiveram continuidade com a fundação da companhia Sementes Agroceres S/A.

Antes da década de 1960, as cultivares de milho utilizadas, além de pouco produtivas, eram excessivamente altas, acamavam com facilidade e não suportavam altas densidades de semeadura. Com os trabalhos de melhoramento, mudanças expressivas foram registradas, não só na produtividade, mas também na redução do porte das plantas, produzindo, em consequência, maior adaptabilidade a condições de estresse hídrico, menor acamamento, maior resistência a doenças e pragas, aprimoramento da qualidade nutritiva dos grãos e demais caracteres importantes para a cultura (Sawazaki e Paterniani, 2004).

Borém (1998) salienta que a introdução do milho híbrido na década de 1920 constituiu-se em um dos maiores impulsos à agricultura moderna. Segundo o autor, o progresso do milho híbrido, aliado à melhoria das práticas culturais, contribuiu para o aumento não só da produtividade, mas também da qualidade da cultura.

### 2.3. Heterose ou vigor híbrido

A heterose pode ser definida como o vigor manifestado em cruzamentos entre indivíduos geneticamente divergentes, aumentando o valor dos caracteres quantitativos nos híbridos em relação aos pais (Suresh e Khanna, 1975). Para Falconer (1987) e Viégas e Miranda Filho (1978), a heterose em híbridos e linhagens é o inverso da depressão causada pela endogamia.

Existem, de acordo com Paterniani (1974), duas teorias para explicar a heterose: a da dominância, proposta por Davenport (1908), Bruce (1910) e Keeble e Pellew (1910), que explica a heterose pelo acúmulo, no híbrido, de genes dominantes provenientes de ambos os pais; e a teoria da sobredominância, proposta concomitantemente por Shull (1908) e East (1908), a qual explica a heterose pela própria condição heterozigótica dos locos que controlam o caráter. Assim, em cada “loco”, a condição heterozigótica seria superior a qualquer dos homozigotos.

Em relação ao milho, há fortes evidências de que a heterose nesta espécie é resultante do acúmulo de locos, com alelos expressando dominância parcial/completa (Hallauer et al., 1988). Smith e Smith (1989) relataram, em relação ao milho, que a heterose seria uma função de heterozigosidade em um número de locos.

Silva e Miranda Filho (2003) relatam que a heterose tem sido altamente explorada em programas de melhoramento de milho, identificando as populações divergentes que servirão de base para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas, posteriormente utilizadas em cruzamentos.

Estudos têm revelado que, quanto maiores os contrastes genéticos entre os progenitores escolhidos para as hibridações, maiores são as chances de aparecerem efeitos heteróticos entre os descendentes (Ronzelli Junior, 1996; Pinto et al., 2001). Segundo Stuber (1994), a exploração da heterose é uma das principais razões do sucesso das empresas de sementes, devido ao desenvolvimento de novas e melhores cultivares.

Grupo heterótico é um termo comumente usado pelos melhoristas de milho, porém não se encontra nenhuma definição clara e objetiva do significado dessa expressão na literatura. Esse termo foi estabelecido empiricamente por meio da relação da heterose observada nos cruzamentos envolvendo diferentes

cultivares de polinização aberta (Hallauer et al., 1988). Sua importância para os melhoristas reside no fato de que os cruzamentos entre grupos heteróticos distintos resultam em uma elevada heterose.

Os grupos heteróticos são formados com a inclusão de populações ou linhagens em grupos, de tal forma que, dentro de grupos, os cruzamentos não manifestam a heterose ou esta é muito baixa, enquanto entre grupos os níveis de heterose são elevados. Hallauer (1990) assinala que grupos heteróticos podem ser definidos como germoplasmas que, quando avaliados em combinações híbridas, exibem superioridade consistente, geralmente resultante de heterose.

No Brasil, um dos padrões mais explorados em programas de melhoramento de milho tem sido o cruzamento entre materiais de endosperma do tipo dentado e do tipo duro (Padilha, 2002). Borém (1998) afirma que o sucesso dos programas de melhoramento depende da eficiência de linhagens que, quando cruzadas, produzem híbridos superiores. O uso de linhagens de grupos heteróticos distintos evita a obtenção e avaliação de cruzamentos pouco promissores, pois desta forma é possível explorar a heterose.

#### **2.4. Avaliação da capacidade de combinação de linhagens**

A obtenção de linhagens e seu comportamento em combinações híbridas, assim como o potencial *per se*, é um dos objetivos básicos num programa de melhoramento genético de milho. A identificação de linhagens que tenham boa capacidade de combinação e, conseqüentemente, produzam bons híbridos, sempre foi um dos pontos de maior interesse dos melhoristas ao longo desses 80 anos de exploração do milho híbrido.

Era comum, até o final da década de 1920, avaliar todos os  $n(n-1)/2$  híbridos possíveis com um grupo de  $n$  linhagens, pois o número de linhagens disponíveis era pequeno. Contudo, com o aumento do número de linhagens nos programas de melhoramento, esse método se tornou inviável, pois o número de híbridos possíveis se elevava rapidamente, por isso novos métodos foram propostos para a identificação de combinações superiores. A utilização de topcross (Davis, 1927, Jenkins e Brunson, 1932), que consiste na avaliação dos cruzamentos de grande número de linhagens com um testador comum, foi o passo seguinte na tentativa de solucionar o problema.

Segundo Hallauer e Miranda Filho (1995), a utilização de topcross no melhoramento tem como objetivos: 1) a avaliação da capacidade de combinação de linhagens endogâmicas num programa de melhoramento de híbridos; e 2) a avaliação do valor genético dos genótipos da população a ser melhorada.

A predição do comportamento de híbridos duplos foi primeiramente proposta por Jenkins (1934), utilizando dados dos híbridos simples entre as linhagens envolvidas. Como o número possível de híbridos simples era menor entre linhagens de híbridos duplos, a metodologia tornou-se viável e tem sido empregada até hoje nos programas de obtenção de milho híbrido. Com a introdução do conceito de capacidade geral e específica de combinação, na década de 1940 (Sprague e Tatum, 1942), os esquemas de cruzamentos dialélicos começaram a ser estudados e muito contribuíram para a avaliação do comportamento de linhagens em cruzamento.

Dois tipos de habilidade de combinação podem ser reconhecidos: 1) a capacidade geral de combinação (CGC), que se refere à capacidade de um genótipo produzir progênies com dado comportamento, quando cruzado com uma série de outros genitores; e 2) a capacidade específica de combinação (CEC), que se refere ao comportamento de uma combinação específica, que pode desviar do comportamento esperado com base na CGC. Os conceitos da CGC e CEC são úteis na caracterização das linhagens em cruzamentos, sendo esta CGC associada principalmente a genes de efeito aditivo e a CEC dependente basicamente de genes de efeito não aditivo (dominância e epistasia).

Cruz e Regazzi (2001) descreveram as metodologias de análise dialélica, citando os vários tipos de dialélico, como dialélicos balanceados (completos ou de meia tabela), dialélicos parciais, dialélicos circulantes, dialélicos incompletos e dialélicos desbalanceados de acordo com a inclusão ou não dos genitores e híbridos recíprocos. O termo *dialélico* é utilizado para expressar as combinações possíveis de  $p(p-1)/2$  híbridos, resultantes do acasalamento entre  $p$  progenitores. Os modelos de Griffing (1956), Gardner e Eberhart (1966) e Hayman (1954) representam as bases para os estudos de agrupamento de genitores como, por exemplo, a estimativa da CGC e CEC.

Os cruzamentos dialélicos têm sido muito usados no melhoramento de milho e se mostrado eficientes para detectar divergências genéticas entre as

linhagens e alocar estas em grupos heteróticos distintos (Hallauer, 1990; Borém e Miranda, 2005).

Métodos de predição, envolvendo poucos cruzamentos, a previsão do rendimento dos híbridos com base apenas no conhecimento das linhagens progenitoras e a alocação dessas linhagens em grupos heteróticos estão entre os principais objetivos a serem alcançados pelos melhoristas.

## **2.5. Diversidade genética**

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

A avaliação da diversidade genética é muito utilizada pelos melhoristas de milho como um método alternativo para a seleção de germoplasma, além de possibilitar o arranjo de linhagens em grupos heteróticos que, quando inter cruzados, darão os melhores resultados (Souza, 2001). Este método visa a selecionar aqueles materiais mais promissores e diminuir os gastos e o tempo necessários para a realização de várias combinações híbridas, que seriam desnecessárias. Por isso os esforços se concentram nas combinações mais promissoras, ou seja, naquelas entre materiais mais divergentes.

Em um programa de melhoramento, o conhecimento da distância genética entre genótipos é muito útil, pois permite uma melhora na eficiência da amostragem e utilização de germoplasmas. Os melhoristas podem usar estas informações para tomar decisões importantes, como, por exemplo, a escolha de genótipos para o desenvolvimento de populações; ou para facilitar a identificação de diversos genitores para a obtenção de combinações híbridas, a fim de maximizar a expressão da heterose (Miranda et al., 2003).

Apesar de a divergência genética ser uma condição necessária para haver heterose, essa diversidade não é suficiente para que a heterose se manifeste, pois esta depende da magnitude das diferenças de frequências alélicas e da dominância para todos os locos envolvidos (Cress, 1966; Guo et al., 2006).

A predição da medida da distância genética, antes que qualquer cruzamento seja realizado, poderá ajudar os melhoristas a concentrar seus esforços apenas nas combinações mais heteróticas, pois a heterose manifestada nos cruzamentos pode estar diretamente relacionada à distância genética. De acordo com Melo (2000), quanto maior a divergência genética entre os materiais cruzados, maior será a heterose e, conseqüentemente, maior a produtividade.

