

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA EM MILHO  
(*Zea mays* L.) MONITORADA POR MARCADORES SSR-EST's  
ASSOCIADOS À PRODUTIVIDADE

**JULIO CESAR FIORIO VETTORAZZI**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2016

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA EM MILHO  
(*Zea mays* L.) MONITORADA POR MARCADORES SSR-EST's  
ASSOCIADOS À PRODUTIVIDADE

**JULIO CESAR FIORIO VETTORAZZI**

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

Orientador: Prof. Messias Gonzaga Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2016

SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA EM MILHO  
(*Zea mays* L.) MONITORADA POR MARCADORES SSR-EST's  
ASSOCIADOS À PRODUTIVIDADE

**JULIO CESAR FIORIO VETTORAZZI**

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

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Ana Paula Candido Gabriel Berilli (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas ) - IFES/Campus Itapina

---

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF

---

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

A Deus, por todas as bênçãos concedidas em minha vida.  
Aos meus pais Dejair e Luzia, pela confiança, incentivo e apoio em todos os  
momentos da minha vida e pelo amor que sempre dedicaram a mim.  
Ao meu irmão Alex, por todo apoio incondicional.

DEDICO ESTA CONQUISTA

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por toda proteção e graças concedidas;

Aos meus pais, Pedro Dejair e Luzia, por todo amor, educação, paciência, dedicação. Obrigado por terem estado sempre ao meu lado durante essa caminhada;

Ao meu irmão Alex, pela amizade e por ter me acompanhado durante toda a minha caminhada acadêmica;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de qualificação;

À Faperj, pelo financiamento do projeto e à Capes pela concessão da bolsa;

Ao professor Messias, pela excelente orientação, pelos ensinamentos e pela paciência durante todo o tempo que permaneci no laboratório como aluno de iniciação científica e de mestrado;

Aos meus conselheiros, professor Dr. Alexandre Pio Viana e a professora Dra. Helaine Christine Cancela Ramos, pelas contribuições, sugestões e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

À Ana Paula Candido Gabriel Berilli, por ter aceitado o convite de participação na banca de defesa;

Aos demais professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelo aprendizado, por terem sido fundamentais para minha formação acadêmica;

Ao técnico agrícola, Geraldo de Carvalho, obrigado pela paciência e dedicação aos experimentos, e pelos ensinamentos de campo;

Aos técnicos de campo, José Manuele Valdinei, pelo grande auxílio nas atividades de campo durante as etapas desta pesquisa;

Ao Dr. Leandro Espanhol, pelo empenho em coordenar os experimentos na estação de Itaocara;

Aos estagiários do Colégio Agrícola, Luzimara e Jaqueline, pela valiosa ajuda durante toda condução dos experimentos sem medir esforços;

À equipe do milho comum, Jocarla, Nayara e José Arantes, pelo auxílio no campo;

À equipe de milho pipoca, pela ajuda durante a condução dos experimentos no Colégio Agrícola, Pesagro e Itaocara;

Às Dras. Geovana e Keila, pelas contribuições durante o desenvolvimento desta pesquisa;

Aos funcionários de apoio no campo em Campos dos Goytacazes e em Itaocara;

À Dra. Fernanda Abreu, pela sua amizade e ajuda dispensada a este trabalho na parte de Biologia Molecular;

Ao Diego Marmolejo, Pedro e Alinne, por toda ajuda nas análises estatísticas de campo e laboratório;

Às técnicas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Vitória e Marcela, pelo auxílio na execução dos trabalhos, paciência e, acima de tudo, amizade;

Aos amigos do laboratório, Vitória, Marcela, Fernanda, Diego, Pedro, Nayara, Jocarla, José Arantes, Alinne e Renato, pela amizade e apoio, não só nas atividades acadêmicas, mas também na vida pessoal. Sem vocês, essa jornada seria muito mais difícil;

Aos meus primos e companheiros de república Renato e Rosana;

Aos meus amigos da graduação Renato, Tamara, David e Jéssica;

Ao secretário Daniel, pela amizade, aconselhamentos, por estar sempre disponível em nos ajudar;

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO GERAL .....	5
2.1 Objetivos específicos .....	5
3. CAPÍTULOS .....	7
3.1 AVALIAÇÃO, PREDIÇÃO DOS GANHOS GENÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS SUPERIORES DO 15º CICLO DE SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA DE MILHO COMUM DA UENF .....	7
3.1.1 INTRODUÇÃO .....	7
3.1.2 REVISÃO DE LITERATURA .....	8
3.1.2.1 Classificação botânica e origem do milho .....	8
3.1.2.2 Importância econômica .....	9
3.1.2.3 Melhoramento genético via seleção recorrente recíproca .....	11
3.1.2.4 Índice de seleção Mulamba e Mock .....	14
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1.3.1 Material genético .....	16
3.1.3.2 Geração das famílias de irmãos completos e das sementes S <sub>1</sub> .....	17
3.1.3.3 Avaliação das famílias de irmãos completos .....	18
3.1.3.4 Análise estatística .....	19
3.1.3.4.1 Análise de variância .....	19
3.1.3.4.2 Estimacão dos componentes de variância e parâmetros genéticos .....	20

3.1.3.4.3 Identificação das progênes superiores.....	21
3.1.3.4.4 Seleção Direta .....	22
3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
3.1.4.1 Avaliação das Famílias de Irmãos Completos e Análise de Variância .....	22
3.1.4.2 Estimativas dos Parâmetros Genéticos.....	25
3.1.4.3 Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978) .....	27
3.1.5 CONCLUSÕES.....	33
3.2 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO DE <i>PRIMERS</i> SSR-EST'S ASSOCIADOS COM A PRODUTIVIDADE E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA .....	34
3.2.1 INTRODUÇÃO .....	34
3.2.2.1 Diversidade genética .....	36
3.2.2.2 Marcadores moleculares no programa de seleção recorrente recíproca de milho comum da UENF.....	36
3.2.2.3 Marcadores SSR-EST's .....	38
3.2.2.4 Transferibilidade de marcadores SSR-EST's .....	40
3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.2.3.1 Busca pelas sequências.....	41
3.2.3.2 Desenho dos <i>primers</i> .....	42
3.2.3.3 <i>Screening</i> dos <i>primers</i> .....	43
3.2.3.4 Preparo das amostras para avaliação molecular.....	44
3.2.3.5 Extração e quantificação do DNA.....	44
3.2.3.6 Reação de cadeia da polimerase (PCR) .....	45
3.2.3.7 Eletroforese Capilar .....	45
3.2.3.8 Análise dos dados Moleculares .....	46
3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
3.2.4.1 Desenho dos <i>primers</i> .....	46
3.2.4.2 Validação dos <i>primers</i> SSR-EST's.....	47
3.2.4.3 Transferibilidade dos <i>primers</i> SSR-EST's para o milho.....	49
3.2.4.4 Análise dos marcadores SSR-EST's na seleção dos genótipos ....	49
3.2.5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS .....	83



## RESUMO

VETTORAZZI, Julio Cesar Fiorio, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Fevereiro de 2016. Seleção recorrente recíproca em milho (*Zea mays* L.) monitorada por marcadores SSR-EST's associados à produtividade. Orientador: Messias Gonzaga Pereira. Professores Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Helaine Christine Cancela Ramos

O milho é uma das plantas cultivadas de maior importância no cenário mundial. No melhoramento de plantas, um dos métodos mais eficientes tem sido a seleção recorrente, como uma estratégia para a obtenção de ganhos genéticos contínuos. Neste sentido, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro mantém, desde 1996, um programa de melhoramento genético de milho via seleção recorrente recíproca interpopulacional em famílias de irmãos completos. A utilização de marcadores moleculares neste programa foi adotada a partir do oitavo ciclo de seleção, a fim de estimar a divergência genética intra e interpopulacional. Este programa se encontra no 15° ciclo de seleção e já disponibilizou à região Norte/Noroeste Fluminense dois híbridos registrados interpopulacionais de milho, o 'UENF 506-6' e o 'UENF 506-11'. Sendo assim, a proposta desta pesquisa foi a associação do método clássico de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos com o uso de marcadores SSR-EST's relacionados com as características que afetam diretamente a produtividade, como por exemplo, a eficiência do uso de nitrogênio e de fósforo e tolerância ao estresse hídrico. Para tanto, avaliou-se 169 famílias de irmãos completos no delineamento estatístico látice com três repetições em

dois ambientes. A análise de variância demonstrou resultados significativos em relação à variabilidade genética nas populações CIMMYT e Piranão. A etapa de seleção foi realizada pela utilização do índice de seleção de Mulamba e Mock, o qual elegeu as 40 famílias de irmãos completos, consideradas superiores em suas características morfoagronômicas. Os ganhos diretos estimados foram de 12,1% para a característica produtividade. Tais famílias, depois de selecionadas, foram submetidas à genotipagem via marcadores SSR-EST's. Foi desenhado um total de 87 primers SSR-EST's. Foi constatado que 15 deles foram polimórficos na análise das populações. Com a análise do conteúdo de informação polimórfica (PIC), foi observado valor máximo de 0,46 ao passo que o menor valor foi 0,07, com valor médio de 0,29. Foi obtido um total de 37 alelos com número de alelo por locus variando de dois a cinco e média de 2,46. A diversidade genética foi analisada neste estudo através do índice de Shannon (I), no qual foram encontrados valores de 0,53 para população CIMMYT e 0,45 para a população Piranão. A análise do coeficiente de endogamia (f) entre os indivíduos das diferentes populações mostrou valores médios de 0,64 e 0,65 para a população CIMMYT e Piranão, respectivamente. A quantificação da variabilidade foi obtida através da análise de variância molecular, onde, 78% da variância genética foi detectada dentro e 22% entre as populações, antes da seleção com base nos marcadores moleculares, e 67% foi detectada dentro e 33% entre as populações, após a seleção com base nos marcadores moleculares. A população CIMMYT apresentou em três dos 15 locus, alelos privados relacionados com as três características, já a população Piranão apresentou um locus com alelos privados. Os marcadores SSR-EST's foram efetivos em agrupar os genótipos em seus respectivos grupos heteróticos. Os indivíduos selecionados permitirão dar sequência aos ciclos seguintes e incrementar a heterose.

## ABSTRACT

VETTORAZZI, Julio Cesar Fiorio, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February 2016. Reciprocal recurrent selection in (*Zea mays* L.) monitored by EST-SSR's markers associated with grain yield. Advisor: Prof. Messias Gonzaga Pereira; Committee members: Profs. Alexandre Pio Viana and Helaine Christine Cancela Ramos

Maize is one of the most important crops worldwide. In plant breeding, the useful breeding method has been recurrent selection as a strategy for obtaining continuous genetic gains. In this sense, the UENF has been worked since 1996, with maize breeding program by reciprocal recurrent selection interpopulation in full-sib families. The use of molecular markers was included from the eighth cycle of selection in order to estimate the genetic divergence intra and interpopulation. This program is on the 15<sup>th</sup> cycle of selection and has already provided to the Norte/Noroeste Fluminense region, two interpopulation maize hybrids, the 'UENF 506-6' and 'UENF 506-11'. The purpose of this study was the association of the classical method of reciprocal recurrent selection among full-sib families using gene microsatellite markers (EST-SSR's) related to the characteristics that directly affect grain yield, such as the nitrogen and phosphorus use efficiency and hydric stress tolerance. For this, we evaluated 169 full-sib families in lattice statistical design with three replications in two environments. The analysis of variance showed significant results regarding the genetic variability in populations. The selection step was done by Mulamba and Mock selection index. This index selected the top 40 full-sib families based on their agronomic traits. The estimated

direct gain was 12.1% for the grain yield. After selection those families were genotyped via EST-SSR's markers. A total of 87 EST-SSR's primers were designed. In this work was found that 15 of them were polymorphic for the used populations. The analysis of polymorphic information content (PIC) showed maximum value of 0.46 whereas the lowest value was 0.07, with an average value of 0.29. A total of 37 alleles were identified. The allele number per locus ranged from 2 to 5 and average of 2.46. Genetic diversity was assessed in this study by Shannon index (I), which was found to CIMMYT values of 0.53 and 0.45 for the Piranão population. The inbreeding coefficient (f) showed average values of 0.64 and 0.65 for CIMMYT and Piranão population, respectively. The quantification of variability was obtained by analysis of molecular variance. It was observed that 78% and 22% of the variance were detected respectively within and between populations before selection on the basis of molecular markers, and 67% and 33% of the variance were detected respectively within and between populations after selection based on molecular markers. The CIMMYT population presented in 3 of the 15 locus, private alleles for the three traits of this study, and the Piranão population had only 1 locus with private alleles. The EST-SSR's markers were effective to group the genotypes in their heterótico groups. The selected individuals will give sequence to the following cycles and increase heterosis.

## 1. INTRODUÇÃO

Com a modernização da agricultura ao longo dos anos e a importância do milho no cenário mundial, novos desafios têm surgido e os programas de melhoramento genético têm buscado maneiras eficientes para selecionar genótipos superiores. Porém, a dificuldade de melhorar populações para caracteres quantitativos como produtividade é conhecida e exige a utilização de métodos de melhoramento que permitem a manutenção da variabilidade genética para ganhos contínuos com a seleção, visando à maximização do ganho genético, por meio da seleção de alelos favoráveis (Hallauer et al., 2010).

Para alcançar esses ganhos, os melhoristas têm à disposição diversos métodos de melhoramento, desde os mais simples e rápidos, até os mais elaborados, como por exemplo, os baseados no melhoramento populacional. O melhoramento populacional é benéfico uma vez que possibilita a manutenção da variabilidade genética nas populações em estudo e o deslocamento da média do caráter no sentido desejado, por meio do contínuo aumento da frequência de alelos favoráveis na população (Ramalho et al., 2012).

Dentre os métodos de melhoramento populacionais, o melhoramento interpopulacional ou seleção recorrente recíproca, proposto inicialmente por Comstock et al. (1949), baseia-se no melhoramento de duas populações simultaneamente, por meio de modificações de suas frequências gênicas, mantendo-as geneticamente distintas, onde os genótipos superiores são selecionados e recombinados dentro de suas respectivas populações.

Ganhos genéticos significativos têm sido obtidos no melhoramento de várias espécies por meio de seleção recorrente recíproca (Faria et al., 2008; Reis et al., 2009; Berilli et al., 2013). Hull (1945) destaca que a seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos em milho merece destaque, pois permite ganhos nas populações *per se* e/ou em cruzamento.

Desde o ano de 1996, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) mantém um programa de melhoramento genético de milho baseado na metodologia da Seleção Recorrente Recíproca em Famílias de Irmãos Completos (SRRFIC). Esse programa tem se mostrado eficiente, mesmo após vários ciclos de seleção, tornando possível o registro e liberação no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de dois híbridos de milho, 'UENF506-6' e 'UENF506-11', recomendados para a região Norte e Noroeste Fluminense. O segundo híbrido supera o primeiro em aproximadamente 2000 kg ha<sup>-1</sup>, além de expressar excelente resposta agrônômica, principalmente para característica rendimento, considerada uma das principais em um programa de melhoramento de milho (Tardin et al., 2007; Cunha et al., 2012; Berilli et al., 2013).

Nos trabalhos de melhoramento, a seleção é uma ferramenta de suma importância, pois a obtenção de genótipos superiores passa pela seleção e recombinação de famílias e indivíduos selecionados. Neste contexto, a seleção baseada em uma ou poucas características pode se mostrar inadequada por não levar a um produto final superior com relação a vários caracteres. Uma alternativa seria a adoção de índices de seleção, a qual permite combinar as múltiplas informações contidas nas unidades experimentais, de modo a selecionar com base em um grupo de características (Cruz et al., 2004).

Os índices de seleção permitem gerar um agregado genotípico sobre o qual se exerce a seleção e que funciona como caráter adicional, resultante da combinação de determinadas características escolhidas pelo melhorista, nas quais se deseja exercer a seleção simultânea (Amaral Júnior et al., 2010). Segundo Cruz et al. (2004), os índices de seleção permitem obter valores que quantificam o potencial genético de um indivíduo, com base em uma série de características. Ademais, o uso de índices de seleção permite a identificação de genótipos superiores em uma combinação de características consideradas no índice, sendo, dessa forma, uma técnica útil, independente da existência ou não

de correlações entre os caracteres, e deveriam ser usados com mais frequência nos programas de melhoramento (Vilarinho et al., 2003).

Programas de melhoramento genético como a seleção recorrente tem tido impacto significativo na produção agrícola. Porém, ganhos adicionais podem ser obtidos por meio da aplicação de técnicas biotecnológicas, incluindo o uso de marcadores moleculares (Borém e Fritsche-Neto, 2013). Nesse sentido, o programa de seleção recorrente recíproca da UENF introduziu no oitavo ciclo de seleção, uma etapa baseada em marcadores RAPD, visando preservar a variabilidade genética e identificar contaminantes antes da recombinação (Tardin et al., 2007), seguido por marcadores AFLP no décimo ciclo (Gabriel, 2006), marcadores ISSR no décimo primeiro e décimo segundo ciclos (Berilli et al., 2011; da Cunha et al., 2012) e marcadores SSR-EST's no décimo terceiro e décimo quarto ciclos (Galvão et al., 2015).