A avaliação da distância genética pode ser obtida por meio das diferenças fisiológicas, morfológicas, agrônômicas e moleculares existentes entre genótipos, além de esta poder ser avaliada por meio da heterose ou da capacidade específica de combinação, manifestada numa série de cruzamentos entre as variedades e/ou híbridos.

## **2.6. Caracterização morfológica de milho**

Recursos genéticos são coletados não apenas para serem conservados, mas também para serem utilizados em um programa de melhoramento. Em ambos os casos, não basta ter a semente ou a planta, é necessário também ter informações sobre elas (Querol, 1993). As linhagens de milho devem ser devidamente caracterizadas, para permitir ganhos genéticos mais promissores, quando utilizadas pelos programas de melhoramento, e potencializar o uso destes recursos pelos agricultores (Coelho, 2007).

Para conhecer os acessos a serem explorados no melhoramento, é necessária a utilização de descritores morfoagronômicos. Os descritores de milho foram publicados pelo CYMMIT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo) e IBPGR, a atual *Biodiversity International*, órgão internacional responsável pela elaboração de descritores recomendados para várias espécies, entre elas *Zea mays* (L.) (IBPGR, 1991).

O CYMMIT emprega as seguintes definições na documentação e nomenclatura de recursos genéticos vegetais: i) dados de passaporte: são identificadores da amostra e informação registrada pelos coletores; ii) caracterização: consiste no registro daquelas características altamente hereditárias, facilmente observadas a olho nu e se expressam em todos os ambientes; iii) avaliação preliminar: consiste no registro de um número adicional

limitado de características tidas como convenientes por consenso dos utilizadores de determinada cultura.

A caracterização e a avaliação preliminar são de responsabilidade dos curadores, enquanto a caracterização e a avaliação avançada deverão ser realizadas pelos melhoristas. Os dados resultantes da avaliação avançada deverão ser enviados aos curadores, que manterão os registos adequados (Bioversity International, 2007).

Os principais descritores morfológicos para a cultura do milho são: altura da planta, forma da primeira folha, comprimento da haste principal do pendão, GDU (unidade de grau dia) para floração masculina, número de ramificações secundárias do pendão, ângulo da haste principal do pendão e da ramificação lateral, coloração do estigma pela antocianina, intensidade da coloração do estigma pela antocianina, comprimento da espiga, tipo de grão, cor da coroa do grão, entre outros (Brasil, 2010).

No processo de seleção de génotipos potencialmente úteis é comum o emprego de critérios morfológicos para identificação das variedades que podem apresentar grande diversidade fenotípica de forma ligada à diversidade genética de uma espécie cultivada (Jarvis, 2000).

## **2.7. Marcadores moleculares**

Marcadores moleculares têm sido sugeridos como ferramenta útil em vários aspectos do melhoramento de plantas, como a descrição de variedades, a construção de mapas genéticos, a medição das distâncias genéticas entre as linhagens e o próprio processo de seleção (Rumin e Vencovski, 2001).

A estimativa da diversidade genética, obtida pela análise das informações fornecidas por marcadores moleculares, tem aparecido com frequência nos trabalhos mais recentes. A diversidade genética pode ser estimada pelo uso de vários tipos de marcadores moleculares e analisada por um grande número de metodologias. Além de fornecerem informações seguras e precisas, os marcadores podem agilizar pesquisas, por possibilitarem a avaliação de um grande número de amostras de uma só vez.

Até meados da década de 60, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998), os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram

controlados por genes associados a caracteres morfológicos, como nanismo, deficiência de clorofila, cor da pétala; etc. Mais recentemente, os marcadores bioquímicos, principalmente as isoenzimas e as proteínas de reserva, têm sido utilizados na caracterização de germoplasma e, de forma mais limitada, na seleção indireta. Contudo, estes marcadores, assim como os marcadores morfológicos e citológicos, também existem em número limitado e com baixo nível de polimorfismo (Borém, 1998).

Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular e por meio de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético obtidos diretamente do DNA. A partir disso, o número de marcadores disponíveis passou a ser ilimitado, podendo estes ser obtidos em qualquer organismo vivo e a sua utilização é ampliada para a grande maioria das espécies até recentemente pouco estudadas (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

A aplicação das técnicas que fazem uso dos marcadores moleculares de DNA para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético resultou em grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas (Lanza et al., 2000).

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR– Polymerase Chain Reaction), concebida por Mullis e Fallona em meados da década de 80 (Mullis e Faloon, 1987), causou uma grande revolução na biologia, tanto nas pesquisas visando ao entendimento dos processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos de doenças e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (Souza, 2000).

A técnica da PCR consiste na síntese enzimática “in vitro” de um segmento de DNA, delimitado por um par de primers de sequências específicas de nucleotídeos de fita simples. Segundo esses autores, primers são sequências curtas de DNA, que pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese “in vitro” de uma nova fita de DNA. (Williams et al., 1990) e Welsh e McClelland (1990) introduziram, independentemente, a técnica do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ou RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) com o objetivo de utilizar iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária de nucleotídeos para dirigir a reação de amplificação, eliminando, assim, a necessidade do conhecimento prévio da sequência-alvo.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a técnica RAPD é basicamente uma variação da PCR com duas características distintas: 1) utilização de um único *primer* em vez de um par; 2) o *primer* único tem sequência arbitrária e, portanto, sua sequência-alvo é desconhecida. Para haver amplificação de um fragmento de RAPD no genoma analisado, duas sequências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (<4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a fixação exponencial de um segmento de DNA pela polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de agarose submetido à eletroforese.

Além das vantagens já descritas, os marcadores RAPD apresentam ainda vantagens adicionais, por serem tecnicamente mais acessíveis e Terem um custo mais baixo. Outra característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato de se comportarem como marcadores genéticos dominantes, embora a dominância neste caso não se refira ao conceito clássico de interação entre alelos de um mesmo loco, mas unicamente à interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Em trabalhos com milho citados por Souza (2001), a técnica RAPD tem sido utilizada para a identificação das linhagens genitoras de híbridos, estudos de diversidade e distância genética e identificação de polimorfismo e de alelos de resistência a pragas.

Outro tipo de marcador bastante utilizado é o marcador de microssatélite. Experimentos realizados no início dos anos 80 demonstraram a existência de sequências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*) em grande quantidade no genoma de eucariotos (Tautz e Renz, 1984). Estas sequências se tornaram mais conhecidas como microssatélites (Litt e Luty, 1989). A presença de microssatélites em plantas foi descrita pela primeira vez por Condit e Hubell (1991), sendo que o elemento repetido mais comumente encontrado entre as espécies vegetais é o di-nucleotídeo AT (Morgante e Olivieri, 1993).

Microssatélites ou SSR correspondem a sequências com poucos nucleotídeos, geralmente de duas a três bases repetidas em tandem (Smith et al., 1997). Estes podem ser detectados a partir de regiões do DNA, contendo sequências simples repetidas, as quais são amplificadas, via PCR, com a utilização de um par de *primers* específicos, de comprimento entre 20 e 30 pares

de bases, complementares a sequências únicas que flanqueiam as sequências simples repetidas.

Geralmente, os segmentos amplificados a partir destas regiões apresentam grande polimorfismo, resultante da presença de diferentes números de sequências simples repetidas. Cada região de microssatélite, independentemente da repetição, constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente no mesmo loco devido à alta taxa de mutação existente nestas regiões (Jarne e Lagoda, 1996). Este marcador tem sido amplamente utilizado por possuir caráter codominante, apresentar-se multialélico e contemplar o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Além disso, é possível avaliar regiões do genoma distribuídas em todos os cromossomos, fornecendo subsídios úteis ao melhorista na seleção básica de populações a serem utilizadas em programas de melhoramento, gerando informações de agrupamento de genótipos e planejamento de cruzamentos (Moraes et al., 2003).

Rafalski (2002) destacou que os microssatélites têm sido muito utilizados como marcadores, por apresentarem alto grau de informatividade, enquanto o RAPD tem sido utilizado devido à simplicidade da técnica. Contudo, escolha da melhor técnica a ser utilizada depende dos objetivos a serem atingidos, bem como da característica do material a ser analisado.

## **2.8. Estimativa da diversidade genética com a utilização de marcadores moleculares**

A estimativa da divergência genética obtida pela análise das informações fornecidas pelos marcadores moleculares é bastante frequente na literatura atual. Ela tem sido obtida por diferentes tipos de marcadores moleculares e analisada por grande quantidade de metodologias. Segundo Lanza et al. (2000), os genótipos são avaliados por meio dos marcadores e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas e as não comuns com diferenças genéticas. Os resultados são codificados de forma que gerem uma matriz de similaridade (ou dissimilaridade), que pode ser graficamente interpretada por meio de algumas técnicas multivariadas, como os métodos de agrupamento.

Kantety et al. (1995), trabalhando com dezenove linhagens elite de milho pipoca e oito linhagens de milho dentado, verificaram que, por meio de marcadores ISSR, foi possível agrupar esse material de acordo com os dados de *pedigree*. Os marcadores de ISSR foram efetivos em separar os genótipos em grupos heteróticos, podendo ser utilizado com grande eficiência nos programas de melhoramento genético.

Mediante à divergência genética obtida por RAPD, Lanza et al. (1997) alocaram em três diferentes grupos heteróticos dezoito linhagens de milho selecionadas a partir de duas variedades (BR-105 e BR-106). Esses autores verificaram que o RAPD pode ser usado como uma alternativa para determinar a divergência genética entre linhagens de milho, separando-as em grupos heteróticos diferentes, e auxiliar na escolha de cruzamentos superiores, reduzindo assim o número de cruzamentos requeridos nas avaliações de campo. Liu et al. (1998), analisando quinze linhagens utilizadas em programas de melhoramento, concluíram que marcadores de RAPD foram efetivos e concordantes com dados de *pedigree* na separação destas linhagens em grupos heteróticos.

Enoki et al. (2002), analisando 65 linhagens de milho adaptadas para regiões frias do Japão, concluíram que marcadores de regiões de microssatélites ou SSR foram efetivos para acessar a diversidade genética entre as linhagens e alocá-las em grupos heteróticos. Concordância entre dados de marcadores moleculares e *pedigree* é descrita também por Lu e Bernardo (2001), que analisaram oito linhagens elite. Com base em 83 alelos, foi possível agrupar as linhagens em dois grupos heteróticos distintos. Esses autores sugeriram que marcadores de SSR também podem ser utilizados na exploração da origem e, conseqüentemente, na organização de germoplasmas. Sun et al. (2001), comparando a diversidade genética entre 37 híbridos da região de Ontário, obtida por marcadores de RAPD e microssatélites, concluíram que estes se agruparam de acordo com os dados de *pedigree* e os valores de unidade de calor requeridos pelos híbridos.

Pejic et al. (1998) apresentaram um importante estudo comparativo entre marcadores moleculares em milho. Usando RFLPs, RAPDs, SSRs e AFLPs os autores concluíram que há diferenças no nível de polimorfismo revelado em cada uma deles. Os SSRs mostraram a maior taxa de polimorfismo, e os AFLPs, a menor, apesar de essa técnica ter sido considerada o sistema mais eficiente. Na

comparação com informações de *pedigree*, apenas os resultados obtidos com os RAPDs foram discrepantes, enquanto os demais se mostraram bem correlacionados, o que confirma a possibilidade de recuperação do *pedigree* a partir de dados moleculares.

Aguiar (2007) classificou pela divergência genética 30 linhagens de milho em grupos distintos utilizando marcadores moleculares microsatélites. Fernandes (2010), em estudo de diversidade de milho com base em divergência genética, classificou 46 linhagens de milho em três grupos distintos. Assim, o uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento tende a maximizar o uso dos recursos genéticos.

## **2.9. Métodos preditivos para inferir a diversidade genética**

A divergência genética, além de assegurar o melhoramento genético de uma população, possibilita a exploração da heterose (ou vigor híbrido), definida como a expressão genética dos efeitos benéficos da hibridação. Estudos têm revelado que, quanto maiores os contrastes genéticos entre os genitores escolhidos para as hibridações, maiores as chances de aparecerem efeitos heteróticos nos descendentes (Machado et al., 2002; Amorim, 2007; Arriel et al., 2007).

De acordo com a teoria da genética quantitativa descrita por Falconer (1987), em qualquer grau de dominância superior a zero, a heterose é uma função da frequência alélica entre os parentais e, portanto, existe uma correlação positiva entre divergência genética e heterose. Por este motivo, estimativas da divergência genética vêm sendo utilizadas como meio de predição de cruzamentos superiores.

A análise de diversidade genética, por meio de métodos preditivos, tem sido enfatizada como critério para a escolha dos progenitores em programas de melhoramento (Cruz e Regazzi, 1997). Para a quantificação da diversidade, têm sido amplamente utilizados métodos preditivos que se fundamentam nas diferenças agrônômicas e/ou morfológicas ou, ainda, bioquímicas e fisiológicas entre os genótipos. A grande vantagem destes métodos é a desnecessidade de obtenção prévia das combinações híbridas que, em certas situações, são difíceis, como no caso de se dispor de um número elevado de genótipos para avaliação

ou haver dificuldades na prática da hibridação artificial (Maluf et al., 1983; Cruz e Regazzi, 1997).

A seleção de genitores com base em características individuais não é tão interessante quanto a seleção baseada em um conjunto de características. Por isso, o aumento do uso de técnicas multivariadas para a quantificação da divergência genética tem sido verificado, uma vez que essas análises permitem considerar simultaneamente inúmeras características (Súdre et al., 2007).

Entre os métodos preditivos, destacam-se vários procedimentos estatísticos multivariados, como, por exemplo, a análise de agrupamento pelo método de Tocher, estimada pela distância de dissimilaridade (distância  $D^2$  de Mahalanobis e/ou distâncias euclidianas) e a análise por variáveis canônicas (Oliveira, 1998).

A escolha do método irá depender da precisão desejada pelo pesquisador, da facilidade da análise e da forma como os dados foram obtidos (Miranda et al., 1988; Cruz e Regazzi, 1997).

## **2.10. Medidas de dissimilaridade e técnicas de agrupamento**

O sucesso de um programa de melhoramento reside na existência de variabilidade da população de trabalho. Melhoristas têm recomendado, para formação da população-base, o intercruzamento de cultivares superiores e divergentes. Esta divergência pode ser avaliada a partir de características agrônômicas, morfológicas, moleculares e outras. As informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade existente no conjunto dos acessos estudados (Cruz e Carneiro, 2003).

As técnicas de agrupamento objetivam agrupar distintos indivíduos em classes, de forma que os mais semelhantes permaneçam na mesma classe. De forma geral, o número de classes não é conhecido inicialmente (Manly, 1994). Em geral os métodos de agrupamento envolvem duas etapas. A primeira relaciona-se com a estimativa de similaridade ou dissimilaridade entre os indivíduos ou itens a serem agrupados; a segunda envolve a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos.

Para a realização de tais técnicas, é necessária a escolha de uma medida que quantifique a semelhança entre dois indivíduos. Tais medidas são denominadas de coeficientes de similaridade e medidas de dissimilaridade. No caso da primeira, quanto maiores os valores observados, mais parecidos os indivíduos. Para as medidas de dissimilaridade, quanto maiores os valores, menos parecidos são os indivíduos (Cardoso, 2007).

Vários métodos multivariados podem ser aplicados na predição da dissimilaridade ou divergência genética em milho, dos quais os mais rotineiros são a *distância euclidiana média* e a de Mahalanobis ( $D^2$ ). Esta última é a preferida, mas pode ser estimada apenas quando se dispõe da matriz de covariâncias residuais estimadas a partir de experimentos com repetições (Sobral, 2010).

### **2.10.1. Distância euclidiana**

Considerada uma medida de dissimilaridade, a distância euclidiana é interpretada como a distância de dois indivíduos, cujas posições são determinadas em relação às suas coordenadas, definidas com referências a um grupo de eixos cartesianos que possuem ângulos retos entre si (Clifford e Stephenson, 1975).

Cruz e Carneiro (2003) registram que, considerando-se  $Y_{ij}$  a observação do  $i$ -ésimo genótipo para a  $j$ -ésima característica, define-se a distância euclidiana entre o par de genótipos  $i$  e  $i'$  por meio da expressão:

$$d_{ij} = [(x_{ia} - x_{ja})^2 + (x_{ib} - x_{jb})^2]^{1/2}$$

### **2.10.2 Métodos de agrupamento**

A análise de agrupamento é uma técnica importante no estudo de diversidade genética e, segundo Cruz e Regazzi (1997), tem por finalidade reunir e classificar os genótipos em vários grupos, de forma a obter homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos formados. Os métodos de agrupamentos mais utilizados em programas de melhoramento genético de plantas têm sido os hierárquicos e os de otimização. Nos métodos hierárquicos,

os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, estabelecendo um dendrograma; nos de otimização, é realizada a partição do conjunto de genótipos em subgrupos mutuamente exclusivos, por meio da maximização ou minimização de uma medida preestabelecida (Cruz e Regazzi, 1997).

Nos métodos hierárquicos (Cruz e Regazzi, 2001) existem três formas distintas de representar a estrutura de agrupamento com base na distância entre os pares de genótipos: a) a utilização da média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, método denominado de distância média (UPGMA); b) a utilização da menor distância existente entre um par de genótipos, método denominado de método do vizinho mais próximo ou de ligação simples; c) a utilização da maior distância existente entre um par de genótipos, método denominado método vizinho mais distante ou de ligação completa. Cabe ao pesquisador adotar a forma que melhor represente a estrutura de agrupamento esperada com base no seu conjunto de dados (Bertan et al., 2006).

Os métodos hierárquicos são os mais amplamente difundidos (Siegmund et al., 2004). O método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) é o mais utilizado em diversidade. Trata-se de um método não ponderado de agrupamento aos pares e que possui vantagem sobre os demais métodos, uma vez que considera as médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos (máximo e mínimo) entre indivíduos considerados (Cruz e Carneiro, 2003).

Um dos mais empregados na área de genética e melhoramento entre os métodos de otimização é o método de otimização de Toucher (Cruz e Carneiro, 2003). Neste método, é adotado o critério de se manter a distância média intragrupos sempre inferior a qualquer distância intergrupos. Por este método, é identificado o par de genótipos que apresenta o menor valor de distância ( $d_{ij}$ ) na matriz de dissimilaridade, que formará o grupo inicial. Em seguida, é avaliada a possibilidade de incluir outros genótipos nesse grupo inicial. A entrada de um genótipo num grupo aumenta o valor médio da distância intragrupo (RAO, 1952).