Marcadores moleculares tais como, polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP's), polimorfismo de fragmentos de tamanho amplificados (AFLP's), polimorfismo de amplificação aleatória de DNA (RAPD), sequências simples repetidas (SSR's), e polimorfismo de nucleotídeo único (SNP's) têm sido utilizados para estudar a diversidade genética e estrutura da população de plantas (Wen et al., 2009). No melhoramento de plantas, os marcadores moleculares tornaram-se ferramentas importantes e eficientes. Marcadores moleculares ligados a características agronômicas podem aumentar a exatidão e veracidade da seleção, reduzindo, assim, a carga de trabalho de campo, sendo a seleção de marcadores um dos fatores para o sucesso de programas de melhoramento.

Entre estes marcadores, os SSR's se destacam por serem abundantes no genoma, codominantes, multialélicos, possuem boa reprodutibilidade, ampla cobertura do genoma, facilidade de detecção por reação de cadeia da polimerase (PCR) e possíveis localizações dos microssatélites (Moe et al., 2010).

O rápido desenvolvimento de estudos sobre sequências expressas (EST's) tem gerado uma nova fonte para desenvolvimento SSR's (Zang et al., 2013). Com o avanço nos projetos de sequenciamento genômico, uma grande quantidade dessas sequências tem sido depositada em bancos de dados públicos, como o National Center Biotechnology Information (NCBI) (Ramu et al., 2013) que, apenas para a espécie *Zea mays* L. em 2015, tinha aproximadamente 2.019.602 de EST's depositados.

Marcadores SSR-EST's são marcadores desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma e que podem aumentar a chance de marcar características de interesse e, conseqüentemente, aumentar a sua eficiência na seleção assistida por marcadores (Ramu et al., 2013).

Os marcadores SSR-ESTs têm sido amplamente empregados como uma poderosa ferramenta genético-molecular, devido ao seu alto nível de transferabilidade entre espécies relacionadas, associação próxima com genes de função conhecida e baixo custo para desenvolvimento com a disponibilidade de bancos de dados públicos (Zhang et al., 2014).

Assim, na presente pesquisa, procurou-se agregar o uso de marcadores SSR-EST's na seleção recorrente de famílias de irmãos completos. Fazendo uso de bancos de dados, procurou-se buscar marcadores associados aos componentes de rendimento, como o uso eficiente do nitrogênio e do fósforo e tolerância ao estresse hídrico.

A proposta é que tais marcadores possam contribuir na detecção da diversidade e distância genética das populações em estudo do ponto de vista do genoma funcional no milho, ampliando as possibilidades de melhor exploração da heterose com foco em rendimento.



## 2. OBJETIVO GERAL

Conduzir o 15° ciclo de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos de milho, bem como encontrar marcadores moleculares SSR-EST's para o milho que estejam potencialmente relacionados com a produtividade, com o intuito de avaliar a diversidade genética, tanto entre, quanto dentro das populações CIMMYT e Piranão.

### 2.1 Objetivos específicos

- Conduzir o 15° ciclo de seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos;
- Avaliar características morfoagronômicas, estimar parâmetros genéticos e selecionar as famílias consideradas superiores;
- Identificar os SSR-EST's que estejam potencialmente relacionados com características que afetem diretamente a produção, como o uso eficiente do nitrogênio, uso eficiente do fósforo e tolerância ao estresse hídrico;
- Desenvolver, otimizar e validar *primers* SSR-EST's que amplifiquem regiões que correspondam a genes de interesse, a partir da utilização de ferramentas de bioinformática;
- Estimar a diversidade genética em progênies de irmãos completos oriundos do programa de seleção recorrente recíproca de milho para

auxiliar na etapa de seleção dos genótipos mais divergentes para compor o bloco de recombinação;

- Potencializar a heterose.

### **3. CAPÍTULOS**

#### **3.1 AVALIAÇÃO, PREDIÇÃO DOS GANHOS GENÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS SUPERIORES DO 15º CICLO DE SELEÇÃO RECORRENTE RECÍPROCA DE MILHO COMUM DA UENF**

##### **3.1.1 INTRODUÇÃO**

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância econômica e social, sendo cultivado em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo, muito utilizado na alimentação humana, animal e, mais recentemente, como fonte de biocombustível. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, sendo superado pelos Estados Unidos e pela China. No Brasil, a cultura do milho ocupa o segundo lugar, em área e produção de grãos, sendo superada apenas pela cultura da soja (FIESP, 2015).

Grande parte do potencial produtivo da cultura no país deve-se também ao significativo empenho de programas de melhoramento genético de plantas, que vem atuando de maneira progressiva sob os caracteres agrônômicos relacionados à produção, resistência a doenças e adaptabilidade a condições adversas (Galon et al., 2010).

Entre os vários métodos de melhoramento, merece destaque a seleção recorrente recíproca, pois, com tal metodologia pode-se explorar tanto dos efeitos aditivos, por meio da concentração dos alelos favoráveis em ambas as populações, bem como dos desvios de dominância, uma vez que se mantém a distância entre as populações, permitindo explorar o fenômeno da heterose por meio do cruzamento entre as populações e/ou de linhagens oriundas das mesmas (Santos et al., 2007).

Nesse sentido, o Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) iniciou a partir de meados da década de 90 um programa de melhoramento de milho via a metodologia de Seleção Recorrente Recíproca em Famílias de Irmãos Completos de Milho (Tardin et al., 2007). Tal metodologia visa promover o acúmulo de alelos favoráveis entre as populações envolvidas CIMMYT e Piranão e a capacidade combinatória entre elas (Reis et al., 2009).

Essa estratégia associada ao uso de índices de seleção proporciona ganhos expressivos, uma vez que permite selecionar, simultaneamente, genótipos que agreguem caracteres favoráveis, tanto agronômicos quanto econômicos. Dentre os índices mais utilizados estão: Smith (1936) e Hazel (1943), Willians (1962), Pesek e Baker (1969) e Mulamba e Mock (1978) (Cruz et al., 2004).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e prever os ganhos genéticos do 15º ciclo de seleção recorrente recíproca de milho comum da UENF, bem como selecionar via índice de seleção de Mulamba e Mock as 40 famílias superiores.

### **3.1.2 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1.2.1 Classificação botânica e origem do milho**

O milho é uma das culturas mais antigas do continente americano e, neste Continente, estão seus centros de origem e diversidade, especificamente, no México. Os parentes silvestres mais próximos do milho são o teosinte (*Zea*

*diploperenni*, *Zea perennis*, *Zea luxuriantes*, *Zea mays mexicana*, *Zea mays parviglumis*, *Zea mays huehuetenangensis*) e o *Tripsacum* (*Tripsacum spp.*) (Hallauer, 1985).

Três hipóteses podem ser consideradas para explicar a origem do milho: a primeira proposta é a da origem comum, sugerida por Weatherwax, em 1954, em que o milho, o teosinte e o *Tripsacum spp.* originam-se de um ancestral comum. A segunda hipótese, descendência do teosinte, é defendida por Beadle (1978) e Galinat (1974, 1977), que sugerem que o milho teria ser originado de forma direta e unicamente do teosinte, por seleção praticada pelo homem. E a última, do milho como antepassado do teosinte, sugerida por Mangesldorf, em 1974, em que o teosinte tenha-se originado do milho.

Dentre as hipóteses citadas atualmente, a considerada mais aceita é a defendida por Galinat (1974, 1977). Os estudos arqueológicos e citológicos demonstram que o milho e o teosinte apresentam características semelhantes, como o mesmo número de cromossomos, os quais são homólogos e, facilmente cruzados para produzir descendentes férteis (Goodman, 1980; Borém e Giúdice, 2004).

O milho é uma gramínea, pertencente à família *Poaceae*, da tribo *Maydeae*, ao gênero *Zea* e a espécie *Zea mays* L.. É uma planta monoica, que apresenta fecundação cruzada (alogamia), tendo sua via de fotossíntese C4; anual, robusta, ereta e diplóide com  $2n=2x=20$  cromossomos (Paterniani, 1980). É uma planta pouco tolerante à seca, por possuir sistema radicular fasciculado e superficial. Suas folhas são alternadas, presas à bainha superpostas que envolvem o colmo e inflorescências (Goodmane Smith, 1987).

A inflorescência feminina, conhecida como espiga, encontra-se na extremidade do rachis, que cresce no nó do fuste, podendo ocorrer a produção de mais de uma espiga. O florescimento se dá pela emergência dos estilos através da palha e ocorre entre dois e três dias após a antese (Goodmane Smith, 1987).

### **3.1.2.2 Importância econômica**

O milho (*Zea mays* L.) tornou-se a principal cultura agrícola do mundo nas últimas temporadas, sendo os Estados Unidos, China, Brasil, Ucrânia, Argentina e México os principais países produtores. É uma das mais importantes culturas

alimentícias, ocupando um lugar de destaque nas mais diversas áreas de pesquisa e da economia mundial. Dos grandes produtores, somente a China e o México não são exportadores do grão. O México importa aproximadamente 10 milhões de toneladas por ano, ficando atrás somente do Japão, que tradicionalmente importa de 15 a 16 milhões de toneladas por ano. Já o Brasil, além de estar posicionado como o terceiro maior produtor, segue como segundo maior exportador (Anuário, 2015).

Sua importância econômica está relacionada com várias formas de utilização, desde alimentação animal até a indústria, onde é empregado como matéria-prima de diversos produtos. Seu uso em grão na alimentação animal representa a maior parte do consumo, sendo que no Brasil varia de 70% a 90% da produção total (Cruz et al., 2011). Aves, suínos, gado de corte e de leite, búfalos, ovinos e caprinos, bem como as inúmeras outras cadeias de carnes e de subprodutos, são diretamente dependentes de milho. Este grão, servido diretamente ou, ainda, na composição de rações, ao lado da soja e de outras matérias-primas, transformam-se, nas micro, pequenas, médias ou grandes propriedades em carne, leite, ovos, assegurando a subsistência de milhões de pessoas (Anuário, 2015).

Embora o percentual destinado à alimentação humana não seja tão grande em relação à sua produção, é um cereal de grande importância (Cruz et al., 2011). Grande parte do milho que passa pela industrialização, para consumo humano, está relacionada a amidos, fubás, farinhas pré-cozidas, flocadas, canjicas, óleo, creme, pipocas, glicose e dextrose. Estes produtos são utilizados diretamente ou como insumo, participando da formulação de certos alimentos terminados (Anuário, 2015).

De acordo com o décimo primeiro levantamento da Conab (2015), na temporada 2014/2015, a produção de milho primeira safra totalizou 30 milhões de toneladas, representando um decréscimo de 4,3% em relação à safra 2013/2014. Somando as duas safras, a produção foi de 84 milhões de toneladas obtidas em 15 milhões de hectares plantados, representando um acréscimo de 5,3% em relação à safra 2013/2014, que atingiu 80 milhões de toneladas. Entretanto, apesar do Brasil estar entre os maiores produtores mundiais de milho e possuir estados como Santa Catarina, onde a produtividade ficou acima de 7 t ha<sup>-1</sup>, na safra 2014/2015, ainda possui produtividade média baixa, com valores em torno

de 5 t ha<sup>-1</sup>, e o estado do Rio de Janeiro com média de 2,4 t ha<sup>-1</sup> e com área média de 3.300 hectares plantados (Conab, 2015).

Nos últimos anos, a agricultura desta região esteve estagnada e é dependente de novas alternativas para o cultivo rentável, o que justifica o desenvolvimento de um programa de melhoramento de milho, destinado a produzir cultivares com características superiores e adaptada às condições da região (Berilli et al., 2013).

Sendo assim, a UENF mantém, desde 1996, um programa de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos (SRRFIC). Este programa já desenvolveu, registrou e recomendou aos produtores do Norte e Noroeste Fluminense dois híbridos de milho: 'UENF 506-6' em 1999/2000 e 'UENF 506-11' em 2013. Nesse sentido, torna-se necessário a continuação do programa de melhoramento de milho via seleção recorrente recíproca, a fim de que em um futuro bem próximo, novos híbridos interpopulacionais adaptados às condições edafoclimáticas da região possam estar disponíveis aos produtores das regiões Norte e Noroeste Fluminense.

### **3.1.2.3 Melhoramento genético via seleção recorrente recíproca**

A seleção recorrente foi primeiramente descrita por Hull (1945), quando o mesmo propôs a seleção geração após geração, com intercruzamentos dos genótipos selecionados, a fim de realizar recombinação genética com o melhoramento de populações de bases genéticas amplas e restritas.

A seleção recorrente recíproca interpopulacional foi proposta por Comstock e Robinson (1949), como um processo de melhoramento de duas populações e de obtenção de híbrido entre elas, com famílias de meios-irmãos paternos interpopulacionais e a recombinação de progênies S<sub>1</sub>. Esta metodologia tem proporcionado, na maioria dos casos, resultados favoráveis com milho e milho-pipoca, em relação à produção, resistência a pragas e doenças, resistência ao acamamento, entre outros caracteres (Keeratinijakal e Lamkey, 1993; Rademacher et al., 1999; Butron et al., 2000; Santos et al., 2007). A mesma afirmação pode ser feita em relação às modificações do método realizadas por Paterniani (1967), que sugeriu o uso de progênies de meios-irmãos maternos interpopulacionais e recombinação de progênies de meios-irmãos; e por

Lonquist e Williams (1967) e Hallauer e Eberhart (1970), que propuseram o emprego de progênies de irmãos-completos interpopulacionais e recombinação de famílias  $S_1$ , para o melhoramento das populações e do híbrido, e de famílias de irmãos-completos interpopulacionais endogâmicas, para a obtenção de híbridos de linhagens. Considera-se que o processo de seleção recorrente recíproca com irmãos-completos maximiza a seleção para capacidade específica de combinação e favorece a obtenção de híbridos superiores de linhagens das populações envolvidas.

A seleção recorrente recíproca já foi amplamente aplicada em várias espécies, por exemplo, em café (*Coffea canephora*) (Montagnon et al. 2008), cacau (*Theobroma cacao* L.) (Pokou et al., 2009), dendezeiro (*Elaeis guineensis*) (Bakoume et al., 2010), milho (*Zea mays* L.) (Pinto et al., 2003; Butruille et al., 2004; Hinze et al., 2005; Tardin et al., 2007; Romay et al., 2011; Cunha et al., 2012; Berilli et al., 2011, 2013; Galvão et al., 2015), Feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Menezes Júnior et al., 2008) e maracujá (*Passiflora edulis*) (Silva e Viana, 2012).

Com o milho, os primeiros resultados de seleção recorrente recíproca com irmãos-completos foram relatados por Hallauer (1973), que observou ganho em produção, de 10,1% no híbrido interpopulacional, depois de um ciclo de seleção envolvendo as populações 'Iowa Two Ear Synthetic' e 'Pioneer Ear Composite'. Hallauer (1985), ao trabalhar com famílias de irmãos-completos, também obteve resultados favoráveis em sete ciclos de seleção, com as populações BS10 e BS11. A resposta direta na população híbrida foi de 2,1% por ciclo, para a produção, e as respostas correlacionadas nos parentais BS10 e BS11 foram de 2,7 e 2,4%. Rademacher et al. (1999), ao utilizar seleção recorrente recíproca com irmãos-completos, nas populações BS21 e BS22, obtiveram aumento significativo em rendimento de grãos, atingindo 4,4% por ciclo. Esses autores observaram ainda que os ganhos realizados com seleção para rendimento de grãos representaram 25 a 50% do ganho predito.

Ribeiro Junior et al. (2000), com o intuito de verificar a eficiência da seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos-completos, por meio de uma metodologia baseada em alguns parâmetros genéticos, perceberam que a maior parte dos ganhos genéticos nas populações foram devidas aos efeitos aditivos na troca dos alelos desfavoráveis pelos favoráveis do que pelos efeitos de dominância. Porém, segundo Santos (2003), a seleção recorrente recíproca é



vantajosa tanto pelos efeitos aditivos na concentração dos alelos favoráveis em ambas as populações, bem como dos desvios de dominância, uma vez que é possível manter a distância entre as populações, permitindo o fenômeno da heterose por meio do cruzamento entre as populações ou obtenção de linhagens das mesmas.

Daros et al. (2004), com o propósito de monitorar as respostas de blocos gênicos em diferentes gerações de seleção recorrente em milho pipoca, quantificaram as correlações fenotípica, genotípica e de ambiente entre caracteres agrônômicos, em dois ciclos de seleção recorrente e perceberam que houve acréscimo da correlação genotípica entre rendimento de grãos e capacidade de expansão do primeiro para o segundo ciclo, denotando aumento na concentração de alelos favoráveis na população.

Ao utilizar famílias de irmãos-completos das populações IG-1 e IG-2, Santos et al. (2005) avaliaram o efeito de três ciclos de seleção recorrente recíproca sobre as médias, as variâncias genéticas e as correlações de várias características. Para produção de grãos foram observados ganhos de 4,07% por ciclo. Em relação à variância genética, foram observados pequenos decréscimos, insuficientes para limitar a melhoria da população e a obtenção de linhagens para formação de híbridos. Santos et al. (2007) avaliaram os efeitos de capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação no processo de seleção recorrente recíproca modificada. Segundo esses autores, tanto a CGC quanto a CEC contribuem para a melhoria do híbrido da população, no entanto, a CEC tem maior contribuição para produtividade.