Considerando que cada um destes critérios possui suas vantagens e desvantagens para quantificar a divergência genética, a escolha do método mais adequado tem sido determinada de acordo com a cultura e os objetivos do

pesquisador, pela facilidade da análise e pela forma como os dados foram obtidos (Miranda et al., 1988; Cruz et al., 1994). Além disso, diversos métodos com base em diferentes medidas de dissimilaridade podem levar a distintos padrões de agrupamento (Cruz e Regazzi, 2001). Para se obter genótipos superiores aos genitores, os melhoristas têm utilizado genitores que apresentam altas médias e ampla diversidade genética para as características de interesse econômico (Allard, 1960; Vieira, 1964).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 46 linhagens do programa de melhoramento de milho da Coodetec, codificadas em LIN\_1 a LIN\_46. Os grupos heteróticos destas linhagens foram anteriormente definidos a partir de ensaios topcrosses realizados em experimentos conduzidos em safras anteriores nas estações experimentais da Coodetec em Cascavel e Palotina - PR. A caracterização molecular destas linhagens foi realizada em trabalho anterior com a utilização de 44 primers microssatélites (Fernandes, 2010).

O experimento para caracterização morfológica das linhagens foi conduzido na estação experimental da Coodetec, no município de Cascavel-PR (Lat. S 24° 52' 56,9"; Long. W 53° 32' 00,4" e altitude 690m) na safra 2009/10.

As 46 linhagens foram semeadas manualmente em 10 de novembro de 2009, em parcelas compostas por quatro linhas de cinco metros de comprimento e 0,70 metro de espaçamento, semeando-se duas sementes por cova. O espaçamento entre as covas na linha foi de 0,25 metro. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com duas repetições.

O desbaste foi realizado quando as plantas estavam em V3 (três folhas expandidas), deixando-se apenas uma planta por cova. A adubação utilizada foi 300 kg/ha da formulação 08-28-16 (N-P-K) na base e 200 kg de ureia em cobertura; os tratamentos fitossanitários foram utilizados conforme as necessidades e as indicações para a cultura. Foram avaliadas dez características morfológicas utilizadas como descritores oficiais da cultura do milho (Brasil, 2010), as quais foram coletadas em cada parcela durante o ciclo da cultura (Quadro 2).

Fernandes (2010), anteriormente, estimou a diversidade genética das 46 linhagens, a partir dos dados de marcadores moleculares microssatélites, e a distância genética foi calculada pelo complemento do coeficiente de coincidência simples, para dados codominantes multialélicos. Esse índice foi obtido por meio da divisão do total de alelos comuns entre duas linhagens pelo número total de alelos avaliados em cada indivíduo, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$S = \frac{N}{2L}$$

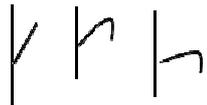
em que:

S é o índice de similaridade

N é o número de alelos comuns

L é o número de “loco”s avaliados.

Quadro 2 - Características morfológicas avaliadas em 46 linhagens de milho. Cascavel, PR, 2009/10

Variável	Descrição das notas	
AF	<p>Ângulo entre a lâmina foliar e o caule medido logo acima da espiga superior- ( 1 -pequeno, - 2 -médio - 3 -grande)</p>  <p>- 1 - 2 - 3</p>	
CF	<p>Comportamento da lâmina foliar acima da espiga superior (1-reta - 2 - Recurvada - 3 - fortemente recurvada)</p>  <p>- 1 - 2 - 3</p>	
CH	<p>Comprimento da haste principal do pendão, medido entre o ponto de origem e o ápice da haste central (1-curto 2-médio 3-longo)</p> <p>1 - curto = &lt; 40 cm 2-médio = 40 cm - 3 longo = &gt; 40cm</p>	
AH	<p>Ângulo entre a haste principal do pendão e a ramificação lateral, no terço inferior do pendão (1=pequeno - 2=médio - 3=grande)</p>  <p>- 1 - 2 - 3</p>	
CE	Coloração do estigma pela antocianina	1-presente 2-ausente
CP	Coloração do pendão	1-verde 2-róseo 3-roxo
CS	Coloração do sabugo	1-branco 2-roxo
TG	Textura do grão	1=duro (flint) 2=semi duro 3=semidentado 4=dentado
CG	Coloração do grão	1=amarelo; 2=alaranjado; 3=laranja
EPH	Empalhamento	1=baixo - 2=médio - 3=alto

O milho é uma espécie diploide, então o número total de alelos avaliados em cada indivíduo é duas vezes o número de locos avaliados, pois cada indivíduo possui dois alelos em cada loco.

O índice de dissimilaridade (D) foi obtido então por:  $D=1-S$ .

Para estimar a distância genética a partir dos dados morfológicos determinou-se distância euclidiana (Cruz e Carneiro, 2003) entre as 46 linhagens de milho. As matrizes das distâncias dos dados morfológicos e moleculares foram utilizadas para análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher e hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*). As análises de agrupamento foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2001).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos principais interesses de um programa de melhoramento genético de milho fundamenta-se na obtenção de populações com ampla variabilidade genética. A caracterização morfológica realizada nas 46 linhagens de milho permitiu observar a existência de variabilidade fenotípica para todas as características morfológicas avaliadas (Quadro 3).

Quadro 3 - Avaliação dos descritores morfológicos de 46 linhagens de milho

Linhagem	Notas									
	AF	CF	CH	AH	CE	CP	CS	TG	CG	EPH
Lin_01	2	2	1	2	2	1	1	1	3	3
Lin_02	1	2	1	2	1	3	1	3	3	3
Lin_03	1	2	2	1	2	1	1	1	3	2
Lin_04	2	1	1	1	1	2	1	1	3	3
Lin_05	1	3	1	1	1	1	1	1	3	2
Lin_06	1	1	2	1	1	3	1	3	2	2
Lin_07	2	1	1	1	1	3	1	2	3	3
Lin_08	2	1	1	1	1	3	1	2	3	3
Lin_09	2	3	1	2	2	1	1	1	3	2
Lin_10	2	2	1	1	2	1	1	1	2	3
Lin_11	1	1	1	1	2	1	1	1	3	3
Lin_12	3	2	1	1	1	1	1	1	3	3
Lin_13	3	1	1	1	2	3	2	4	1	2
Lin_14	2	2	1	1	2	2	1	4	1	3
Lin_15	1	1	1	3	2	2	1	2	3	3
Lin_16	2	1	1	1	1	2	1	2	3	3
Lin_17	1	1	2	1	2	2	1	1	3	3
Lin_18	2	2	1	1	2	2	1	3	3	2
Lin_19	1	2	1	1	1	2	2	1	3	3
Lin_20	2	2	1	2	2	2	1	2	3	2
Lin_21	2	2	1	1	2	1	1	1	3	2
Lin_22	3	2	1	1	2	1	1	1	3	1
Lin_23	3	3	1	1	2	2	1	1	3	3

Quadro 3, cont.

Lin_24	2	2	1	3	2	2	1	1	3	3
Lin_25	2	1	1	1	1	2	1	1	3	1
Lin_26	3	1	2	2	1	3	1	1	3	2
Lin_27	3	1	1	1	1	2	1	2	1	2
Lin_28	1	1	1	1	2	1	2	1	3	2
Lin_29	3	1	1	2	2	2	2	1	3	3
Lin_30	2	2	1	2	2	1	1	1	3	2
Lin_31	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1
Lin_32	2	1	1	1	2	1	2	4	1	3
Lin_33	1	1	1	1	2	1	1	4	1	3
Lin_34	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2
Lin_35	3	1	1	1	2	2	1	3	1	2
Lin_36	1	1	2	1	1	3	1	1	3	3
Lin_37	2	2	2	2	2	1	1	3	3	3
Lin_38	1	2	1	1	2	1	1	2	3	2
Lin_39	2	2	2	2	2	2	1	1	3	2
Lin_40	2	3	1	1	2	3	1	1	3	2
Lin_41	1	1	1	1	2	1	1	1	3	3
Lin_42	2	3	1	3	2	1	1	2	1	2
Lin_43	3	2	2	2	1	2	2	1	3	2
Lin_44	1	3	1	1	2	2	1	2	3	3
Lin_45	2	2	1	1	2	2	1	2	3	3
Lin_46	2	2	1	1	1	1	1	3	3	3

(AF) ângulo entre a lâmina foliar e o caule, (CF) comportamento da lâmina foliar acima da espiga superior, (CH) comprimento da haste principal do pendão, (AH) ângulo da haste principal do pendão e ramificação lateral, (CE) coloração do estigma, (CP) coloração do pendão, (CS) coloração do sabugo, (TG) textura do grão, (CG) coloração do grão, (EPH) empalhamento. Cascavel-PR. Safra 2009/10.

Quanto ao caráter morfológico qualitativo da textura do tegumento, as linhagens ficaram assim classificadas: 56,53% do tipo duro, 21,73% do tipo semiduro, 13,04% do tipo semidentado e 8,70% do tipo dentado. Pôde-se observar alta variabilidade nas avaliações da coloração do estigma, sendo que 67,39% das linhagens não apresentaram coloração antociânica no estigma e 32,61% a apresentaram. Na avaliação da coloração do pendão, as linhagens

foram assim classificadas: 43,47% como verdes, 39,13% como róseas e 17,40% como roxas.

Considerando que 80,43% das linhagens apresentaram grãos de cor laranja, 15,21% de cor amarela e 4,34% de cor alaranjada, verifica-se menor variabilidade para esta característica. Para a característica coloração do sabugo, também pôde ser observada menor variabilidade, com 15,22% das linhagens classificadas como roxas e 84,78% como brancas.

As características que mais variaram entre as utilizadas como descritores morfológicos foram as relativas ao ângulo entre a lâmina foliar, o caule e o comportamento da lâmina foliar acima da espiga superior, evidenciando que estas variáveis são subjetivas, de difícil classificação e dependentes da influência de genótipo e do ambiente e suas interações, o que resulta em maior variação.