Peiris e Hallauer (2005), com base nos resultados de simulação, concluíram que a seleção recorrente recíproca de meios irmãos e de irmãos completos foi igualmente eficiente, independentemente de unidades de recombinação. Com base na intensidade de seleção, tamanho efetivo da população, o tempo necessário para concluir um ciclo de seleção, e os recursos financeiros e humanos disponíveis, eles concluíram que seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos foi o método mais eficiente.

Jenweerawat et al. (2009) verificaram que o método modificado sugerido por Russell e Eberhart (1975) melhorou a capacidade específica de combinação. Eles observaram que o rendimento de grãos do híbrido interpopulacional de milho *top ten* no primeiro ciclo foi maior do que do híbrido do ciclo zero. A mesma

conclusão foi estabelecida por Souza Júnior et al. (2010). Este estudo comparou a produção de grãos de híbridos obtidos a partir de linhagens  $S_3$  com híbridos simples comerciais. Eles também observaram um aumento da importância relativa dos efeitos não-aditivos sobre os efeitos aditivos para produtividade de grãos, além de aumentar a produtividade de grãos e a heterose do híbrido. Romay et al. (2011), trabalhando com duas populações, uma do norte e outra do sul da Espanha, observaram um incremento no rendimento de grãos em uma população e nenhum incremento na outra população, e a redução na depressão por endogamia após três ciclos de SRR de irmãos completos em milho.

Berilli et al. (2013), avaliando o 11º ciclo de seleção recorrente recíproca da UENF, verificaram que as populações avaliadas são promissoras para a consecução de novos ciclos de seleção, proporcionando a concentração contínua de alelos favoráveis e a produção de híbridos para as regiões Norte e Noroeste Fluminense. Este incremento na concentração de alelos favoráveis se destaca no melhoramento de populações de milho como um dos principais objetivos, a fim de criar condições para a obtenção de ganhos genéticos para características de interesse agrônomo em cada novo ciclo de seleção (Hallauer et al., 2010).

#### **3.1.2.4 Índice de seleção Mulamba e Mock**

Na condução de um programa de melhoramento genético vegetal, é comum a avaliação de vários caracteres com o objetivo de praticar a seleção em alguns deles, simultaneamente. Nesse aspecto, o genótipo selecionado deve reunir, ao mesmo tempo, uma série de atributos favoráveis capazes de satisfazer as exigências do produtor ou consumidor (Silva e Viana, 2012).

Dessa forma, o uso de estratégias que permitem a seleção simultânea de um conjunto de caracteres de maior importância econômica pode aumentar o êxito dos programas de melhoramento (Santos et al., 2007).

O uso dos índices de seleção é uma ótima alternativa para a obtenção de respostas e ganho de seleção para mais de um caráter, simultaneamente, permitindo obter genótipos com padrões adequados para diversas características de forma mais rápida do que a seleção truncada. Associada a isto, a seleção baseada em um ou poucos caracteres pode gerar alterações indesejáveis em outras, devido a correlações genéticas negativas entre elas (Silva e Viana, 2012).

Na literatura são encontrados vários índices de seleção, os quais podem ser utilizados no melhoramento de plantas (Cruz et al., 2004). Estes índices são obtidos como combinações lineares das medidas de diversos caracteres, podendo ser eficientes, uma vez que, permitem a avaliação de todas as informações disponíveis, atribuem diferentes pesos aos caracteres estudados e valorizam atributos julgados de maior importância pelo pesquisador (Falconer, 1987).

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

Costa et al. (2004) concluíram que o uso dos índices de seleção é vantajoso em soja, uma vez que proporcionaram maiores ganhos totais, distribuídos entre todos os caracteres avaliados. Também concluíram que o índice baseado na soma de *ranks* ou Mulamba e Mock (1978), revelaram-se mais adequado, com progressos superiores em várias situações. Silva e Viana (2012) verificaram que esse mesmo índice permitiu selecionar progênies superiores de maracujá para dar prosseguimento ao programa de seleção recorrente intrapopulacional.

Rangel et al. (2011), na condução do quinto ciclo de seleção recorrente em população de milho pipoca, utilizando vários índices de seleção, verificaram que o índice de Mulamba e Mock resultou em ganhos proporcionais mais adequados para capacidade de expansão e rendimento de grãos, com valores respectivos de 6,01 e 8,53%, na utilização de pesos econômicos arbitrários.

Bertini et al. (2010), trabalhando na identificação de genótipos superiores de feijão-caupi por meio de índices de seleção, verificou que o índice baseado na soma de *ranks* permitiu identificar genótipos superiores e divergentes assegurando a escolha de parentais com maior potencial produtivo e que pudessem ser utilizados na formação de populações segregantes.

Os índices de seleção têm sido utilizados como alternativas de seleção em várias espécies vegetais, como, milho-pipoca (Freitas Júnior et al., 2009, Freitas et al., 2013), soja (Vasconcelos et al., 2008), cana-de-açúcar (Pedrozo et

al., 2009), maracujá (Oliveira et al., 2008, Silva et al., 2009), feijão de corda (Santos e Araujo, 2001), Eucalipto (Martins et al., 2006), Alfafa (Vasconcelos et al., 2010), entre outras.

Como verificado, a utilização de índices de seleção permitem selecionar genótipos superiores, resultantes da combinação de determinadas características escolhidas pelo melhorista. Neste sentido, o programa de melhoramento genético de milho comum via seleção recorrente recíproca da UENF, ao longo dos seus 15 ciclos de seleção, tem utilizado os índices de seleção com o intuito de selecionar as famílias consideradas superiores para compor a etapa de recombinação do programa. Vários foram os índices aplicados ao longo dos ciclos para a seleção. No 11º ciclo de seleção, o índice de Mulamba e Mock foi o que apresentou melhores resultados, com ganho de 12,90% para a característica produção, sendo este índice utilizado na seleção dos genótipos superiores (Berilli et al., 2013).

### **3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.3.1 Material genético**

Foram utilizadas duas populações de milho (*Zea mays* L.) pertencentes a grupos heteróticos distintos, sendo uma a população CIMMYT, pertencente a um grupo heterótico tipo 'duro' e outra, a população Piranão, pertencente a um grupo heterótico 'dentado'. Ambas as populações possuem um gene braquítico que confere a característica de porte mais baixo às plantas. Estas populações são oriundas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram trabalhadas até o quinto ciclo de seleção recorrente recíproca. Do sexto ciclo em diante foi dado prosseguimento ao melhoramento dessas populações na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), onde o mesmo se encontra no 15º ciclo de seleção recorrente recíproca.

### 3.1.3.2 Geração das famílias de irmãos completos e das sementes $S_1$

Foi utilizado o método de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos descrito por Hallauer e Miranda Filho (1988). Para obtenção das famílias e das sementes  $S_1$ , as populações CIMMYT e Piranão, foram plantadas no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes, região Norte do estado do Rio de Janeiro, situado a 21° 45' de latitude sul e 41° 20' de longitude oeste, e a 11 m de altitude. As sementes foram semeadas com uma profundidade de 0,05 m e cada fileira foi composta por 6,0 m de comprimento e distanciadas em 1,0 m entre si, e as plantas dentro de cada fileira ficaram espaçadas por 0,4 m. O plantio foi feito em fileiras alternadas para facilitar os cruzamentos de maneira a permitir a obtenção de famílias de irmãos completos. As plantas de cada fileira foram numeradas para posterior identificação por ocasião dos cruzamentos.

De acordo com a análise de solo, a adubação de semeadura foi realizada aplicando-se 800 kg ha<sup>-1</sup> de adubo N-P-K na formulação 04-14-08. A primeira adubação de cobertura foi realizada 30 dias após a semeadura, por ocasião da amontoa, aplicando-se 300 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 20-00-20. A segunda adubação foi realizada aos 45 dias após a semeadura na dosagem de 260 kg ha<sup>-1</sup> de sulfato de amônio (Sawazaki, 2001). Todos os tratos culturais foram realizados conforme o recomendado por Fancelli e Dourado Neto (2000).

Para cada par de plantas foram feitas duas autofecundações e dois cruzamentos recíprocos. As polinizações foram realizadas manualmente; todas as linhas foram percorridas diariamente, buscando-se espigas e pendões aptos à polinização. As espigas foram cobertas antes da emissão dos estilos-estigmas com sacos plásticos apropriados. Em seguida, efetuou-se a preparação dos pendões, cobrindo-os com sacolas de papel tipo 'Kraft', para uso do pólen no dia seguinte. Este procedimento garantiu a origem do pólen contido na sacola e evitou o contato com pólen exógeno, uma vez que o grão de pólen se mantém viável por oito horas para uso. Estes procedimentos foram repetidos até o fim do período de polinização, em ambas as populações. Deste modo, foram obtidas 169 famílias de irmãos completos e 338 autofecundações  $S_1$ . As famílias de irmãos completos foram usadas para o ensaio de competição. Todas as sementes  $S_1$  obtidas foram armazenadas, uma vez que aquelas correspondentes às famílias

superiores identificadas na etapa de avaliação das famílias de irmãos completos foram submetidas à genotipagem via marcadores moleculares.

### 3.1.3.3 Avaliação das famílias de irmãos completos

As famílias de irmãos completos obtidas na etapa anterior foram avaliadas em dois ambientes. O primeiro ambiente foi o Colégio Estadual Agrícola Antonio Sarlo, em Campos dos Goytacazes (Norte do Estado do Rio de Janeiro) e o segundo, na Estação Experimental da Pesagro-Rio, em Itaocara (Centro Estadual de Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira, em Itaocara – Noroeste Fluminense). Cada ambiente foi avaliado no delineamento em látice quadrado 13 x 13, com três repetições.

De acordo com a análise de solo, a adubação de semeadura foi realizada aplicando-se 800 kg ha<sup>-1</sup> de adubo N-P-K na formulação 04-14-08. A primeira adubação de cobertura foi realizada 30 dias após a semeadura, por ocasião da amontoa, aplicando-se 300 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 20-00-20. A segunda adubação foi realizada aos 45 dias após a semeadura na dosagem de 260 kg ha<sup>-1</sup> de sulfato de amônio (Sawazaki, 2001). Todos os tratos culturais foram realizados conforme o recomendado por Fancelli e Dourado Neto (2000).

Cada unidade experimental (famílias de irmãos completos) foi cultivada em fileiras de 3,0 m de comprimento, espaçadas por 1,0 m uma das outras e 0,2 m entre plantas. Foram semeadas 32 sementes por fileira e após 30 dias de plantio, foi feito o desbaste, deixando 16 plantas por fileira, aproximadamente 53.000 plantas ha<sup>-1</sup>.

Após o florescimento das plantas e colheita, foram avaliadas as seguintes características: *Stand* final (NPL): obtido pela contagem do número total de plantas contidas na parcela no momento da colheita; Número de plantas quebradas (NPQ): obtido pela contagem do número de plantas quebradas no momento da colheita; Número de espigas (NE): obtido pela contagem total de espigas colhidas numa mesma parcela; Número de espigas doentes (NED): obtido a partir da contagem de espigas doentes no momento da contagem das espigas após a colheita; Número de espigas atacadas por pragas (NEP): obtido pela contagem das espigas que apresentavam algum ataque de praga; Peso de espigas (PE): obtido pela pesagem em quilogramas das espigas despalhadas

após a colheita; Peso de 100 grãos (P100): obtido pela pesagem em gramas, de uma amostra de 100 grãos sadios, determinado com duas casas decimais; Produtividade (PROD): obtida a partir da pesagem dos grãos de cada parcela após a debulha e convertidos em  $\text{kg ha}^{-1}$ .

### 3.1.3.4 Análise estatística

#### 3.1.3.4.1 Análise de variância

As variáveis foram submetidas a uma análise de variância conforme o delineamento em látice quadrado, de acordo com o modelo genético estatístico proposto por Cochran e Cox (1957):

$$Y_{il(j)(p)} = \mu + A_{(p)} + R/A_{(j)(p)} + B/R/A_{(l)(j)(p)} + G_{(i)} + GA_{(i)(p)} + e_{il(j)(p)}$$

Onde:

$\mu$  = Constante geral;

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

$R/A_{(j)(p)}$  = efeito da j-ésima repetição dentro do p-ésimo ambiente  $\sim \text{NID}(0, \sigma_r^2)$ ;

$B/R/A_{(l)(j)(p)}$  = efeito do l-ésimo bloco dentro da j-ésima repetição dentro do p-ésimo ambiente  $\sim \text{NID}(0, \sigma_b^2)$ ;

$G_i$  = efeito do i-ésimo genótipo  $\sim \text{NID}(0, \sigma_g^2)$ ;

$GA_{(i)(p)}$  = efeito da interação do i-ésimo genótipo e do l-ésimo ambiente  $\sim \text{NID}(0, \sigma_{ga}^2)$ ;

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

Após a verificação da normalidade das variáveis por meio do teste de Kolmogorov – Smirnov, foi observado que as características NPQ, NED e NEP não seguiam as pressuposições de normalidade e independência dos erros, sendo estas submetidas a uma transformação  $\sqrt{(x + 0,5)}$ .

Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do software SAS (*Statistical Analyses System-SAS Institute, 2003*), versão 9.1.

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

**Quadro 1.** Análise de variância conjunta e as esperanças de quadrados médios para as respectivas fontes de variação.

FV	GL	QM	E (QM)	F
Ambientes (A)	a-1	QMA	$\sigma^2 + rb\sigma_{GA}^2 + g\sigma_{B/R/A}^2 + gbr\sigma_{R/A}^2 + rbg\sigma_A^2$	$(QMA+QMR)/$ $(QMB+QMGA)$
REP/A	a(r-1)	QMRep	$\sigma^2 + gb\sigma_{R/A}^2$	-
Bloco/Rep/A	ar(b-1)	QMB	$\sigma^2 + g\sigma_{B/R/A}^2$	-
Genótipo	(g-1)	QMG	$\sigma^2 + rbe\sigma_G^2$	QMG/QMR
G x A	(a-1)(g-1)	QMGA	$\sigma^2 + rb\sigma_{GA}^2$	QMGA/ QMR
Resíduo	a(b-1)(g-1)	QMR	$\sigma^2$	-
Total	agr	-	-	-

a= número de ambientes; b= número de blocos; r= número de repetições; g= número de genótipos.

### 3.1.3.4.2 Estimação dos componentes de variância e parâmetros genéticos

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

O estimador da variância genotípica entre famílias foi expresso por:

$$\sigma_g^2 = (QMG-QMR)/Ra$$

Em que:

QMG = quadrado médio dos genótipos;

QMR = quadrado médio do resíduo;

r = repetição; e

a = ambiente.

O estimador da variância fenotípica entre famílias foi expresso por:

$$\sigma_f^2 = QMG/ra$$



Em que:

QMG = quadrado médio dos genótipos;

r = repetição; e

a = ambiente.

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

$$h_{\bar{X}_f}^2 = \sigma_g^2 / \sigma_f^2$$

$$\text{Coeficiente de variação genética: } CV_{g(\%)} = \left[ 100 \sqrt{\sigma_g^2 / \bar{x}} \right]$$

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

Os ganhos por seleção (GS) foram estimados por:

$$GS = (\bar{X}_s - \bar{X}_0) \cdot h_{\bar{X}_f}^2$$

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

$\bar{X}_0$  = média de todas as famílias avaliadas; e

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

#### 3.1.3.4.3 Identificação das progênies superiores

Para a seleção das famílias superiores, priorizou-se a seleção de famílias mais produtivas e que possuíssem uma menor média para características consideradas indesejáveis, tais como: NPQ, NED e NEP.

Foram testadas diferentes estratégias com diferentes pesos, sendo eles: a) coeficiente de variação genético (CVg); b) Índice de Variação (CVg/Cve) ; c) herdabilidade com base na média das famílias ( $h_{\bar{X}_f}^2$ ); e d) valores atribuídos por tentativas (PT) de magnitudes de 300, 300, 100, 100, 20, 10, 10 e 10, respectivamente, para as características PROD, PE, NPL, NE, P100, NPQ, NED e NEP. Sendo que para as NPQ, NED e NEP foram utilizados peso de 10 com o intuito de reduzir o ganho de tais características.

Assim, para a seleção das famílias superiores, aplicou-se o índice de seleção de Mulamba e Mock (1978), utilizando os recursos computacionais do programa SAS, seguindo a rotina descrita por Silva, (2015).

#### **3.1.3.4.4 Seleção Direta**

Estimaram-se os ganhos de seleção direta para a característica produtividade ( $GS_{dx}$ ) e os ganhos para as características afetadas pela seleção direta em produtividade, através do sistema adotado por Falconer (1987):  $GS = DS_x \cdot h^2$ , sendo:  $DS_x$  = diferencial de seleção e  $h^2_x$  = coeficiente de herdabilidade.

### **3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1.4.1 Avaliação das Famílias de Irmãos Completos e Análise de Variância**

Na Tabela 1, encontram-se as estimativas e as significâncias dos quadrados médios, bem como as médias e os coeficientes de variação experimental com base na média das oito características avaliadas, nas famílias de irmãos completos, nos dois ambientes avaliados, Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ.

Os coeficientes de variação experimental foram de 9,5% para a característica peso de 100 grãos (P100), 11,04% para *stand* final (NPL), 15,14% para número de espigas (NE), 19,01% para peso de espigas (PE) e 19,66% para a produtividade (PROD) (Tabela 1). De acordo com as classificações propostas por Scapim et al. (1995), e Fritsche-Neto et al. (2012), as quais foram elaboradas considerando a cultura do milho e a natureza das características avaliadas, os coeficientes de variação podem ser considerados medianos, o que demonstra uma boa precisão experimental. Cabe ressaltar que a estimativa da precisão experimental é fundamental, uma vez que trabalhos científicos são realizados e comparados (Scapim et al., 1995).

Já para as características: número de plantas quebradas (NPQ), número de espigas doentes (NED) e número de espigas atacadas por pragas (NEP), após a transformação dos dados, apresentaram valores de coeficiente de variação experimental, 31,12%, 26,05% e 34,58%, respectivamente.

Ainda pela análise de variância (tabela 1), constataram-se diferenças significativas pelo teste F entre as famílias para quase todas as características, exceto NED. Esse resultado indica a presença de variabilidade genética entre os genótipos, o que é de fundamental importância para obtenção de ganhos genéticos em programas de melhoramento. Já para NED, a ausência de variabilidade indica que os genótipos analisados não são susceptíveis a doenças. A análise da interação ambiente por famílias (tabela 1) revelou significância para todas as características. A presença de valor significativo, na interação ambiente x família, evidencia que as famílias estudadas não mantiveram a mesma resposta para as características em estudo nos dois ambientes, indicando que as melhores famílias em um local podem não ser em outro.

Resultados de interações significativas entre famílias e ambientes para estas características também foram encontrados por Ferrão (1985), Daros et al. (2004), Santos et al. (2007), Tardin et al. (2007) e Cunha et al. (2012), entre outros. Porém Berilli et al. (2013), na condução do décimo primeiro ciclo de seleção recorrente recíproca da UENF, verificaram, para a maioria das características avaliadas, ausência de significância para interação tratamentos x ambientes. A interação genótipo x ambiente é um importante fenômeno para os melhoristas e agrônomos que atuam nos testes comparativos e na recomendação de cultivares. Quanto maior a diversidade genética entre os genótipos e entre os ambientes, maior importância será essa interação.

A significância para a interação ambiente por família e a redução na produtividade do décimo quinto ciclo em relação ao décimo quarto pode ser explicada pelo baixo volume pluviométrico registrado na região Norte e Noroeste Fluminense, durante o período de setembro de 2014 a março de 2015 (INMET, 2015). Bergamaschi et al. (2004) relatam que as oscilações nas safras de milho das principais regiões produtoras do Brasil estão associadas à disponibilidade de água, sobretudo no período crítico da cultura, que vai do pendoamento ao início do enchimento de grãos.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância conjunta com os respectivos quadrados médios e graus de liberdade (GL), estimativas dos coeficientes de variação experimental (CVe%) e das médias para as características avaliadas, no ensaio em delineamento em látice em dois ambientes, Campos dos Goytacazes e Itaocara – RJ.

FV	GL	Quadrado Médio <sup>1/</sup>							
		NPL	NE	PE	P100	PROD	NPQ <sup>(1)</sup>	NED <sup>(1)</sup>	NEP <sup>(1)</sup>
Ambientes (A)	1	0,193 <sup>ns</sup>	537,12 <sup>**</sup>	286117,44 <sup>ns</sup>	1010,69 <sup>**</sup>	1752429,1 <sup>ns</sup>	139,20 <sup>**</sup>	1,79 <sup>**</sup>	129,69 <sup>**</sup>
Rep (amb)	4	3,287 <sup>ns</sup>	142,59 <sup>**</sup>	3914065,94 <sup>**</sup>	171,40 <sup>**</sup>	31499945,8 <sup>**</sup>	7,705 <sup>**</sup>	0,15 <sup>**</sup>	0,98 <sup>**</sup>
Bloco (amb*rep)	72	3,21 <sup>ns</sup>	26,49 <sup>**</sup>	574884,45 <sup>**</sup>	15,25 <sup>**</sup>	4724664,8 <sup>**</sup>	0,714 <sup>**</sup>	0,055 <sup>*</sup>	0,27 <sup>**</sup>
Famílias (F)	168	4,099 <sup>**</sup>	46,23 <sup>**</sup>	533715,00 <sup>**</sup>	18,36 <sup>**</sup>	4432298,0 <sup>**</sup>	0,86 <sup>**</sup>	0,050 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>*</sup>
A x F	168	4,527 <sup>**</sup>	23,11 <sup>**</sup>	504900,10 <sup>**</sup>	7,29 <sup>*</sup>	4287369,7 <sup>**</sup>	0,75 <sup>**</sup>	0,053 <sup>*</sup>	0,22 <sup>*</sup>
Resíduo	600	2,86	12,57	176728,8	5,85	1460563	0,36	0,042	0,16
Média Geral	-	15,32	23,42	2210,96	25,36	6145,4	1,94	0,78	1,17
Média em Campos	-	15,30	24,15	2227,76	24,36	6186,97	1,57	0,83	1,53
Média em Itaocara	-	15,34	22,70	2194,17	26,36	6103,83	2,30	0,74	0,82
CV (%)	-	11,04	15,14	19,01	9,5	19,66	31,12	26,05	34,58
Eficiência (%)	-	101,29	111,85	124,14	117,21	123,94	111,28	103,4	109,9

<sup>1/</sup> NPL = stand final; NE = número de espigas; PE = peso de espigas; P100 = peso de 100 grãos; PROD = produtividade (Kg ha<sup>-1</sup>); NPQ = número de plantas quebradas; NED = número de espigas doentes; NEP = número de espigas atacadas por praga. (1) NPQ, NED e NEP dados transformados  $\sqrt{(x+0,5)}$ ; <sup>ns</sup> Não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; <sup>\*</sup> Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade; <sup>\*\*</sup> Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

Ainda, de acordo com a tabela 1, para a característica PROD, a média foi de 6.145,4 Kg ha<sup>-1</sup>, superior ao relatado por Tardin et al. 2007, Berilli et al. 2013 e Cunha et al. 2012, na condução do nono, décimo primeiro e décimo segundo ciclos de seleção recorrente recíproca, em que a média foi, respectivamente, 4.640,00 Kg ha<sup>-1</sup>, 4.778,00 Kg ha<sup>-1</sup> e 5.008,14 Kg ha<sup>-1</sup>. Entretanto, foi inferior ao relatado por Vettorazzi (2014), na condução do décimo quarto ciclo de seleção recorrente recíproca, onde que para a característica PROD a média foi de 7.019,4 Kg ha<sup>-1</sup>. Para a característica P100, a média foi de 25,36 g (Tabela 1). Tardin et al. (2007) e Cunha et al. (2012), na condução do oitavo e do décimo segundo ciclos de seleção recorrente recíproca, encontraram valores de 25 e 30,88 g, valores próximos ao encontrado nesse ciclo.

A eficiência do delineamento em látice foi superior a 100% para todas as características (Tabela 1), tal eficiência evidencia que houve redução da variância fenotípica, levando a um aumento da herdabilidade. As magnitudes destas eficiências variaram de 1,29% para a característica NPL a 24,14% para a característica PE. Silva et al. (2012) utilizaram o delineamento em látice para avaliar progênies de irmão-completo de maracujazeiro. Este delineamento se mostrou eficiente em apenas três características: número de dias para o florescimento (17,47%), teor de sólidos solúveis (3,78%) e peso da polpa (0,38%).

O delineamento em látice é utilizado para reduzir a heterogeneidade da área quando os melhoristas necessitam avaliar um grande número de indivíduos, uma vez que não há como prever se a área experimental é ou não homogênea (Ramalho et al., 2012). A eficiência de um delineamento em látice está associada à sua capacidade de proporcionar condições para a discriminação das médias dos tratamentos avaliados.

#### 3.1.4.2 Estimativas dos Parâmetros Genéticos

Encontram-se na Tabela 2, as estimativas das variâncias genotípicas ( $\sigma_g^2$ ), fenotípica ( $\sigma_f^2$ ), coeficientes de variação genética CVg (%), coeficiente de herdabilidade ( $h_{x_f}^2$ ) e índice de variação (Iv).

O coeficiente de variação genética (CVg%) variou de 2,97% a 14,85% para as características NPL, NED, P100, NEP, NE, PE, PROD e NPQ (Tabela 2), sendo que para a característica PROD o CVg % foi de 11,45. Cunha et al. (2012),

conduzindo o décimo segundo ciclo de seleção recorrente, encontrou para as características PROD, PE, NE, NPL, P100 valores de CVg% variando de 2,21% a 13,21%.

Estimativas do coeficiente de variação genética (CVg) permitem ao melhorista ter uma percepção da grandeza relativa das mudanças que podem ser obtidas por meio de seleção, ao longo de um programa de melhoramento, já que se trata de um parâmetro, cuja estimativa é diretamente proporcional à variância genética (Silva et al., 2012).

Outro parâmetro que pode auxiliar na tomada de decisão do processo seletivo é o índice de variação (Iv). Por traduzir a relação entre CVg e CVe, permite supor sobre a eficiência de programas de melhoramento na obtenção de ganhos seletivos desejáveis (Silva et al., 2012). O estimador Iv é utilizado para determinar as chances de sucesso na seleção, no que dependerá de sua magnitude, principalmente para as situações em que for igual ou superior à unidade (Vencovsky, 1987).

Os valores estimados para os índices de variação (Iv) variaram de 0,18 para a característica NED até 0,67 para NE. Para as características PROD, PE, NE e P100, os valores foram de 0,58, 0,58, 0,67 e 0,60, respectivamente. Cunha et al. (2012), conduzindo o décimo segundo ciclo de seleção recorrente recíproca encontrou valores variando de 0,48 a 0,67 para essas mesmas características, indicando predominância da variação experimental sobre a variação genotípica. Este parâmetro ajuda na indicação da presença de variabilidade genética na população em estudo e na seleção do método a ser utilizado para melhoramento genético (Berilli et al., 2013).

As estimativas de herdabilidade (Tabela 2) com base na média das famílias ( $h^2_{X_f}$ ) variaram entre 15% a 73%, sendo que para produtividade, a herdabilidade foi de 67%. Cunha et al. (2012), na condução do décimo segundo ciclo de seleção recorrente, observaram valores de herdabilidade variando de 48,33% a 64,27%, sendo que para produção de grãos foi observado valor de 48,33%.

**Tabela 2.** Estimativas das variâncias genotípicas ( $\sigma_g^2$ ), fenotípica ( $\sigma_f^2$ ), coeficientes de variação genética  $CV_g$  (%), coeficiente de herdabilidade ( $h_{X_f}^2$ ) e índice de variação ( $I_v$ ).

Características	Parâmetros genéticos				
	$\sigma_g^2$	$\sigma_f^2$	$CV_g$ (%)	$h_{X_f}^2$	$I_v$
PROD	495289	738716	11,45	67,0	0,58
PE	59497,7	88952,5	11,03	67,0	0,58
NE	5,61	7,7	10,11	73,0	0,67
NPL	0,2	0,68	2,96	30,0	0,27
P100	2,085	3,06	5,70	68,0	0,60
NPQ	0,083	0,14	14,85	60,0	0,47
NED	0,0013	0,0083	4,60	16,0	0,18
NEP	0,0066	0,03	6,94	22,0	0,20

PROD = produtividade ( $Kg\ ha^{-1}$ ); PE = peso de espigas; NE = número de espigas; NPL = stand final; P100 = peso de 100 grãos; NPQ = número de plantas quebradas; NED = número de espigas doentes; NEP = número de espigas atacadas por praga.

Esse aumento nas estimativas de herdabilidade está relacionado diretamente com a eficiência do látice. Como para todas as características avaliadas o látice foi eficiente, era esperado esse aumento nas estimativas de herdabilidade, que diretamente influencia a precisão experimental. Daros et al. (2004), Amorim e Souza (2005), Câmara et al. (2007) e Rangel et al. (2008) também encontraram valores de herdabilidade elevados para produção, 84,15%, 81,69%, 94% e 93,95%, respectivamente.

### 3.1.4.3 Seleção Baseada no Índice de Mulamba e Mock (1978)

A Tabela 3 apresenta as estimativas dos ganhos percentuais pelo índice de Mulamba e Mock (1978), com a utilização de diferentes pesos, sendo eles: coeficiente de variação genético ( $CV_g$ ); Índice de Variação ( $CV_g/Cve$ ); herdabilidade com base na média das famílias ( $h_{X_f}^2$ ) e; valores atribuídos por tentativas (PT) para as oito características avaliadas.

Conforme a premissa, no melhoramento de plantas existe dificuldade em se estabelecer pesos econômicos. Os pesos econômicos podem ser estimados a partir de estatísticas dos próprios dados experimentais. Assim, o coeficiente de variação genotípico ( $CV_g$ ) se constituiria em um bom referencial, pelo fato de ser

um parâmetro adimensional e diretamente proporcional à variância genética (Cruz, 1993).

Entretanto, ao comparar os ganhos obtidos por meio dos pesos econômicos utilizados para todas as características em estudo, verifica-se que os ganhos foram próximos, ligeiramente maiores quando utilizado o peso por tentativa (PT), sendo PT considerado como mais adequado para a seleção das 40 famílias superiores correspondentes ao 15º ciclo de seleção recorrente recíproca.

O ganho percentual para a característica produtividade quando utilizados os seguintes pesos CVg/CVe e  $h^2$ , CVg e PT foi de 11,52%, 11,79% e 12,11%, respectivamente. Tardin et al. (2007) no nono ciclo de seleção, utilizando o índice de Smith e Hazel, obteve ganho percentual de 4,68% para produção. Já Berilli et al. (2013), conduzindo o décimo primeiro ciclo de seleção recorrente recíproca e fazendo uso de diferentes índices de seleção, verificaram que o índice que permitiu os melhores ganhos foi o de Mulamba e Mock, com ganho percentual de 12,90%, bem próximo ao relatado nesse trabalho, ambos autores utilizaram peso atribuído por tentativa. Cunha et al. (2012), para a seleção das famílias superiores do 12º ciclo de seleção recorrente recíproca, utilizaram quatro índices de seleção e os pesos econômicos CVg, desvio padrão genético (DPg), (CVg/CVe),  $h^2$  e PT, e verificaram que o índice que permitiu os melhores ganhos foi o de Mulamba e Mock, obtendo ganho de 9,58 % para PROD quando utilizados pesos atribuídos por tentativa.

Souza Junior e Pinto (2000) obtiveram um ganho direto de 7,2% para a característica produtividade com a seleção recorrente recíproca para famílias de meios-irmãos. Santos et al. (2008), trabalhando com seleção recorrente de meios-irmãos em milho pipoca, basearam-se no índice de Mulamba e Mock, e encontraram ganhos preditos de 10,00% para a característica produtividade.



**Tabela 3.** Estimativas dos ganhos percentuais pelo índice de Mulamba e Mock com base em quatro critérios de pesos econômicos para oito características avaliadas no décimo quinto ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos da UENF.

Característica	Xo	Xs	DS	GS	GS%	Xo	Xs	DS	GS	GS%
	Peso atribuído por tentativa					CVg				
<b>PROD</b>	6.145,4	7.256,46	1.111,05	744,40	12,11	6.145,4	7.226,38	1.080,98	724,25	11,79%
<b>PE</b>	2.210,97	2.596,30	385,32	254,31	11,5	2.210,97	2.584,92	373,95	246,81	11,16%
<b>NE</b>	23,43	25,80	2,3	1,7	7,28	23,43	25,82	2,4	1,73	7,37%
<b>NPL</b>	15,32	15,45	0,13	0,039	0,26	15,32	15,45	0,13	0,04	0,25%
<b>P100</b>	25,36	25,91	0,55	0,37	1,48	25,36	26,03	0,67	0,46	1,80%
<b>NPQ</b>	1,94	1,81	-0,12	-0,12	-3,79	1,94	1,77	-0,17	-0,10	-5,15%
<b>NED</b>	0,79	0,80	0,01	0,01	0,19	0,79	0,79	0,01	0,00	0,15%
<b>NEP</b>	1,17	1,16	-0,01	-0,01	-0,26	1,17	1,14	-0,03	-0,01	-0,64%
Característica	CVg/CVe					$h^2_{x_f}$				
<b>PROD</b>	6.145,40	7.202,17	1.056,76	708,03	11,52%	6.145,40	7.202,17	1.56,76	708,03	11,52%
<b>PE</b>	2.210,97	2.578,94	367,98	242,86	10,98%	2.210,97	2.578,94	367,98	242,86	10,98%
<b>NE</b>	23,43	25,79	2,36	1,70	7,27%	23,43	25,79	2,36	1,70	7,27%
<b>NPL</b>	15,32	15,51	0,18	0,06	0,36%	15,32	15,51	0,18	0,06	0,36%
<b>P100</b>	25,36	26,23	0,87	0,59	2,32%	25,36	26,23	0,87	0,59	2,32%
<b>NPQ</b>	1,94	1,77	-0,17	-0,10	-5,27%	1,94	1,77	-0,17	-0,10	-5,27%
<b>NED</b>	0,79	0,80	0,01	0,00	0,19%	0,79	0,80	0,01	0,00	0,19%
<b>NEP</b>	1,17	1,14	-0,03	-0,01	-0,60%	1,17	1,14	-0,03	-0,01	-0,60%

PROD = produtividade (Kg ha<sup>-1</sup>); PE = peso de espigas; NE = número de espigas; NPL = *stand* final; P100 = peso de 100 grãos; NPQ = número de plantas quebradas; NED = número de espigas doentes; NEP = número de espigas atacadas por praga.