#### **4.1. Análise de agrupamento**

As técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo dividir um grupo original de informações em vários grupos homogêneos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (Cruz, 1990). O princípio da distância estabelece que, quando dois acessos são relacionados ou similares, eles devem ocupar a mesma região no espaço e guardar pequena distância entre si.

A medida de dissimilaridade mais usual é a distância euclidiana média, enquanto as técnicas de agrupamento podem ser variadas. Neste estudo, foram utilizados o método hierárquico UPGMA e o método de otimização de Tocher.

Neste estudo, para a análise de agrupamento das linhagens, foram utilizados os dados de diversidade genética, obtidos pela caracterização morfológica e molecular das linhagens. O agrupamento das linhagens pelo método UPGMA a partir dos dados morfológicos está representado na Figura 1. É possível observar a divisão das linhagens em cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5).

Na representação das distâncias em dendrograma da análise pelo método UPGMA, o grupo G1 foi composto pelo maior número de linhagens LIN\_ 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 45 e 46, sugerindo que estas fazem parte de um mesmo grupo heterótico. Características agrônômicas distintas do grupo G1

são esperadas nas linhagens LIN\_13, 14, 27, 32, 33 e 35, que compõem o grupo G2; LIN\_42, no G3; nas linhagens LIN\_26 e 43, grupo G4; e na linhagem LIN\_6, G5.

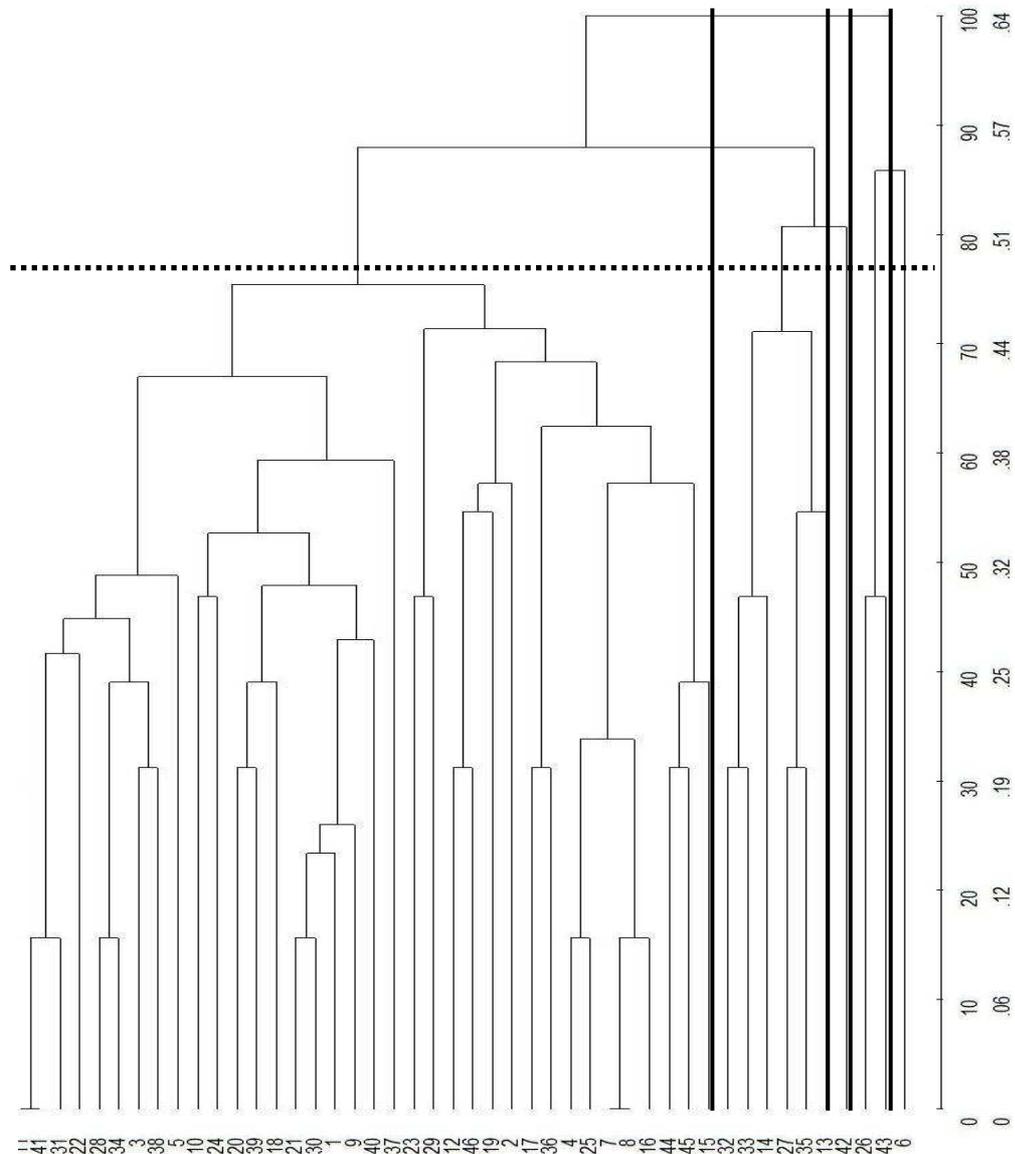


Figura 1 - Análise de agrupamento pelo método UPGMA de 46 linhagens de milho, a partir da distância euclidiana obtida para dados morfológicos.

O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ( $r = 0,67$ ) revelou um bom ajuste entre a representação das distâncias e sua matriz original (Rohlf, 2000), possibilitando a realização de inferências por meio da avaliação visual (Figura 1). Neste tipo de representação gráfica, a eficiência com que a matriz original dos dados de distância é representada na Figura implica diretamente na possibilidade de sua utilização. Existem casos em que a estrutura de

agrupamento dos genótipos avaliados não atende à pressuposição hierárquica e, por isso, outra forma de representação deve ser adotada (Bussab et al., 1990), mesmo que esses casos sejam os mais recomendados para aplicação em dados biológicos (Everitt, 1993).

É possível observar que, quando se compara o agrupamento formado pelo método UPGMA com os dados morfológicos avaliados (Quadro 3), a característica morfológica comum presente em 97,2% do grupo G1 é a coloração laranja do grão (nota de CG = 3). A característica de textura do grão dentado só foi observada nas linhagens que constituíram o grupo G2 (linhagens LIN\_13, LIN\_14, LIN\_32 e LIN\_33), característica comum em 66,66% das linhagens presentes neste grupo. As linhagens LIN\_13, 14, 32 e 33 têm em comum duas outras características morfológicas importantes: a coloração do grão e a presença de antocianina no estigma.

O agrupamento das linhagens pelo método UPGMA, a partir dos dados moleculares (Figura 2), também classificou as linhagens em cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5). O grupo G1 foi composto pelas linhagens LIN\_3, 4, 5, 7, 8, 13, 14, 17, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 38, 39, 40, 41, 42, 44 e 45; o grupo G2 foi composto pelas linhagens LIN\_15, 16, 19, 34, 36 e 43; linhagens LIN\_1, 2, 6 e 37 formaram o G3; o grupo G4 foi composto pelas linhagens LIN\_21 e 46; as linhagens LIN\_9, 10, 11, 12, 18 e 24 formaram o grupo G5.

Comparando os dendrogramas apresentados (Figuras 1 e 2) e que representam as distâncias obtidas por dados morfológicos e moleculares, verifica-se que as linhagens de milho não foram agrupadas da mesma forma. A estatística de Mantel (1967) foi utilizada para testar a significância da associação entre as matrizes com diferentes tipos de distâncias entre pares de observações (Smouse et al., 1986; Manly, 1994). Mil permutas aleatórias foram utilizadas para se testar a significância das correlações matriciais. Os testes de Mantel simples foram realizados com utilização do programa GENES (Cruz, 2001).

A falta de associação entre as duas matrizes pode ser explicada pelo fato de o valor de correlação obtido (0,11) ser de baixa magnitude e não ser significativo. Resultado contrário foi obtido por Machado (1999), que obteve alta correlação entre estas duas estimativas, o que parece indicar que marcadores

moleculares são úteis para prever os genótipos mais divergentes quando o interesse é por vários caracteres agronômicos.