Para todas as características, o ganho foi o mesmo quando utilizado como peso a  $h^2$  e o CVg/Cve. A característica PE apresentou ganho de 11,5% e 11,16% quando utilizados os pesos PT e CVg. Berilli et al. (2013) obtiveram ganho percentual para a característica NE de 7,45%, utilizando peso atribuído por tentativa, próximo ao encontrado no presente trabalho que foi de 7,27%.

Para as características NPQ e NEP para todos os pesos utilizados, houve ganhos preditos promissores por expressarem ganhos negativos, indicando a perspectiva de seleção de genótipos menos propensos ao quebramento e aos danos causados por pragas. Ganhos genéticos negativos para essas características são de suma importância ao programa, principalmente para a característica NPQ, devido às regiões Norte e o Noroeste Fluminense apresentarem elevada incidência de ventos. Para a característica NED houve um ganho variando de 0,15 a 0,19%. Santos et al. (2007) ao predizerem os ganhos genéticos na população de milho-pipoca via índice de Pesek e Baker (1969), utilizando como peso econômico o desvio padrão genético (DPg), observaram resultados desfavoráveis de ganhos para característica espigas doentes, verificando que a estimativa percentual positiva dos ganhos por seleção favorecerão a suscetibilidade a pragas e doenças.

Freitas Júnior et al. (2009), Rangel et al. (2011), Ribeiro et al. (2012) e Freitas et al. (2013), trabalhando em diferentes ciclos de seleção recorrente de milho pipoca na UENF, verificaram que o índice de Mulamba e Mock proporcionou as magnitudes mais elevadas de ganhos preditos para a maioria das características, incluindo-se a capacidade de expansão e produção na utilização de pesos arbitrários atribuídos por tentativas.

Os valores dos ganhos genéticos preditos de cada característica obtidos pela seleção direta encontram-se na tabela 4. Como pode ser observado, haveria um ganho maior para todas as características quando considerado a seleção direta.

Fazendo uma comparação entre o índice de Mulamba & Mock e a seleção direta, pode-se observar que o ganho predito para a produtividade com a seleção direta é de, em média, 18,64%, superior ao observado no índice de Mulamba e Mock (12,11%). Gabriel (2009) também observou que com a seleção direta foi possível obter maiores ganhos para produtividade (14%), enquanto que o ganho obtido via índice de Mulamba e Mock foi de 12,9%.

No entanto, a seleção direta prioriza apenas uma característica e pode fazer com que juntamente com esta característica, considerada a principal, também haja ganho em características consideradas indesejáveis, tais quais número de plantas quebradas, acamadas, espigas doentes entre outras.

**Tabela 4.** Estimativas dos ganhos percentuais pela seleção direta para oito características avaliadas no décimo quinto ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos da UENF.

<b>Característica</b>	<b>Xo</b>	<b>Xs</b>	<b>DS</b>	<b>GS</b>	<b>GS%</b>
<b>PROD</b>	6.145,40	7.281,08	1.145,68	767,6	18,64
<b>PE</b>	2.210,97	2.609,83	398,87	271,23	18,04
<b>NE</b>	23,43	27,14	3,72	2,71	15,88
<b>NPL</b>	15,32	16,27	1,049	0,31	6,85
<b>P100</b>	25,36	27,75	2,39	1,63	9,42
<b>NPQ</b>	1,93	1,41	-0,53	-0,31	-27,13
<b>NED</b>	0,79	0,69	-0,1	-0,01	-12,8
<b>NEP</b>	1,17	0,90	-0,26	-0,06	-22,6

PROD = produtividade ( $\text{Kg ha}^{-1}$ ); PE = peso de espigas; NE = número de espigas; NPL = *stand* final; P100 = peso de 100 grãos; NPQ = número de plantas quebradas; NED = número de espigas doentes; NEP = número de espigas atacadas por praga.

Na tabela 5, encontram-se o ranqueamento das médias das famílias superiores selecionadas pelo índice de Mulamba e Mock. Tais famílias selecionadas serão utilizadas no próximo ciclo de seleção dando continuidade ao programa de seleção recorrente recíproca com o intuito de obter híbridos adaptados as regiões Norte/Noroeste Fluminense.

**Tabela 5.** Ranqueamento das médias das 40 famílias superiores avaliadas em ensaio de competição em Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ.

<b>Indivíduo</b>	<b>Família</b>	<b>Média (Kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Indivíduo</b>	<b>Família</b>	<b>Média (Kg ha<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	50	8.202,29	<b>21</b>	66	7.091,53
<b>2</b>	131	7.861,22	<b>22</b>	168	7.086,01
<b>3</b>	33	8.194,15	<b>23</b>	89	7.182,46
<b>4</b>	129	8.183,3	<b>24</b>	12	7.351,54
<b>5</b>	43	7.531,48	<b>25</b>	109	7.122,32
<b>6</b>	38	7.763,79	<b>26</b>	3	7.022,91
<b>7</b>	164	7.265,6	<b>27</b>	39	6.776,06
<b>8</b>	21	7.881,87	<b>28</b>	44	7.126,34
<b>9</b>	157	7.345,14	<b>29</b>	80	7.051,76
<b>10</b>	99	7.848,5	<b>30</b>	63	7.095,9
<b>11</b>	73	7.605,93	<b>31</b>	162	7.041,32
<b>12</b>	118	7.553,33	<b>32</b>	78	7.053,42
<b>13</b>	46	7.377,42	<b>33</b>	85	7.093,17
<b>14</b>	153	7.138,01	<b>34</b>	37	7.251,99
<b>15</b>	24	7.289,83	<b>35</b>	82	7.056,81
<b>16</b>	26	7.369,89	<b>36</b>	91	6.767,78
<b>17</b>	25	7.159,16	<b>37</b>	17	6.801,71
<b>18</b>	53	7.214,78	<b>38</b>	144	6.929,51
<b>19</b>	133	7.252,19	<b>39</b>	135	6.554,94
<b>20</b>	7	6.973,67	<b>40</b>	54	6.718,59
<b>Média: 7.256,56 Kg ha<sup>-1</sup></b>					

### 3.1.5 CONCLUSÕES

- 1 - Os parâmetros genéticos revelaram que há variabilidade a ser explorada nos sucessivos ciclos de seleção recorrente recíproca;
- 2 - A seleção recorrente recíproca tem se mostrado um método efetivo em proporcionar ganhos genéticos e assegurar, assim, o avanço de gerações.
- 3 - O índice de Mulamba e Mock é eficiente em prever ganhos genéticos satisfatórios em produtividade e nas demais características, o que favorece a continuidade do programa de melhoramento de milho na UENF com essas populações.
- 4 - O índice aplicado foi o de Mulamba e Mock, o qual se adequou aos objetivos do programa, obtendo um ganho predito para a característica produtividade de 12,11% e um incremento de 744,4 Kg ha ciclo<sup>-1</sup>.

## **3.2 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO DE *PRIMERS* SSR-EST'S ASSOCIADOS COM A PRODUTIVIDADE E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA**

### **3.2.1 INTRODUÇÃO**

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é uma das mais importantes do Brasil, sendo produzida em quase todo o território nacional (Engelsing et al., 2012) e alcançando produção média de 80 milhões de toneladas por ano (Conab, 2015). Entretanto, a produção de grãos por unidade de área ainda não traduz o potencial genético das cultivares disponíveis, levando a constantes buscas por alternativas que aumentem a produtividade (Cunha et al., 2010).

Aliado a este fato, as oscilações nas safras de milho, das principais regiões produtoras do Brasil, estão associadas a diversos tipos de estresses abióticos, como déficit hídrico (Bergamaschi et al., 2004) e sobretudo, solos deficientes em nitrogênio e fósforo, que afetam negativamente o desenvolvimento das plantas, levando a redução na produtividade (Souza et al., 2008).

O milho é uma das culturas mais exigentes em nitrogênio, sendo o fornecimento inadequado e os baixos teores no solo um dos fatores limitantes da produtividade (Civardi et al., 2011). O nitrogênio, juntamente com o fósforo, é fundamental para o desenvolvimento das culturas (Lea e Mifflin, 2011). Quando a disponibilidade de fósforo no solo é baixa, ocorre redução do metabolismo, da massa e da superfície de vários órgãos das plantas, afetando sua produtividade.

Isso se deve ao fato do fósforo estar envolvido na produção e transporte de energia, fotossíntese, transformação de carboidratos e na composição de ácidos nucleicos, carboidratos fosfatados, fosfolipídios e coenzimas. O nitrogênio é constituinte de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, fitocromos, ATP (Adenosina Tri-fosfato), clorofila e inúmeras enzimas (Jakelaitis et al., 2005), influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente.

Já o estresse hídrico afeta diversos processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos nas plantas, e as respostas comumente dependem do genótipo, do estágio de desenvolvimento da planta, da duração e da severidade do estresse (Vidal et al., 2005). Em plantas sob essa condição, há aumento da resistência difusiva ao vapor de água mediante o fechamento dos estômatos, o que reduz a transpiração e o suprimento de CO<sub>2</sub>, além de diminuir o crescimento celular e aumentar a fotorrespiração (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Nesse sentido, diversos trabalhos vêm sendo relatados na literatura, buscando obter genótipos que sejam mais responsivos à utilização da água (Silva et al. 2015) e uso eficiente do nitrogênio e do fósforo (Simons et al., 2014; Parentoni e Souza Junior, 2008), além da identificação de genes e de QTL (Sousa et al., 2012; Zhu et al., 2005) que estejam diretamente relacionados a essas características. Entretanto não há relatos para a cultura do milho de trabalhos desenvolvidos a partir de marcadores funcionais para tais características.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver, otimizar e validar iniciadores SSR-EST relacionados a três características que afetam diretamente a produtividade do milho, sendo essas, tolerância ao estresse hídrico e uso eficiente do nitrogênio e do fósforo. Tais iniciadores foram utilizados em associação ao programa de SRRFIC da UENF, na etapa de genotipagem molecular dos parentais das famílias selecionadas. O intuito é que, com a análise desses locos, possam identificar-se os indivíduos mais divergentes e mais distantes geneticamente do ponto de vista funcional associados à produtividade do milho. A expectativa é de que tal distância genética possa estar mais diretamente relacionada à heterose em futuros cruzamentos interpulacionais ou, ainda, entre linhagens a serem derivadas.

## **3.2.2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.2.2.1 Diversidade genética**

A divergência genética pode ser conceituada como quaisquer diferenças genéticas entre espécies ou indivíduos dentro da espécie (Falconer e Mackay, 1996). A diversidade genética pode ser estudada de forma quantitativa ou preditiva. Entre os métodos quantitativos, citam-se as análises dialélicas em que é necessária a avaliação dos genitores e de suas combinações híbridas. E quanto aos métodos preditivos da diversidade, relatam-se aqueles que se baseiam nas diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares, quantificando os genitores por medidas de dissimilaridade que expressam o grau de divergência genética entre os mesmos (Cruz et al., 2012).

Entretanto, o uso de marcadores moleculares no melhoramento genético tem tido destaque como uma ferramenta importante, não só visando ao mapeamento de genes, aos diagnósticos de doenças e aos estudos taxonômicos e evolutivos, mas também em análises de diversidade genética (Wünsch e Hormaza, 2007). Em estudos sobre o milho, o emprego de marcadores moleculares tem facilitado a avaliação da diversidade genética entre linhagens e na determinação de grupos heteróticos entre elas (Barbosa et al., 2003).

O emprego de linhagens em programas de melhoramento de milho está associado à busca do vigor de híbrido ou heterose, fenômeno que proporciona maior produtividade em híbridos provenientes do cruzamento de parentais que exibem alta divergência entre si (Paterniani et al., 2008). As populações, apesar de serem menos produtivas que as cultivares modernas, apresentam uma complexa estrutura genética e, por isso, são importantes fontes de variabilidade na busca por genes responsáveis pela tolerância ou resistência a determinados fatores bióticos e abióticos (Coimbra et al., 2010).

### **3.2.2.2 Marcadores moleculares no programa de seleção recorrente recíproca de milho comum da UENF**

A avaliação por meio de marcadores moleculares apresenta algumas vantagens sobre outros métodos, porque, além de identificar o elevado



polimorfismo, eles não apresentam interações com o meio ambiente podendo ser avaliado em qualquer fase do desenvolvimento da planta (Williams et al., 1990).

Os marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas são utilizados em estudos de diversidade genética, caracterização de acessos de germoplasma e variedades, seleção de genitores, recuperação mais rápida do genoma do genitor recorrente em programas de retrocruzamentos, seleção assistida, análise de identidade genética ou *fingerprinting*, desenvolvimento de mapas genéticos, seleção recorrente e seleção genômica ampla (Faleiro et al., 2011).

Em vista disso, Tardin et al. (2007), conduzindo o oitavo ciclo de seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos de milho da UENF, fizeram uma modificação no método, incorporando, antes da etapa de recombinação, uma etapa de avaliação da diversidade genética dos genitores selecionados como superiores agronomicamente, utilizando para tanto, marcadores RAPD, objetivando-se preservar a variabilidade genética e aumentar a distância genética entre as populações. Tal autor observou que a técnica molecular mostrou-se útil para identificar contaminantes e auxiliar na escolha dos genótipos a serem recombinados de forma a maximizar a heterose entre as populações.

No décimo ciclo de seleção recorrente recíproca, Gabriel, (2006) submeteu as famílias superiores selecionadas pelo índice de seleção à genotipagem via marcadores AFLP, para que se pudesse avaliar a distância genética dos genótipos a serem recombinados. A análise molecular das populações CIMMYT e Piranão indicou que, mesmo após 10 ciclos de seleção recorrente, ambas as populações possuem variabilidade genética intra e interpopulacional expressiva para a continuidade do programa.

Berilli et al., (2011), aplicando marcadores ISSRs no 11º ciclo de seleção, concluíram que a aplicação de marcadores moleculares em programas de seleção recorrente recíproca permite a otimização do monitoramento da variabilidade genética dentro e entre populações, favorecendo a recombinação entre progênies mais distantes, além de garantir aumento da longevidade do programa de seleção recorrente recíproca.

Cunha et al., (2012), na condução do 12º ciclo de seleção recorrente recíproca da UENF, utilizaram 23 marcadores moleculares ISSR's em uma tentativa de maximizar a variabilidade genética entre e dentro das populações

com base na seleção de progênies  $S_1$  e verificaram que a aplicação dos marcadores moleculares na fase de seleção das progênies superiores levou a um aumento da distância genética entre as populações, que é um fator muito importante para maximizar a utilização de heterose e proporcionar uma maior longevidade do programa de seleção recorrente recíproca.

Na condução do 13° e 14° ciclos de seleção, Galvão et al. (2015) e Vettorazzi, (2014) utilizaram 20 marcadores moleculares funcionais (SSR-EST's) na genotipagem das famílias superiores dos respectivos ciclos mencionados do programa de seleção recorrente recíproca de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.), e verificaram que as populações em estudo têm expressiva diversidade genética, que corresponde ao genoma funcional, indicando que esta estratégia pode contribuir para o ganho genético em futuros ciclos de seleção.

### 3.2.2.3 Marcadores SSR-EST's

Devido à extensa disponibilização pública de clones de cDNA e de sequências EST's para as mais diversas espécies, grande ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de marcadores moleculares obtidos a partir de regiões transcritas dos genomas (Ramu et al., 2013). Assim, marcadores microssatélites também vêm sendo desenvolvidos a partir dos inúmeros projetos de sequenciamento baseados em EST's (Pashley et al., 2006). Tais sequências possuem cerca de 400 pares de bases, resultantes do sequenciamento único de uma das extremidades de um cDNA, o qual foi obtido de um mRNA (Poncet et al., 2006).

A identificação de microssatélites em sequências EST's (denominados SSR-EST's) é realizada através da mineração de dados, utilizando-se técnicas de bioinformática (Sharma et al., 2007). Esse processo é rápido, acessível, economicamente viável e apresenta imenso potencial para automatização, aumentando a eficiência na geração desses marcadores (Varshney et al., 2005a).

Estes marcadores foram desenvolvidos com êxito para várias espécies vegetais, entre elas: milho (Sharapova et al., 2002), gramíneas forrageiras (Mian et al., 2005), cevada (Varshney et al., 2006), soja (Hisano et al., 2007), algodão (Han et al., 2006), arroz (La Rota et al., 2005), trigo (Fu et al., 2006), cana de

açúcar (Cordeiro et al., 2001), sorgo (Srinivas et al., 2009), milho (Senthilvel et al., 2008), girassol (Pashley et al., 2006), entre outras.

Os SSR-EST's demonstram ser mais úteis na obtenção dos resultados, produzindo dados de melhor qualidade, isto é, bandas mais fortes ou com picos alélicos bem definidos e de mais fácil interpretação (Pashley et al., 2006). Os microssatélites baseados em EST's são poderosas ferramentas para avaliação de diversidade genética, estudos evolutivos, mapeamento e análise de características quantitativas (Ramu et al., 2013; Sun et al., 2015).

De acordo com vários autores, a aplicação de SSR-EST's em estudos de avaliação de germoplasma acentua a resolução da análise, uma vez que o polimorfismo analisado advém de regiões transcritas, revelando, assim, a verdadeira diversidade genética (Zhang et al., 2014). Desse modo, esses marcadores apresentam implicações diretas em programas de melhoramento vegetal, onde os parentais necessitam ser selecionados com base na distância genética (Gupta e Rustgi, 2001).

Marcadores SSR-EST's, em virtude da influência de microssatélites na regulação gênica (Dutta, et al., 2011) e de sua associação física a regiões transcritas, apresentam potencial para o desenvolvimento de marcadores funcionais, ou seja, marcadores oriundos de sítios polimórficos que estão envolvidos diretamente na variação fenotípica de uma dada característica e que tem poder de diagnóstico (Varshney et al., 2005a).

Uma das restrições enfrentadas pelos SSR-EST's refere-se ao seu potencial polimórfico. Dados da literatura têm mostrado que esses marcadores tendem a apresentar um menor grau de polimorfismo, quando comparados à sua contraparte genômica, devido à maior conservação de sequências de DNA localizadas em regiões transcritas (Chabane et al., 2005). Entretanto, alguns estudos têm divulgado um significativo grau de polimorfismo obtido a partir de análises com esses marcadores. Fraser et al. (2004) observaram que 93,5% dos SSR-EST's foram polimórficos e segregaram em uma população de mapeamento derivada de um cruzamento entre dois genótipos diplóides de *Actinidia chinensis*. Outros trabalhos também demonstraram altos índices polimórficos oriundos desses marcadores (Chagné et al., 2004), havendo casos onde tais índices para microssatélites genômicos e SSR-EST's se equiparam (Poncet et al., 2006).

Entretanto, uma importante limitação ao uso desses marcadores está relacionada à disponibilidade de sequências EST's nos bancos de dados públicos, sendo que somente espécies de interesse científico ou que possuem importância econômica possuem um montante considerável de sequências disponível para estudos (Eujayl et al., 2004). Este fato ressalta a importância dos estudos de transferibilidade desses marcadores em espécies correlacionadas.

#### 3.2.2.4 Transferibilidade de marcadores SSR-EST's

A transferibilidade de marcadores SSR-EST's pode ser definida como a propriedade de determinados pares de *primers*, desenvolvidos para flanquear regiões microssatélites em sequências de uma dada espécie e também em outra, filogeneticamente relacionada (Kuleung et al., 2004). O intercâmbio dessa informação genética pode ser realizado devido à sintenia existente entre espécies aparentadas (Mudge et al., 2005).

Apesar de algumas exceções, decorrentes de rearranjos estruturais (Zhu et al., 2005), a sintenia é a principal característica dos genomas vegetais (Kumar, 1999). De acordo com alguns autores, a conservação do conteúdo e ordem dos genes, em diferentes espécies, é indicativo de que esses segmentos são vantajosos às plantas além de, cientificamente, possuir caráter prático, atuando como ponte de ligação por onde transita a informação genética entre organismos afins, diminuindo a distância entre espécies bem estudadas e espécies com disponibilidade de dados mais restrita (Zhu et al., 2005).

Como tais marcadores são derivados de regiões transcritas, espera-se que esses exibam maior mobilidade interespecífica quando comparados aos microssatélites genômicos (Gupta et al., 2010). Tal suposição vem sendo amplamente corroborada em estudos comparativos entre esses dois tipos de marcadores (Pashley et al., 2006). Por outro lado, são menos polimórficos que os genômicos, devido à sua natureza conservada (Varshney et al., 2005a).

Segundo Varshney et al. (2005a), a principal característica dos SSR-EST's está associada ao seu potencial de transferibilidade. Ge et al. (2011), verificando a transferibilidade de marcadores EST-SSR de berinjela para outras espécies pertencentes à família das *Solanaceae*, verificaram que dos 100 pares de *primers* selecionados, 31 (31%) *primers* poderiam amplificar produtos PCR

provenientes de, pelo menos, uma das três espécies com sucesso, 27 (27%) em tomate, 27 (27%) na batata e 24 (24%) em pimenta. Dos 27 *primers* que poderiam produzir produtos de amplificação em tomate, três *primers* (EES043, EES080 e EES081) mostraram-se polimórficos nos três acessos de tomateiro utilizados. Singh et al. (2013) observaram que entre 227 SSR-EST's desenvolvidos a partir de cana-de-açúcar, 80,6% amplificaram em sorgo, 79,3% em milho, 78,4% em arroz e 76,7% em milheto.

Gao et al. (2003) também provaram experimentalmente a possibilidade de transferência de marcadores SSR-EST's de monocotiledôneas (trigo) para dicotiledôneas (soja). Estes resultados indicaram que o SSR-EST's podem ser transferidos através de distâncias taxonômicas relativamente grandes, que abrangem não apenas as espécies dentro de um gênero e vários gêneros dentro de uma família, mas em alguns casos com famílias da mesma ordem taxonômica.

### 3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.3.1 Busca pelas sequências

Foram realizadas buscas por sequências EST's que tivessem associação com características potencialmente relacionadas à produtividade do milho, sendo elas: uso eficiente do nitrogênio e do fósforo e tolerância ao estresse hídrico. Todas as sequências encontram-se depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* - (NCBI, 2015).

Foram encontradas 20 sequências EST relacionadas ao uso eficiente do fósforo e 190 sequências EST para estresse hídrico, ambas oriundas do genoma do milho. Para uso eficiente do nitrogênio, 200 sequências EST's foram encontradas oriundas do genoma do sorgo. Para verificar qual o possível cromossomo do milho as sequências se encontravam, estas foram submetidas a um *Blast* a fim de selecionar sequências que estivessem distribuídas ao longo do genoma do milho para uma completa varredura do genoma das populações em estudo. Todas as sequências foram obtidas em arquivo no formato Fasta.

### 3.2.3.2 Desenho dos *primers*

A identificação das sequências EST's contendo os microssatélites, bem como o desenho dos iniciadores que flanqueiam essas regiões foi feita primeiramente com uso do aplicativo *SSRlocator* (Maia et al., 2008). Os parâmetros utilizados na identificação dos SSRs foram os seguintes: SSR compostos por motivos dinucleotídeos com, no mínimo, seis repetições por motivo; SSR compostos por motivos trinucleotídeos com, no mínimo quatro repetições por motivo, tetra e pentanucleotídeos com, no mínimo, três repetições; e SSR compostos por hexanucleotídeos com, no mínimo, duas repetições por motivo.

Para o desenho dos *primers* foram utilizados os seguintes critérios: produto final da amplificação no intervalo de 150 a 350 pb, sendo ótimo 250, tamanhos dos iniciadores entre 18 a 25 pb, sendo ótimo 20 pb; percentagem de GC no intervalo de 20 a 60%, sendo ótimo 50% e temperatura média entre 55 e 63°C, sendo ótima 60°C.

As sequências contendo os microssatélites identificadas pelo *SSRlocator* foram, então, submetidas ao programa *Primer 3 plus* (Untergasser et al., 2007), seguindo os critérios adotados para o programa *SSRlocator* (Maia et al., 2008), produto final da amplificação no intervalo de 150 a 350 pb, sendo ótimo 250, tamanhos dos iniciadores entre 18 a 25 pb, sendo ótimo 20 pb; percentagem de GC no intervalo de 20 a 60%, sendo ótimo 50% e temperatura média entre 55 e 63°C, sendo ótima 60°C. O programa *Primer 3 plus* disponibiliza cinco opções de pares de *primers* para cada sequência. O aplicativo *NetPrimer* (*Premier Biosoft*, 2015) foi utilizado para avaliar a qualidade dos *primers* gerados pelo programa *Primer 3 plus*. Os mais adequados, livres de grampos, dímeros, dímeros cruzados, sequências palíndromas e repetições de nucleotídeos foram considerados termodinamicamente estáveis e selecionados. Um total de 87 pares de *primers*, com as sequências *Forward* e *Reverse*, foram desenhados e sintetizados. Após isso, os pares de *primers* foram ressuspensos em TE. Posteriormente, foi realizada uma diluição com água ultrapura para concentração de trabalho de 5µM.

### 3.2.3.3 Screening dos primers

De posse dos *primers*, foi iniciado o *screening*. Essa etapa foi realizada no Setor de Marcadores de DNA do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/UENF). Foram utilizados para as amplificações, DNA de quatro genótipos selecionados de cada população (CIMMYT e Piranão) correspondente ao 15º ciclo do programa de Seleção Recorrente Recíproca de famílias de Irmãos Completos (UENF). A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *Kit DNeasy Plant Mini* da *Qiagen*, seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi submetido à quantificação no aparelho espectrofotômetro *NanoDrop® 2000c* (*Thermo Scientific®*) para mensurar a concentração de DNA genômico, com leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 260nm. Cada *primer* foi testado com quatro diferentes mix, nos quais foram utilizados diferentes concentrações de DNA,  $MgCl_2$  e *primers*, conforme tabela 1, sendo o mix 2 o mais adequado. Todas as reações testes foram completadas com água ultra pura até o volume de 13 µl. As amplificações foram feitas em termociclador *Applied Biosystems/Veriti 96 well*. O programa utilizado para a reação de PCR consistiu em um ciclo por 4 minutos a 94°C para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 35 ciclos com 1 minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a Y°C para o anelamento dos *primers* (sendo realizado um gradiente com variação de temperatura para baixo e para cima a partir da  $T_m$ ) e três minutos a 72°C para a extensão dos *primers* e, posteriormente, um ciclo de sete minutos a 72°C para a extensão final. Os *primers* que não apresentaram amplificação satisfatória foram submetidos a um protocolo de *touchdown*, onde a temperatura de anelamento inicial foi de 62°C e a cada um dos 35 ciclos de *touchdown* ocorria à redução de 0,5°, terminando em 44,5°C.

Para todas as reações foram retirados 7µl da reação, para serem revelados em gel de agarose a 4% imerso em tampão TAE [Tris-Acetato 90 mM (pH 8,0) + EDTA 10 mM], corado com *Gel Red™*, à amperagem de 350 a 400 mA e visualizado pelo sistema de fotodocumentação *MiniBis Pro* (*Bio-Imaging Systems*) para análise do padrão de bandas amplificadas. Todos os *primers* que amplificaram foram submetidos à análise em eletroforese capilar no aparelho *Fragment Analyser (AATI)*. Utilizou-se também o marcador DNA *Ladder*, com uma

variação de 35 a 500 pb durante as corridas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. Após o *screening*, foram contabilizados os *primers* considerados polimórficos.

**Tabela 1.** Concentrações dos componentes dos *mix* utilizados na validação dos *primers*.

Reagente	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4
Tampão (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1X	1X	1X	1X
dNTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,92 mM	1,92 mM	1,92 mM	1,54 mM
Primer	0,19 µM	0,19 µM	0,38 µM	0,19 µM
DNA	5ng	10ng	10ng	10ng
Taq DNA polimerase	0,6 U	0,6 U	0,6 U	0,6 U

### 3.2.3.4 Preparo das amostras para avaliação molecular

Nesta etapa da análise da diversidade genética via marcadores de DNA, parte das sementes S<sub>1</sub> armazenadas na primeira etapa (item 3.1.3.2), correspondente às 40 famílias superiores selecionadas pelo índice de Mulamba e Mock (Tabela 5 do item 3.1.4.3), foram plantadas na Unidade de Apoio à Pesquisa – UENF, em setembro de 2015 em vasos de 2 L com substrato, sendo a coleta do material realizada 30 dias após o semeio.

A parte aérea de 10 plântulas, correspondente a cada genótipo S<sub>1</sub> foi coletada em *Bulk*, realizando essa etapa para cada um dos 40 genótipos superiores de cada população. Este material foi envolvido por papel alumínio, devidamente identificado com o número do genótipo coletado, acondicionado no isopor contendo nitrogênio líquido e levados para o ultrafreezer (-86 °C).

### 3.2.3.5 Extração e quantificação do DNA

A extração, quantificação do DNA genômico, bem como a genotipagem dos indivíduos foram feitas no Setor de Marcadores de DNA/LMGV da UENF. O DNA foi extraído do material vegetal utilizando o *Kit DNeasy Plant Mini* da *Qiagen*,



seguinto a metodologia descrita pelo seu fabricante. Após a extração, o DNA foi submetido à quantificação no aparelho espectrofotômetro *NanoDrop® 2000c* (*Thermo Scientific®*) para mensurar a concentração de DNA genômico, com leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 260nm. Posteriormente, as 80 amostras, 40 da população CIMMYT e 40 da população Piranão, foram padronizadas na concentração de 5ng/μl e mantidas no *freezer* a -20 °C.

### 3.2.3.6 Reação de cadeia da polimerase (PCR)

Após determinar a concentração de trabalho, bem como a temperatura de anelamento de cada *primer*, as reações foram montadas seguindo o mix 2 apresentado na tabela 1. O programa utilizado para a reação de PCR consistiu em um ciclo por quatro minutos a 94°C para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 35 ciclos com um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a Y°C para o anelamento dos *primers* e três minutos a 72°C para a extensão dos *primers* e, posteriormente, um ciclo de sete minutos a 72°C para a extensão final. As amplificações foram feitas em um termociclador *Applied Biosystems/Veriti 96 well*. Onde: Y= Temperatura de anelamento específica para cada *primer* (Anexo, Tabela 7).

### 3.2.3.7 Eletroforese Capilar

As amplificações obtidas a partir de eletroforese via sistema capilar utilizaram o *Fragment Analyser (Advanced Analytical)*.

Foram feitas as diluições do produto da amplificação, utilizando 2 μl de material amplificado para 22 μl de tampão. As amostras foram distribuídas em placas específicas contendo 96 poços para eletroforese capilar no aparelho *Fragment Analyser (AATI)*, que permite detectar com segurança uma diferença de até cinco pares de bases entre os alelos analisados. Utilizou-se também o marcador DNA *Ladder* com uma variação de 35 a 500 pb durante as corridas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. O material contido nas placas foi transportado para os capilares onde foram submetidos à corrida de 110 minutos em uma corrente de 8,0 Kw. Após esta etapa, as imagens resultantes da eletroforese capilar foram analisadas.

### 3.2.3.8 Análise dos dados Moleculares

Os dados obtidos pela amplificação dos *primers* SSR foram convertidos em código numérico para cada alelo por *loco*, descrito da seguinte maneira: um *loco* apresentando três alelos foi representado por 11, 22 e 33 para formas homozigotas (A1A1, A2A2 e A3A3) e 12, 13 e 23 para formas heterozigotas (A1A2, A1A3 e A2A3) (Ramos et al., 2011). O aplicativo Genes (Cruz, 2013) foi utilizado para obtenção da matriz de dissimilaridade genética através do Índice Ponderado. Posteriormente, com o auxílio do programa Genalex 6.3 (Peakall e Smouse, 2009) foi realizada uma dispersão gráfica dos genótipos com base no método da Análise das Coordenadas Principais (PCA), a análise da frequência alélica e a análise de variância molecular (AMOVA). O programa *Power Marker*, versão 3.25 (Liu e Muse, 2005) foi utilizado para a obtenção do dendrograma e para o conteúdo de informação polimórfica (PIC). O programa *Popgene*, versão 1.31 (Yeh et al., 1999), foi utilizado para estimar medidas de diversidade: Índice de Shannon (I), heterozigose esperada (HE), heterozigose observada (HO), coeficiente de endogamia ( $f$ ), número de alelos ( $N_a$ ) e número efetivo de alelos ( $N_e$ ).

## 3.2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.4.1 Desenho dos *primers*

Um total de 87 *primers* SSR-EST's foi desenhado por meio de sequências expressas do genoma do milho e do sorgo disponíveis no *Genbank* do NCBI. Esses foram identificados com a denominação de 'UENF' seguido de um número, sendo ordenados de 1 a 87 (Tabela 7, anexo). Houve a preocupação com a completa cobertura do genoma das populações CIMMYT e Piranão, sendo assim, os 87 *locus* a serem analisados ficaram distribuídos entre os 10 cromossomos do milho. Dos 87 pares de *primers*, nove (10,3%) e 43 (49,4%) foram desenhados a partir de sequências de milho relacionadas com uso eficiente do fósforo e

estresse hídrico, respectivamente, e 35 (40,3%) a partir de sequências de sorgo relacionados com uso eficiente do nitrogênio (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição dos SSR-EST's por cromossomo e por características.