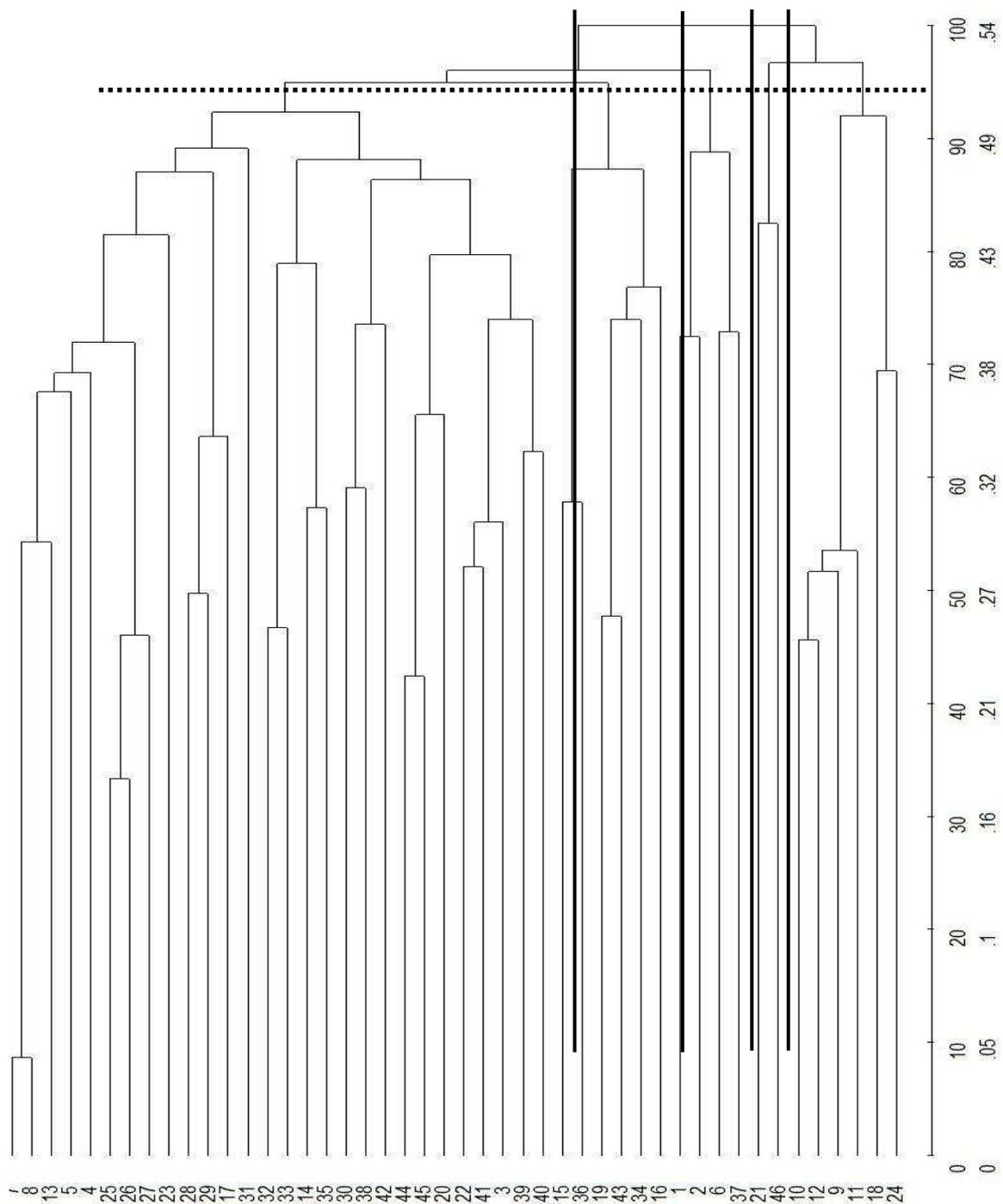


Figura 1 - Análise de agrupamento pelo método UPGMA de 46 linhagens de milho, a partir de dados moleculares.

A associação entre marcadores moleculares e descritores morfológicos propicia uma amostragem muito mais ampla do genoma que a análise com caracteres morfológicos e por isso, dois marcadores possibilitariam avaliar partes diferentes do genoma. A associação fica também dificultada pela diferença no número de marcadores morfológicos e moleculares utilizados (Lefebvre et al., 2001; Máric et al., 2004; Roy et al., 2004).

Pelo fato de os parâmetros de medida utilizados para a estimação das distâncias não se correlacionarem, eles podem ser considerados em conjunto para maximizar o nível de variação presente na população obtida pelo cruzamento de genótipos com maiores distâncias. Por isso são considerados, informações complementares. Dessa forma, a combinação de diferentes medidas pode melhorar a predição da performance da progênie, a variabilidade ou ambas (Autrique et al., 1996; Bered et al., 2001).

Comparando os resultados das análises de agrupamento pelo método UPGMA dos dados moleculares e dos dados morfológicos com os grupos heteróticos formados a partir dos ensaios topcrosses (Quadro 2), observa-se que, na maioria dos casos, os grupos formados pelo método UPGMA não correspondem aos grupos heteróticos anteriormente definidos nos ensaios topcrosses.

Não obstante, chama a atenção o fato de que duas linhagens (LIN\_13 e LIN\_14), caracterizadas por terem grãos dos tipos dentado e amarelo, as quais, pelo agrupamento UPGMA dos dados morfológicos, foram alocadas no mesmo grupo (G2), pertencem também ao mesmo grupo heterótico determinado pelo topcross (F). As linhagens LIN\_32 e LIN\_33, da mesma forma muito similares quanto às características morfológicas, pertencem ao grupo de linhagens que ainda não possuem seu grupo heterótico definido por topcross.

O agrupamento dos dados morfológicos pelo método de otimização de Tocher separou as 46 linhagens de milho estudadas em 17 grupos distintos (Quadro 3). O agrupamento mais numeroso foi o G2, composto por 19,56% das linhagens, sendo que 100% das linhagens deste grupo pertenciam ao mesmo agrupamento pelo método UPGMA (G1). Os grupos G11 a G17 foram compostos por apenas uma linhagem cada um.

Quadro 2 - Relação dos agrupamentos de 46 linhagens de milho, obtidos pelo método UPGMA, a partir das distâncias moleculares e morfológicas, e dos grupos heteróticos estabelecidos a partir de ensaios topcrosses. Cascavel – PR, safra 2009/10

Linhagem	Grupos heteróticos topcrosses	Grupos UPGMA moleculares	Grupos UPGMA morfológicos
Lin_01	F	3	1
Lin_02	E	3	1
Lin_03	?	1	1
Lin_04	?	1	1
Lin_05	D	3	1
Lin_06	D	1	5
Lin_07	?	1	1
Lin_08	E	1	1
Lin_09	E	5	1
Lin_10	E	5	1
Lin_11	E	5	1
Lin_12	E	5	1
Lin_13	F	1	2
Lin_14	F	1	2
Lin_15	D	2	1
Lin_16	E	2	1
Lin_17	E	1	1
Lin_18	E	5	1
Lin_19	E	2	1
Lin_20	D	4	1
Lin_21	?	1	1
Lin_22	F	1	1
Lin_23	F	1	1
Lin_24	F	5	1
Lin_25	F	1	1
Lin_26	F	1	4
Lin_27	?	1	2

Quadro 2, cont.

Lin_28	F	1	1
Lin_29	E	1	1
Lin_30	D	1	1
Lin_31	D	1	1
Lin_32	?	1	2
Lin_33	?	1	2
Lin_34	?	2	1
Lin_35	?	1	2
Lin_36	?	2	1
Lin_37	?	3	1
Lin_38	?	1	1
Lin_39	D	1	1
Lin_40	D	1	1
Lin_41	D	1	1
Lin_42	E	1	3
Lin_43	E	1	4
Lin_44	D	1	1
Lin_45	D	4	1
Lin_46	D	1	1

(\*) Grupos heteróticos definidos anteriormente a partir de topcross.

(?) Grupo heteróticos ainda não definidos.

Três das quatro linhagens que, na avaliação dos descritores morfológicos, foram caracterizadas como tendo grão de tipo dentado (LIN\_ 32, 33 e 14), pelo método de Tocher, foram alocadas em um grupo exclusivo (G7). Fato coincidente ocorreu no agrupamento pelo método de UPGMA (G2).

A linhagem LIN\_42 formou um grupo exclusivo (G17) e comportamento semelhante ocorreu quando classificada pelo método UPGMA, em que formou grupo exclusivo (G3). Verificando-se a avaliação de suas principais características morfológicas (Quadro 1), é possível observar que é uma das poucas linhagens que possui coloração de grão amarelo e tegumento de grão semidentado.

Acessos alocados nos últimos grupos, quando comparados aos primeiros grupos, revelam maior divergência, sendo possível sua utilização em programas de cruzamentos entre grupos mais produtivos (Abreu et al., 2002).

A matriz de dissimilaridade, obtida pela distância euclidiana ( $d_{ij}$ ), permitiu observar que a linhagem LIN\_6 apresentou a maior  $d_{ij} = 0,64$  e as menores distâncias foram observadas nas linhagens LIN\_11, 41 e 21. Estas não pertencem ao mesmo grupo heterótico determinado por topcross, mas ao mesmo agrupamento pelo método de Tocher (G2).

Quadro 3 - Agrupamento de 16 linhagens de milho estabelecido pelo método de otimização de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pela distância euclidiana a partir de dados morfológicos. Cascavel - PR. Safra 2009/10

Grupo	Linhagens									
1	7	8	16	4	25	45				
2	11	41	31	28	34	3	21	38	22	
3	1	30	9	20	39	24				
4	12	46	10							
5	15	44	17	23						
6	27	35								
7	32	33	14							
8	5	40								
9	6	36								
10	26	43								
11	29									
12	2									
13	19									
14	37									
15	13									
16	18									
17	42									

Considerando-se as distâncias genéticas detectadas pelos marcadores microssatélites, o agrupamento obtido pelo método de otimização de Tocher (Quadro 4) também separou as 46 linhagens de milho em 17 grupos distintos. Não foi possível identificar muitas semelhanças quando comparado ao agrupamento obtido pelo método de Tocher para os dados morfológicos, entretanto as linhagens de grão tipo dentado LIN\_32 e 33 foram alocadas no mesmo grupo (G4), levando a concluir que, além de serem próximas fenotipicamente,  $d_{ij} = 0,5$  e  $0,55$ , respectivamente, podem ser muito próximas geneticamente.

A análise de agrupamento, ao evitar cruzamentos que possam originar populações semelhantes e pouco heteróticas (Lima et al., 2000), permite a escolha de genótipos que possuam variabilidade genética em relação aos demais, possibilitando economia de tempo, de mão de obra e de recursos financeiros. Devem-se preferir cruzamentos entre populações ou genitores que apresentem altas médias e divergência ampla nas características de interesse (Hallauer e Miranda Filho, 1995).