Cromossomo	Características			Total
	Uso eficiente do Fósforo	Uso eficiente do Nitrogênio	Tolerância ao Estresse Hídrico	
1	_____	UENF-1,UENF-2, UENF-3,UENF-4, UENF-5,UENF-6, UENF-11.	UENF-7, UENF-8, UENF-9, UENF-10.	11
2	_____	UENF-12,UENF-13 UENF-14,UENF-16.	UENF-15,UENF-17.	6
3	UENF-18,UENF-19, UENF-20, UENF-21, UENF-84.	UENF-22,UENF-23, UENF-24,UENF-25, UENF-26,UENF-27 UENF-28,UENF-29.	UENF-30, UENF-31, UENF-32,UENF-33, UENF-34.	18
4	_____	UENF-35,UENF-36, UENF-37,UENF-38,	UENF-39,UENF-40.	6
5	_____	UENF-41,UENF- 42,UENF-43, UENF-44.	UENF-45,UENF-46, UENF-47,UENF-48.	8
6	_____	UENF-49.	UENF-50,UENF-51, UENF-52,UENF-53, UENF-54,UENF-55.	7
7	UENF-56,UENF-57, UENF-58,UENF-66.	UENF-59,UENF-60, UENF-61,UENF-62.	UENF-63,UENF-64, UENF-65.	11
8	_____	_____	UENF-67,UENF-68, UENF-69,UENF-70, UENF-71.	5
9	_____	UENF-85, UENF-86, UENF-87.	UENF-72,UENF-73, UENF-74.	6
10	_____	_____	UENF-75,UENF-76, UENF-77,UENF-78, UENF-79,UENF-80, UENF-81,UENF-82, UENF-83.	9
<b>Total</b>	9	35	43	87

### 3.2.4.2 Validação dos *primers* SSR-EST's

Dos 87 *primers* SSR-EST's analisados, 67 (77%) apresentaram amplificação satisfatória. Dentre esses, 15 (22%) foram polimórficos, estando presentes em oito dos 10 cromossomos do milho, e 52 (88%) monomórficos para a população em estudo (Tabela 7, anexo). Esses dados vão de encontro com os relatos da literatura, os quais sugerem que a natureza conservada de SSR-EST's, apesar de promover a transferibilidade, reduz o caráter polimórfico (Scott et al.,

2000), sendo o nível de polimorfismo desses marcadores menor do que o de SSR oriundo de bibliotecas genômicas (Chabane et al., 2005). Dos 15 *primers* polimórficos, dois (13%) para uso eficiente do nitrogênio, três (20%) para uso eficiente do fósforo e 10 (67%) para tolerância ao estresse hídrico. Dentre esses, os SSRs mais abundantes foram repetições com hexanucleotídeo, representando 60,0%, seguido de 26,66%, 6,67%, 6,67%, para tetra, tri e dinucleotídeos, respectivamente. Os números de unidades de repetição de SSR variaram de dois a sete (Tabela 3).

Com a análise do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi possível quantificar o polimorfismo genético de cada *locus* na população em estudo. O PIC é uma medida da eficácia de um determinado marcador de DNA para detectar polimorfismo entre os genótipos com base em suas relações genéticas (Yamini et al., 2013), sendo considerado o índice de polimorfismo mais importante em análises moleculares (Zhang et al., 2014).

De acordo com Botstein et al. (1980), um *locus* pode ser classificado como altamente informativo quando o valor de PIC for maior do que 0,5, moderadamente informativo quando o valor varia de 0,5 a 0,25 e, não informativo quando o seu valor é inferior a 0,25. Nesse sentido, dos 15 *locus* microssatélites polimórficos, 10 (67%) podem ser considerados moderadamente informativos e cinco (33%) como não informativos. No presente trabalho, o valor máximo de PIC foi de 0,46 para o *locus* UENF-57 relacionado ao fósforo, ao passo que o menor valor (0,07) foi observado para o *locus* UENF-44 relacionado ao nitrogênio, com valor médio de 0,29 (Tabela 3). Em um estudo anterior envolvendo o uso de marcadores moleculares SSR-EST's neste mesmo programa de melhoramento, Galvão et al. (2015), avaliando 20 *locus* microssatélites, observaram que 14 (70%) poderiam ser considerados altamente informativos. Nesse mesmo trabalho foi observado que o valor máximo de PIC foi de 0,76, ao passo que, o menor valor foi 0,27, com valor médio de 0,55. Zang et al. (2013), avaliando a diversidade genética em soja por meio de marcadores SSR-EST's, observaram valores de PIC entre os 22 *locus* analisados de 0,14 para 0,63, com uma média de 0,38. Já Ge et al. (2011), analisando a diversidade genética em berinjela, observaram valores de PIC de 0,04 a 0,70 com média de 0,28.

### 3.2.4.3 Transferibilidade dos *primers* SSR-EST's para o milho

Dos 35 *primers* desenhados a partir das sequências de sorgo, verificou-se a transferibilidade de 21 (60%) para o genoma das populações de milho em estudo. Essa porcentagem de transferência entre as espécies mostra-se inferior ao encontrado por Varshney et al. (2005b) para trigo e centeio, que relataram que dos 165 marcadores utilizados em cevada, 78,2% apresentaram amplificação em trigo, seguido por 75,2% em centeio, entretanto, superior ao observado em arroz, que foi de apenas 42,4%. Já Tang et al. (2006) observaram que dos 243 marcadores SSR-EST's desenhados a partir do trigo, 154 (63,4%) amplificaram em cevada, trigo e milho, mostrando uma alta transferibilidade marcadores EST-SSR de trigo para as outras três culturas de cereais. Segundo Varshney et al. (2005b), uma das principais características dos SSR-EST's é que eles possuem alto potencial de transferibilidade. Como tais marcadores são derivados de regiões transcritas, espera-se que esses exibam maior mobilidade interespecífica quando comparados aos microssatélites genômicos (Scott et al., 2000). Além disso, o grau de transferibilidade dos marcadores SSR-EST's pode determinar sua adequação no mapeamento comparativo do genoma e filogenia (Singh et al., 2013).

### 3.2.4.4 Análise dos marcadores SSR-EST's na seleção dos genótipos

Foi obtido um total de 37 alelos com número de alelo por *locus* variando de dois a cinco e média de 2,46 (Tabela 3). Estudos anteriores, envolvendo o uso de marcadores moleculares neste mesmo programa de melhoramento, consistiu em análises via marcadores dominantes do tipo RAPD (Tardin et al., 2007) e ISSR (Berilli et al., 2011; Cunha et al., 2012), os quais obtiveram valores médios de alelos polimórficos por *locus* de 5,43, 8,77 e 4,04, respectivamente. Tais marcadores são multilocus e hereditariamente dominante, com o número médio de alelos por *locus* correspondente ao polimorfismo de vários *locus* dispersos aleatoriamente no genoma. Neste mesmo programa, Galvão et al. (2015), utilizando marcadores SSR-EST's verificaram alelos variando de dois a oito por *locus* com média de 4,65.

Ainda neste mesmo programa Galvão et al. (2015), utilizando marcadores SSR-EST's, verificaram alelos variando de dois a oito por *locus* com média de 4,65. A menor riqueza alélica obtida no presente trabalho em relação ao trabalho desenvolvido por Galvão et al. (2015), deve-se ao fato dos marcadores desenvolvidos neste trabalho serem oriundos de regiões expressas do genoma do milho e sorgo, os quais estão relacionados com características que afetam diretamente a produtividade, como tolerância ao estresse hídrico, uso eficiente do nitrogênio e fósforo. Já Galvão et al. (2015) também fez uso de marcadores oriundos de regiões expressas, entretanto não eram conhecidas as possíveis funções as quais tais marcadores estavam relacionados.

**Tabela 3.** Descrição dos *primers* polimórficos validados para as populações CIMMYT e Piranão.

<i>Primers</i>	Função putativa	C	Sequência 5' – 3'	Tm (C°)	Ta (°C)	Motivo	Unidade de repetição	T.O.	PIC	Na
<b>UENF-6</b>	Nitrogênio	1	<u>AAGAAGGTGGCAGAGCAGAG</u> TGCAAATGTAAACGGGTGAA	53	50	(ATTGAA) <sub>2</sub>	Perfeita	297 – 319	0,37	3
<b>UENF-15</b>	Estresse hídrico	2	<u>ATCTTCAAGGCCGACTACCA</u> GGAGGACATGGAGGAGATGA	56	57	(GCG) <sub>7</sub>	Perfeita	298 – 304	0,37	2
<b>UENF-19</b>	Fósforo	3	<u>CAGGGACCAACAGGAACAAC</u> TTCCAGTCTTGAGCTGCTTG	55	59	(CGCCAC) <sub>3</sub>	Perfeita	220 – 240	0,43	2
<b>UENF-32</b>	Estresse hídrico	3	<u>CACCCAATCAAACATGCAAA</u> GACTTCCTCCCCGAAAACCTG	52	52	(CGGA) <sub>3</sub>	Perfeita	154 – 159	0,29	2
<b>UENF-33</b>	Estresse hídrico	3	<u>GACTTCCTCCCCGAAAACCTG</u> AAGGGACACCCAATCAAACA	55	58	(TCCG) <sub>3</sub>	Perfeita	160 – 164	0,35	2
<b>UENF-34</b>	Estresse hídrico	3	<u>TCGCCTTATGGTATTGAGTTGA</u> ATAGGAAGCACGACCACCAC	54	54	(ACCGAA) <sub>2</sub>	Perfeita	194 – 213	0,40	3
<b>UENF-40</b>	Estresse hídrico	4	<u>ACGGATTCTTGAGACGCCTA</u> ACGAGGAGAACAAGGACGAG	56	53	(CGTCCT) <sub>2</sub> - (GAAGAT) <sub>2</sub>	Simples composta	153 – 167	0,16	3
<b>UENF-44</b>	Nitrogênio	5	<u>CTCTGGCATCCACCTGTACC</u> GCTCTCGAGGATGAACTGCT	57	TD-62	(ATGGCA) <sub>2</sub>	Perfeita	220 – 232	0,07	2
<b>UENF-47</b>	Estresse hídrico	5	<u>CTTTTGGATGGGCATGTTTT</u> CACGGTGCACGCTCTAAATA	52	50	(TTGTAA) <sub>2</sub>	Perfeita	269 – 281	0,33	2
<b>UENF-57</b>	Fósforo	7	<u>CCCCTTTTGCCATTTATTT</u> GTTGAAGAAGCCCCACAGAG	51,5	54,5	(AGATGG) <sub>2</sub>	Perfeita	229 – 238	0,46	3

**Tabela 3, cont.**

<i>Primers</i>	Função putativa	C	Sequência 5' – 3'	T <sub>m</sub> (C°)	T <sub>a</sub> (°C)	Motivo	Unidade de repetição	T.O.	PIC	Na
<b>UENF-66</b>	Fósforo	7	<u>CCCCCTTTTGCCATTTATTT</u> TTGAAGAAGCCCCACAGAGT	51,5	58,5	(CTGC) <sub>3</sub> - (GA) <sub>6</sub>	Simples composta	228 – 235	0,28	2
<b>UENF-74</b>	Estresse hídrico	9	<u>GCGTCATCAGCCTAGCAGTT</u> CAGGCCATGATGAGATCAGA	54	54	(CTGG) <sub>3</sub>	Perfeita	159 – 164	0,20	2
<b>UENF-76</b>	Estresse hídrico	10	<u>GGTTTGGATGCTGCTTCAAT</u> CAACAGCAACAACGGAACTC	54	53	(TGGCCG) <sub>2</sub>	Perfeita	198 – 207	0,12	2
<b>UENF-77</b>	Estresse hídrico	10	<u>ATTCACAGCTGGACCTGGAT</u> GCTCTACTCTCCCTGCTTGC	56	TD-62	(AG) <sub>7</sub>	Perfeita	150 – 161	0,36	2
<b>UENF-79</b>	Estresse hídrico	10	<u>GCAGGCACATGAATTTTCAGA</u> TGAACCTGAACCAGCAGCAG	54	51	(GTTCAA) <sub>2</sub>	Perfeita	194 – 226	0,20	5
<b>Média</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	2,46

C = cromossomo; T<sub>m</sub> = temperatura de *melting*; T<sub>a</sub> = temperatura de anelamento; TD-62 = *touchdown* iniciando a 62°C; T.O.= tamanho do alelo observado; PIC = conteúdo de informação polimórfica; Na = número de alelos.



Na busca pela quantificação da diversidade genética dentro de populações, muitas medidas descritivas vêm sendo utilizadas, possibilitando inferir sobre a estrutura da população, entre elas o número de alelos, índice de Shannon e heterozigidade observada. Ao analisar a frequência de alelos das populações em estudo individualmente, observou-se um número de alelos variando de dois a três para a população CIMMYT, enquanto que na população Piranão a variação foi de um a cinco, com médias de 2,33 e 2,1, respectivamente (Tabela 4).

A menor riqueza alélica obtida na população Piranão mostra que tal população apresenta menor variabilidade entre os indivíduos, já para a população CIMMYT fica evidente a presença de maior variabilidade entre os indivíduos.

**Tabela 4** - Parâmetros de diversidade genética das populações CIMMYT e Piranão com base nos 15 locus SSR-EST analisados.

<b>Parâmetros</b>	<b>CIMMYT</b>	<b>Piranão</b>	<b>Geral*</b>
<b>Na</b>	2,33 (2 – 3)	2,1 (1 – 5)	2,46
<b>Ne</b>	1,6 (1 – 2,3)	1,5 (1 – 2,3)	1,6
<b>He</b>	0,33 (0,075 – 0,65)	0,29 (0,00 – 0,57)	0,35
<b>Ho</b>	0,18 (0,00 – 0,45)	0,17 (0,00 – 0,61)	0,18
<b>I</b>	0,53 (0,16 – 1,05)	0,45 (0,00 – 1,09)	0,57
<b>f</b>	0,64 (0 - 1)	0,65 (0,35 - 1)	0,65

Na = número de alelos; Ne = número de alelos efetivos; He = heterozigidade esperada; Ho = heterozigidade observada; I = índice de Shannon; f = coeficiente de endogamia.

\* Valor obtido a partir dos 80 genótipos analisados via marcadores moleculares.

Galvão et al. (2015), observaram que no 13° ciclo de seleção recorrente recíproca nas populações CIMMYT e Piranão, número de alelos variando de um a seis na população CIMMYT, enquanto que na população Piranão a variação foi de dois a oito, com médias de 3,65 e 4,35, respectivamente.

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) nas populações variou de 0,075 a 0,65 com média de 0,33 para a população CIMMYT e 0,00 a 0,75 com média 0,29 para a população Piranão. A média, considerando as duas populações, foi de 0,35. Já, a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) nas populações variou de 0,00 a 0,45 com média de 0,18 para a população CIMMYT e 0,00 a 0,61 com média 0,17 para a população Piranão. A média, considerando as duas populações, foi de 0,18.

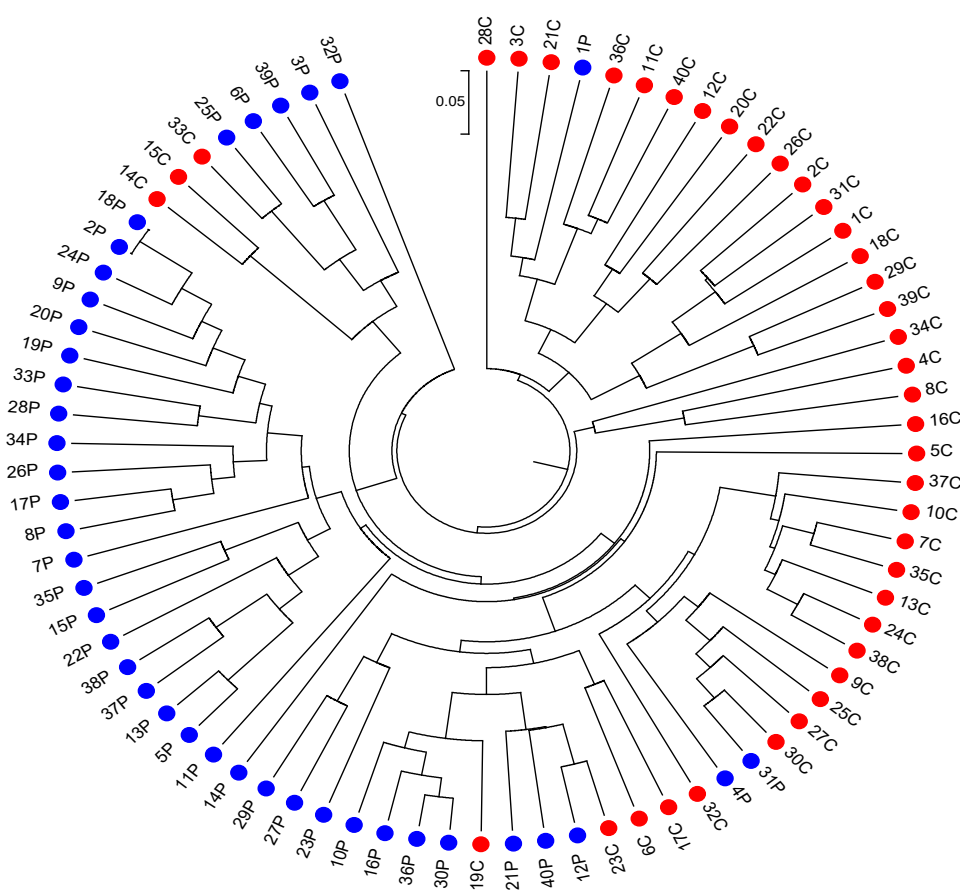
A diversidade genética também foi analisada neste estudo através do índice de Shannon ( $I$ ), no qual foram encontrados valores de 0,53 para população CIMMYT e 0,45 para a população Piranão (Tabela 2), demonstrando o que já havia sido observado através do número médio de alelos por locus, onde a população CIMMYT teve maior número. Segundo Amaral et al. (2013), o Índice de Shannon, também chamado de Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, é uma medida de diversidade amplamente utilizada em estudos de populações, a qual permite inferir sobre a riqueza ou diversidade genotípica dentro de populações. De acordo com este índice, quanto mais próximo da unidade maior será a diversidade. Galvão et al. (2015), analisando as populações CIMMYT e Piranão no 13º ciclo de seleção recorrente recíproca, encontraram valores para diversidade genética de 0,89 para população CIMMYT e 1,04 para a população Piranão. Mesmo que os valores observados de diversidade genética nesse trabalho tenham sido menores do que o apresentado por Galvão et al. (2015), percebeu-se que ambas as populações, após 15 ciclos de seleção recorrente recíproca, ainda possuem variabilidade genética suficiente para a continuidade deste programa de melhoramento, com possibilidade real de ganhos genéticos em futuros ciclos de seleção.