Baseados na hipótese de associação entre heterose e a frequência de locos heterozigóticos afetando a característica, Hallauer et al. (1988) sugeriram a predição da heterose com base em marcadores moleculares. Da mesma forma, Árcade et al. (1996), considerando a participação da heterozigosidade no fenômeno da heterose, sugerem um potencial preditivo da heterose baseado na quantificação da distância genética entre os genitores. Aguiar (2007), em seu estudo, classificou trinta linhagens de milho em grupos distintos sem ambiguidades a partir de matriz de distância genética obtida por marcadores moleculares microssatélites.

A formação de grupos heteróticos, com a utilização de dados de cruzamentos-teste, pode variar em função dos testadores utilizados. Por outro lado, a obtenção de grupos heteróticos a partir das estimativas de diversidade genética obtidas com dados de marcadores moleculares não é influenciada pelos testadores e não é suscetível à interação genótipos por ambientes, além de esses grupos poderem ser obtidos em um menor período de tempo, uma vez que nenhum cruzamento precisa ser realizado (Aguiar, 2007). Paterniani et al. (2008) ressaltam que a avaliação das linhagens quanto à capacidade de combinação é a etapa mais trabalhosa e onerosa dos programas de híbridos na cultura de milho.

Conforme Zhang et al. (1996), para prever com eficiência a heterose, é necessário diferenciar a heterose geral da heterose funcional, pois nem todos os fragmentos polimórficos obtidos na análise molecular contribuem para concretização da heterose; existe um número considerável de fragmentos que são localizados em regiões não codificadas do genoma ou, ainda, os fragmentos podem não ter associações com caracteres de importância econômica.

Lanza et al. (1997) explicam que correlações negativas podem ocorrer se os marcadores não estiverem associados aos QTLs influentes no caráter e se a produtividade não possuir alta herdabilidade.

Quadro 4 - Agrupamento de 16 linhagens de milho estabelecido pelo método de otimização de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pela distância Euclidiana a partir de dados moleculares. Cascavel - PR. Safra 2009/10

Grupo	Linhagens							
1	7	8	13	27	26	25	4	16
2	44	45	38	20	39	22	41	40
3	10	12	9	11				
4	32	33	35					
5	19	43	6					
6	28	29	17					
7	15	36						
8	14	23						
9	18	24						
10	30	42						
11	1	2						
12	5	21						
13	46							
14	3							
15	37							
16	34							
17	31							

Comparando os resultados das análises de agrupamento pelo método de otimização de Tocher dos dados morfológicos e dos dados moleculares com os grupos heteróticos formados a partir dos ensaios topcrosses (Quadro 5), observa-se que, na maioria dos casos, os grupos formados pelo método Tocher não correspondem aos grupos heteróticos anteriormente definidos.

Há trabalhos relatando que, quanto maior a divergência genética entre os parentais, maior será também a heterose e, conseqüentemente, a produção do híbrido (Maluf et al., 1983; Oliveira, 1989). Entretanto, nem sempre a correlação entre divergência genética obtida por marcadores moleculares e desempenho do híbrido é consistente (Barbosa et al., 2003; Melo et al., 2001; Guimarães, 2007).

É necessário, de acordo com Gadheri et al. (1984), haver efeitos de dominância ou de epistasia, envolvendo dominância para que ocorra uma associação positiva entre divergência genética e a heterose e para que os parentais sejam diferentes nas frequências alélicas que controlam o caráter em estudo. Essa diferença deve aumentar com a divergência dos parentais, permitindo que os efeitos de dominância se manifestem e, conseqüentemente, o fenômeno da heterose seja aumentado.

Amorim (2007), em análise de divergência genética entre linhagens de milho utilizando marcadores moleculares, obteve valores baixos de divergência genética, tanto entre linhagens provenientes do mesmo grupo quanto entre linhagens provenientes de grupos heteróticos diferentes. O autor justifica os baixos valores de divergência genética entre grupos heteróticos diferentes afirmando que, apesar de estarem alocadas em grupos diferentes, estas linhagens devem ser oriundas de populações semelhantes.

Quadro 5 - Relação dos agrupamentos de 46 linhagens de milho, obtidos pelo método de otimização de Tocher a partir das distâncias moleculares e morfológicas e dos grupos heteróticos formados a partir de ensaios topcrosses. Cascavel – PR, safra 2009/10

Linhagem	Grupos heteróticos topcrosses	Grupos Tocher moleculares	Grupos Tocher morfológicos
Lin_01	F	11	3
Lin_02	E	11	12
Lin_03	?	14	2
Lin_04	?	1	1
Lin_05	D	12	8
Lin_06	D	5	9
Lin_07	?	1	1
Lin_08	E	1	1
Lin_09	E	3	3
Lin_10	E	3	4
Lin_11	E	3	2
Lin_12	E	3	4
Lin_13	F	1	15
Lin_14	F	8	7
Lin_15	D	7	5
Lin_16	E	1	1
Lin_17	E	6	5
Lin_18	E	9	16
Lin_19	E	5	13
Lin_20	D	2	3
Lin_21	?	12	2
Lin_22	F	2	2
Lin_23	F	8	5
Lin_24	F	9	3
Lin_25	F	1	1
Lin_26	F	1	10
Lin_27	?	1	6
Lin_28	F	6	2
Lin_29	E	6	11
Lin_30	D	10	3

Quadro 5, cont.

Lin_31	D	17	2
Lin_32	?	4	7
Lin_33	?	4	7
Lin_34	?	16	2
Lin_35	?	4	6
Lin_36	?	7	9
Lin_37	?	15	14
Lin_38	?	2	2
Lin_39	D	2	3
Lin_40	D	2	8
Lin_41	D	2	2
Lin_42	E	10	17
Lin_43	E	5	10
Lin_44	D	2	5
Lin_45	D	2	1
Lin_46	D	13	4

(\*) Grupos heteróticos definidos anteriormente a partir de topcross.

(?) Grupo heteróticos ainda não definidos.

Hahn et al. (1995) analisaram linhagens de milho utilizando 54 primers de RAPD e observaram que, dentro dos grupos, foram obtidas similaridades genéticas maiores que as obtidas para linhagens de grupos heteróticos diferentes, embora as correlações entre os valores de similaridade gerados por RAPD não tenham sido muito altas.

## 5. CONCLUSÕES

As análises de agrupamento hierárquico UPGMA e de otimização de Tocher, empregadas para analisar a divergência genética de 46 linhagens de milho com base na distância euclidiana de dados morfológicos e moleculares, evidenciam a existência de divergência fenotípica e genética entre as linhagens avaliadas.

Poucas concordâncias entre os agrupamentos formados por dados morfológicos e moleculares puderam ser associadas ao agrupamento heterótico previamente definido por ensaios topcrosses.

A correlação entre a estimativa da divergência genética feita pelas características morfológicas e avaliada por meio de marcadores moleculares foi de baixa magnitude e não significativa, indicando que são medidas distintas e complementares. Desta forma, a utilização de uma estimativa não dispensa a necessidade de avaliar a outra.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.G. **Determinação de grupos heteróticos em milho utilizando marcadores moleculares e cruzamentos teste**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Agronomia).
- ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: John Wiley e Sons. 1960. 458p.
- AMORIM, E.P.; RAMOS, N.P.; UNGARO, M.R.G.; KIIHL, T.A.M. Divergência genética em genótipos de girassol. **Ciência Agrotecnologia**, 31:1637-1644, 2007.
- ARAÚJO, P.M.; PATERNIANI, E. Aspectos gerais de plantas alógamas. In: DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (org.). **Melhoramento genético de plantas**. Londrina: UEL, 1999. p. 311-330.
- ARRIEL, N.H.C.; DI MAURO, A.O.; ARRIEL, E.F.; UNÊDA-TREVIOLI, S.H.; COSTA, M.M.; BÁRBARO, I.M.; MUNIZ, F.R.S. Genetic divergence in sesame based on morphological and agronomic traits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:253-261, 2007.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV. 1998. 453p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. (org.). **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV. 2005. p. 441-463.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Descritores mínimos do milho (*Zea mays* L.)**. Brasília: Brasil, 2010. 13p.
- BRUCE, A.B. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. **Science**, 32:627-629, 1910.
- BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: IME/USP, 1990. 150p.

CARDOSO, W.S. **Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos visando biofortificação.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 52p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia Agrícola).

CLIFFORD, H.T.; STEPHENSON, W. **An introduction to numerical taxonomy.** London: Academic Press, 1975. 229p.

COELHO, M.M.; COIMBRA, J.L.M.; SOUZA, C.A.; BOGO, A.; GUIDOLIN, A.F. Diversidade genética em acessos de feijão (*Phaseolus vulgaris*L.). **Ciência Rural**, 37:1241-1247, 2007.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, 34:66-71, 1991.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. **Guia do milho 2009:** Tecnologia do campo à mesa, 2009. Disponível em: <<http://www.cib.org.br>>. Acesso em: 21, julho, 2009.

CRESS, C.E. Heterosis of the hybrids related to gene frequency differences between two populations. **Genetics**, 53:269-274, 1966.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** Piracicaba: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, 1990. 188p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

CRUZ, C.D. **Programa Genes:** Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa: UFV, 2003. 585p.

CRUZ, C.D.; CARVALHO, S.P.; VENCOSKY, R. Estudos sobre divergência genética. II Eficiência da predição do comportamento de híbridos com base na divergência de progenitores. **Revista Ceres**, 41:183-190, 1994.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Divergência genética. In: CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. (org.). **Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa: UFV, 1997. p. 287-324.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 390p.

DAVIS, R.L. Reports of the plant breeder. **Puerto Rico Agricultural Experimental Station Annual Report**, 1:14-15, 1927.

EAST, E.M. Inbreeding in corn. **Connecticut Agricultural Experiment Station**, 1:419-428, 1908.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. 2002. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>. Acesso em: 21, setembro, 2010.

ENOKI, H.; SATO, H.; KOINUMA, K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. **Theoretical and Applied Genetics**, 104:1270-1277, 2002.

EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. Cambridge: University Press, 1993. 170p.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 1987. 279p.

FANCELLI, A.L. **Tecnologia da produção do milho para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP, (Cursos agrozootécnicos), 1994. 222p.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

FERNANDES, E.H. **Análise de diversidade genética por marcadores moleculares entre linhagens elite de milho e associação com heterose**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 64p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220p.

GARDNER, C.O.; EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, 22:439-452, 1966.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal. Biology Science**, 9:463-493, 1956.

GUIMARÃES, P.S. **Desempenho de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2007. 132p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

GUO, M.; RUPE, M.A.; YANG, X. CRASTA, O.; ZINSELMEIER, C.; SMITH, O.S.; BOWEN, B. Genome-wide transcript analyses of maize hybrids: allelic additive gene expression and yield heterosis. **Theoretical and Applied Genetics**, 113:831-845, 2006.

HAHN, V.; BLANKENHORN, K.; SCHWALL, M.; MELCHINGER, A.E. Relationships among early european maize inbreds: Genetic diversity revealed with RFLP and pedigree data. **Maydica**, 40:299-310, 1995.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica**, 35:1-16, 1990.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1995. 468p.

HALLAUER, A.R.; RUSSEL, W.A.; LAMKEY, K.R. Corn breeding. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (eds.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 463-564.

HAYMAN, B.I. The analysis of variance of diallel crosses. **Biometrics**, 10:235-244, 1954.

IBPGR. **Descriptors for maize**. International Maize and Wheat Improvement Center. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 12p.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites from molecules to populations and back. **Tree**, 11:424-429, 1996.

JARVIS, D.I. Los caracteres agromorfológicos y la selección y el mantenimiento queda el agricultor. In: JARVIS, D.I.; MYER, L.; KLEMICK, H.; GUARINO, L.;

SMALE, M.; BROWN, A.H.D.; SADIKI, M.; STHAPIT B.; HODGKIN.T. (org.). **Guía para la conservación de cultivos in situ**. Roma: IPGRI, 2000. p. 51-81.

KANTETY, R.; ZENG, X.; BENNETZENM, J.L.; ZEHR, B.E. 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, 1995.

KEEBLE, F.; PELLEW, C. The mode of inheritance of feature on time of flowering in peas. **Genetics**, 1:47-56, 1910.

LANZA, L.L.B.; SOUZA JÚNIOR, C.L.; OTTOBONI, L.M.N.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 94:1023-1030, 1997.

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, 21:97-108, 2000.

LEFEBVRE, V.; GOFFINET, B.; CHAUVET, J.C.; CAROMEL, B.; SIGNORET, P.; BRAND, R.; PALLOIX, A. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD, and phenotypic data. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:741–750, 2001.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44:398-401, 1989.

LIU, X.; PENG, Z.; FU, J.; HUANG, C.; LIU, X.Z.; PENG, Z.B.; FU, J.H.; HUANG, C.L. Maize inbred line grouping by using cluster analysis of RAPD molecular marker, phenotype and heterosis. **Acta Agriculturae Boreali Sinica**, 13:36-41, 1998.

LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, 103:613-617, 2001.

MACHADO, C.F.; NUNES, G.H.S.; FERREIRA, D.F.; SANTOS, J.B. Divergência genética entre genótipos de feijoeiro a partir de técnicas multivariadas. **Ciência Rural**, 32:251-258, 2002.

MACHADO, C.F.; NUNES, G.H.S.; FERREIRA, D.F.; SANTOS, J.B.; MACHADO, C.F. **Procedimentos para a escolha de genitores de feijão**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1999. 118p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MACHADO, J.C. **Estabilidade de produção e da capacidade de combinação em híbridos de milho**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2007, 68p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

MANLY, B.F.J. **Multivariate statistical methods: a primer**. Boca Raton: Chapman & Hall, 1994. 215p.

MÁRIC, S.; BOLARÍC, S.; MARTINCIC, I.; PEJIC, I.; KOZUMPLIK, V. Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. **Plant Breeding**, 123:366-369, 2004.

MELO, W.M.C. **Divergência genética e capacidade de combinação entre híbridos de milho**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MIRANDA FILHO, J.B.; NASS, L.L. Hibridação no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (org.) **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**, 2001. p. 603-627.

MIRANDA, G.V.; COIMBRA, R.R.; GODOY, C.L.; SOUZA, L.V.; GUIMARÃES, L. J.M.; MELO, A.V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:681-688, 2003.

MORAES, R.M.A.; PIOVESAN, N.D.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Análise de divergência genética utilizando marcadores de microssatélites para introgressão de alelos de alto teor de proteínas em soja. In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. **Resumos...** Porto Seguro: SBMP, 2003. Cd rom.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, 3:175-182, 1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain restriction. **Methods in Enzymology**, 55:335-350, 1987.

OLIVEIRA, A.C. Construção de mapas genéticos em plantas. In: MILACH, S.C.K. (ed.) **Marcadores de DNA em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 100-112.

PATERNIANI, E. **Estudos recentes sobre heterose**. São Paulo: Fundação Cargill, 1974. 36p.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. **Melhoramento de milho**. In: BOREM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 429-485.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; GUIMARÃES, O.S.; LÜDERS, R.R.; GALLO, P.B.; SOUZA, A.P.; LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M. Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. **Bragantia**, 67:639-648, 2008.

PEJIC, I.; AJMORE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:1248-1255, 1998.

PINTO, R.M.C.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA JR, C.L. Alocação de linhagens de milho derivadas das populações BR-105 e BR-106 em grupos heteróticos. **Scientia Agrícola**, 58:541-548, 2001.

QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido**: a abordagem técnica e sócio-econômica. Rio de Janeiro: AS-PTA. 1993. 206p.

RAFALSKI, J.A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD based approaches. **Plant Science**, 162:329-333, 2002.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley, 1952. 390p.

RONZELLI JUNIOR, P. **Melhoramento genético de plantas**. Curitiba: P. Ronzelli Jr., 1996. 219p.

ROY, J.K.; LAKSHMIKUMARAN, M.S.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K. AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. **Biochemical Genetics**, 42:43-59, 2004.

RUMIN, G.C.R.; VENCOVSKI, R. Índice baseado em RFLPs para seleção de linhagens visando sintéticos de milho. **Scientia Agricola**, 28:303-311, 2001.

SANTOS, J.B.; NIENHUIS, J.; SKRCK, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, 87:909-915, 1994.

SAWAZAKI, E.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Evolução dos cultivares de milho no Brasil. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (eds.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 13-53.

SHULL, G.H. Apure line method of corn breeding. **American Breedings Association Report**, 4:296-301, 1908.

SIEGMIND, K.D.; LAIRD, P.W.; LAIRDOFFRINGA, L.A. A comparison of cluster analysis method using DNA methylation data. **Bioinformatics**, 20:1896-1904, 2004.

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:163-173, 1997.

SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. The description and assesment of distances between inbred lines of maize.II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. **Maydica**, 34:151-161, 1989.

SMOUSE, P.E.; LONG, J.C.; SOKAL, R.R. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. **Systematic Zoology**, 35:627-632, 1986.

SOBRAL, P.V.C.; RAMOS, S.R.R.; ROCHA, M.M.; FREIRE FILHO, F.R.; SANTOS, J.O.; MEIRELLES, A.C.S. **Caracterização agrônômica de variedades tradicionais de feijão-caupi do banco ativo de germoplasma da Embrapa Meio-Norte**. 2006. Disponível em: [http://www.dap.ufam.edu.br/congresso/Resumos/agrarias/06\\_Agrarias.pdf](http://www.dap.ufam.edu.br/congresso/Resumos/agrarias/06_Agrarias.pdf)>. Acesso em: 20, janeiro, 2010.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARIS-INGLIS. (eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-966.

SOUZA SOBRINHO, F. **Divergência genética de híbridos simples e alternativas para a obtenção de híbridos duplos de milho**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 96p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

SOUZA, E.D. **Divergência genética e avaliação de famílias S1 e Topcrosses de milho, utilizando-se caracteres agrônômicos e marcadores RAPD**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. 88p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

SPRAGUE, G.F.; EBERHART, S.A. Corn breeding. In: SPRAGUE, G.F. (ed.) **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1977. p. 305-362.

SPRAGUE, G.F.; TATUM, L.A. General and specific ability in single cross of corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, 34:923-932, 1942.

SUN, G.L.; WILLIAM, M.; LIU, J.; KASHA, K.J.; PAULS, K.P. Microsatellite and RAPD polymorphisms in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings. **Molecular Breeding**, 7:13-24, 2001.

SURESH, K.S.; KHANNA, R. Physiological, biochemical, and genetic basis of heterosis. **Advances in Agronomy**, 27:123-174, 1975.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, 12:4127-4138, 1984.

VIÉGAS, G.P. **Melhoramento do milho para condições adversas**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. 44p.

VIÉGAS, G.P.; MIRANDA FILHO, J.B. **Milho híbrido**. In: PATERNIANI, E. (ed.). Melhoramento e produção do milho no Brasil. Campinas: Fundação Cargill, 1978. p. 257-309.

VIEIRA, C. **Curso de melhoramento de plantas**. Viçosa: UREMG, 1964. 249p.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary "primer"s. **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.G.; RAFALKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary "primer"s are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

ZHANG, Q.; ZHOU, Z.; YANG, G.P.; XU, C.G.; LIU, K.D.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. **Theoretical and Applied Genetics**, 93:1218-1224, 1996.