Entretanto, essa menor variabilidade pode estar relacionada ao uso de marcadores originados de regiões transcritas e associadas diretamente aos componentes de produtividade, levando a redução da variabilidade genética.

A análise do coeficiente de endogamia ( $f$ ) entre os indivíduos das diferentes populações mostrou valores variando entre 0,00 a 1,00 em CIMMYT e 0,35 a 1 em Piranão, com valores médios de 0,64 e 0,65, respectivamente. Como as populações em estudo são genótipos panmíticos, era esperado que o coeficiente de endogamia fosse próximo a zero. Entretanto, os marcadores utilizados no presente trabalho tendem a apresentar um menor grau de polimorfismo, quando comparados à sua contraparte genômica, devido à maior

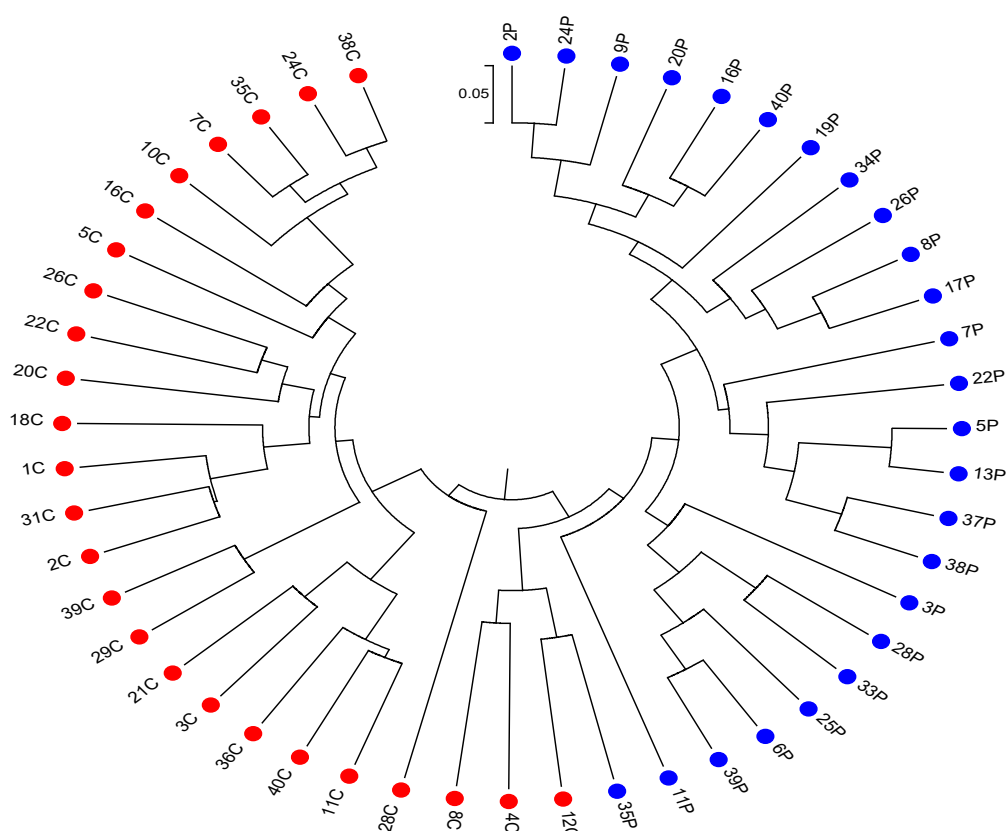
conservação de sequências de DNA localizadas em regiões transcritas, o que pode ter favorecido coeficientes de endogamia mais elevados.

A representação gráfica da distância genética entre os 40 genótipos superiores de cada população foi analisada pelo método de agrupamento UPGMA, com base na matriz de distância genética obtida (Figura 1). Através da análise do dendrograma é possível verificar uma distinção entre as populações. Entretanto, não foi possível separar os 40 genótipos de cada população em seu respectivo grupo. Esse fato ocorreu possivelmente pelo limitado número de marcadores polimórficos aplicados nas análises e pelo baixo polimorfismo desses marcadores. É possível observar genótipos de uma população presentes na outra e vice-versa sendo, nesse caso, considerados genótipos contaminantes. Tardin et al. (2007) e Berilli et al. (2011) utilizaram marcadores RAPD e ISSR, respectivamente, e encontraram vários “contaminantes” nos grupos formados, ou seja, haviam famílias Piranão agrupando com as famílias CIMMYT e vice-versa.



**Figura 1.** Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA das 80 famílias  $S_1$ . Em azul estão os 40 genótipos pertencentes à população Piranão e em vermelho os 40 genótipos da população CIMMYT.

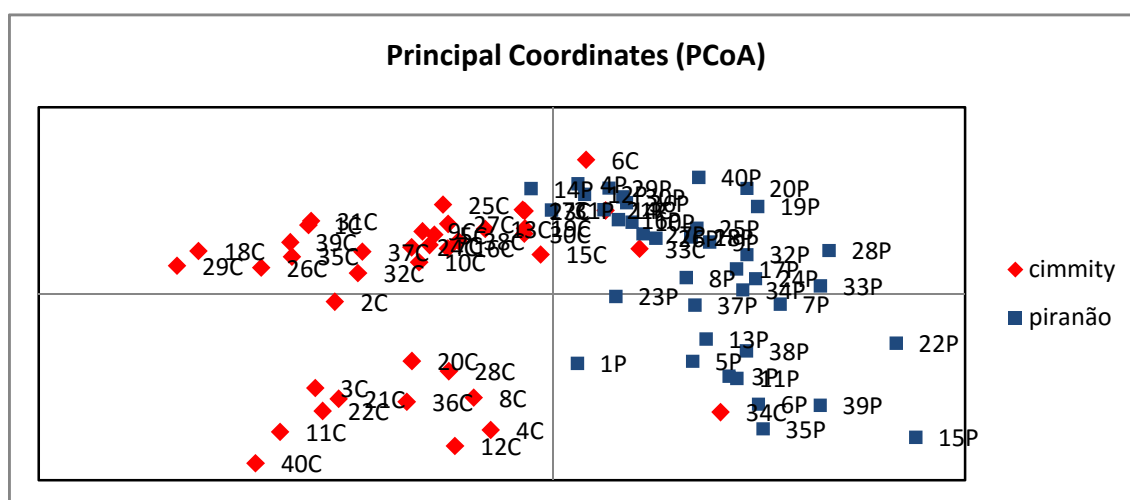
Porém, após a seleção dos 25 genótipos mais divergentes dentro de cada população foi possível observar a formação de dois grupos (Figura 2). Na figura, em azul estão os 25 genótipos pertencentes à população Piranão e em vermelho os 25 genótipos da população CIMMYT. Este resultado é bastante animador, pois, demonstra que ao longo dos ciclos de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos, principalmente aqueles monitorados pelos marcadores moleculares, as populações sob melhoramento estão mantendo-se em seus respectivos grupos heteróticos, permitindo a maximização da heterose em futuros ciclos.



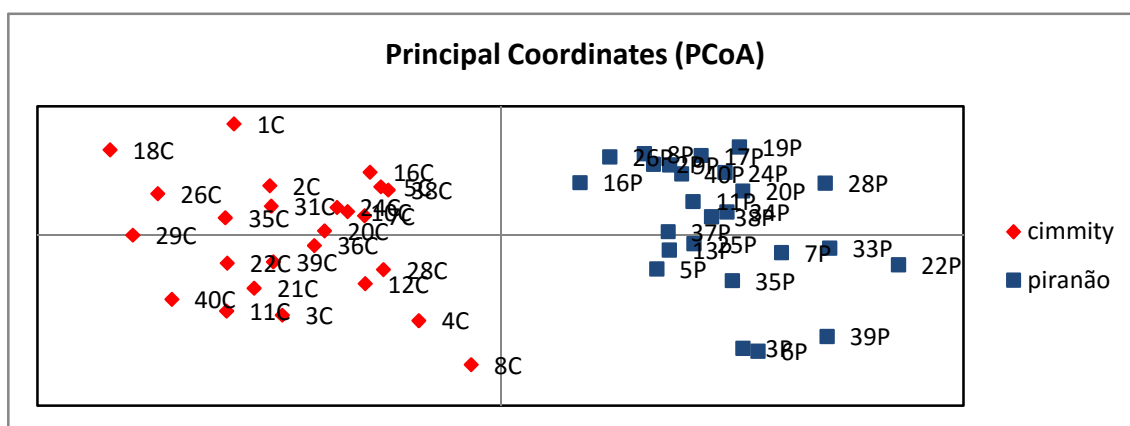
**Figura 2.** Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA das 50 famílias  $S_1$ . Em azul estão os 25 genótipos pertencentes à população Piranão e em vermelho os 25 genótipos da população CIMMYT.

A alocação dos genótipos de cada população em seus respectivos grupos pode ser claramente visualizada através da análise de coordenadas principais, com a dispersão gráfica da diversidade genética de cada população, antes e depois da análise via marcadores SSR-EST's (Figuras 3 e 4). Tal análise foi realizada com o intuito de auxiliar na seleção dos 25 genótipos mais divergentes dentro de cada população, de forma a ampliar a variabilidade intrapopulacional e a distância

genética interpopulacional. Para tanto, adotaram-se os seguintes critérios: eliminação dos genótipos dentro da outra população; eliminação dos genótipos próximos à outra população e; a eliminação de genótipos geneticamente próximos dentro da população, mantendo-se aqueles divergentes cujas médias de produção de grãos foram superiores identificadas pelo índice de seleção de Mulamba e Mock (Figura 3). Após a seleção dos genótipos foi possível observar um aumento na variação entre as populações e alocação das famílias de acordo com os seus respectivos grupos heteróticos, o que é esperado uma vez que um dos objetivos do programa é o aumento da variabilidade genética dentro e principalmente entre populações (Figura 4).



**Figura 3.** Dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais considerando as populações antes da seleção via marcadores moleculares EST-SSR.



**Figura 4.** Dispersão gráfica pelo método da Análise das Coordenadas Principais considerando as populações após a seleção via marcadores moleculares EST-SSR.

A quantificação dessa variabilidade foi obtida através da análise de variância molecular (AMOVA), onde se observou que do total da variância genética acessada pelos marcadores SSR-EST's, 78% foi detectada dentro e 22% entre as populações, antes da seleção com base nos marcadores moleculares e 67% foi detectada dentro e 33% entre as populações após a seleção com base nos marcadores moleculares (Tabela 5).

Os resultados apresentados por Berilli et al. (2011), ao analisar o décimo ciclo de seleção recorrente recíproca (SRR) mostram que 89,84% da variância genética estava dentro das populações CIMMYT e Piranão, e apenas 10,16% entre as populações antes da etapa de seleção, tendo esse último valor aumentado para 14,27%, após a seleção dos genótipos mais divergentes. Cunha et al. (2012), avaliando o ciclo 11 de SRR encontraram uma porcentagem de variância genética de 88,77% dentro e 11,23% entre as populações CIMMYT e Piranão antes da seleção, e de 82,33% dentro e 17,67% entre após a seleção. Galvão et al. (2015) observou que do total da variância genética, 73% foi detectada dentro e 27% entre as populações antes da seleção com base nos marcadores moleculares e 64% foi detectada dentro e 36% entre as populações após a seleção, com base nos marcadores moleculares.

Com os dados apresentados, pode-se inferir que a variabilidade genética entre as populações CIMMYT e Piranão aumentou em todos os ciclos de SRR quando comparada antes e depois da seleção via marcadores moleculares. Esse aumento na variabilidade genética entre as populações é de suma importância para o programa de seleção recorrente recíproca, uma vez que essa variabilidade entre as populações permitirá o aumento do vigor híbrido, permitindo obter híbridos interpopulacionais mais produtivos.

Mesmo que os valores percentuais de variabilidade genética entre e dentro das populações verificados por Galvão et al. (2015) tenham sido ligeiramente superiores ao encontrado nesse trabalho, pode-se observar que a variabilidade genética entre as populações aumentou após a seleção com base nos marcadores moleculares, permitindo a longevidade do programa de seleção recorrente recíproca de milho da UENF.

**Tabela 5.** Análise de variância molecular das populações CIMMYT e Piranão antes e após seleção com base na genotipagem via marcadores.

<b>Antes da seleção</b>					
Fontes de Variação	GL	QM	Componentes de Variância	Porcentagem	Probabilidade
Entre as populações	1	102,65	2,36	22	<0,001
Dentro das populações	78	8,21	8,21	78	<0,001
Total	79		10,57	100	
<b>Após a seleção</b>					
Fontes de Variação	GL	QM	Componentes de Variância	Porcentagem	Probabilidade
Entre as populações	1	105,1	3,89	33	<0,001
Dentro das populações	48	7,8	7,81	67	<0,001
Total	49		11,70	100	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio.

Um dos fatores que pode ter contribuído para essa distinção entre as duas populações após a seleção via marcadores é a existência de alelos privados ou exclusivos, ou seja, aqueles que estão presentes em apenas uma população. Entretanto, todos os alelos identificados, sete destes (19%) foram exclusivos, sendo os mesmos detectados em quatro dos 15 *locus* analisados (Tabela 6).

**Tabela 6.** Alelos privados e suas frequências nas populações CIMMYT e Piranão para os 15 *locus* EST-SSR analisados.

População	<i>Locus</i>	Alelo	Frequência
CIMMITY	UENF- 40	2	0,436
CIMMITY	UENF- 40	3	0,013
CIMMITY	UENF- 57	2	0,038
CIMMITY	UENF- 6	2	0,359
CIMMITY	UENF- 6	3	0,205
Piranão	UENF- 79	4	0,042
Piranão	UENF- 79	5	0,097

A população CIMMYT apresentou em três dos 15 *locus*, alelos privados, já a população Piranão apresentou apenas um *locus* com alelos privados. Observa-se que os *locus* UENF – 40, UENF – 57 e UENF – 6 foram identificados na população CIMMYT. Na população Piranão foi observado apenas a presença do *locus* UENF – 79 com alelos privados. Considerando que o desenvolvimento dos *primers* foi realizado com sequências expressas e que as mesmas estavam relacionadas a três características que estão diretamente relacionadas com a produtividade do milho, pôde-se observar que somente a população CIMMYT apresentou alelos privados para as três características, uso eficiente do Nitrogênio (UENF – 6), uso eficiente do fósforo (UENF – 57) e tolerância ao estresse hídrico (UENF – 40). A população Piranão apresentou alelos privados somente para tolerância ao estresse hídrico (UENF – 79).

A presença de um maior número de alelos privados na população CIMMYT em relação à população Piranão, pode ter favorecido o aumento variabilidade genética entre os indivíduos da população. Permitindo, assim, a seleção de indivíduos mais divergentes dentro da população para compor a etapa de recombinação, e, conseqüentemente, garantindo a continuidade do programa de seleção recorrente recíproca da UENF.

### 3.2.5 CONCLUSÕES

- 1 - Foi possível desenvolver *primers* gênicos de qualidade para o milho relacionados ao uso eficiente do nitrogênio, uso eficiente do fósforo e tolerância ao estresse hídrico, a partir de sequências depositadas no *GenBank/NCBI* e da utilização de ferramentas de bioinformática como *SSRlocator*, *Primer3plus* e *Net Primer*;
- 2 - Após a otimização e validação, dos 87 *primers* desenhados, 15 foram polimórficos para as populações em estudo, cobrindo todo o genoma;
- 3 - Os marcadores SSR-EST's foram efetivos em agrupar os genótipos em seus respectivos grupos heteróticos. Os indivíduos selecionados permitirão não



somente dar sequência aos ciclos seguintes, como também, incrementar a heterose nos procedimentos de hibridação;

4 - Manutenção da distância genética entre e dentro das populações após a seleção, conseqüentemente, garantindo a continuidade do programa de seleção recorrente recíproca da UENF.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S.P., Rangel, R.M.; Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Morais, R.C., Schuelter, A.R. (2010) Improvement of a popcorn population using selection indexes from a fourth cycle of recurrent selection program carried out in two different environments. *Genetics and Molecular Research*, 9:340-370.
- Amaral, L.P., Ferreira, R.A., Lisboa, G.S., Longhi, S.J., Watzlawick, L.F. (2013) Variabilidade espacial do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener em Floresta Ombrófila Mista. *Scientia Forestalis*, 41: 083-093.
- Amorim, E.P., Souza, J.C. (2005) Híbridos de milho inter e intrapopulacionais obtidos a partir de populações S0 de híbridos simples comerciais. *Bragantia*, 64:561-567.
- Anuário Brasileiro do milho (2015). Santa Cruz do Sul, RS: Editora Gazeta, 128p.
- Barbosa, A.M.M., Geraldi, I.O., Benchimol, L.L., Garcia, A.A.F., Souza, C.L., Souza, A.P. (2003) Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. *Euphytica*, 130:87-99.

- Bakoume, C., Galdima, M., Tengoua, F.F. (2010) Experimental modification of reciprocal recurrent selection in oil palm in Cameroon. *Euphytica* 171:235–240.
- Beadle, G.W. (1978) Teosinte and the origin of maize. In: Walden, D.B. (ed.) *Maize breeding and genetics*. 8. *New York, Jhon Wiley & Sons*, p. 113-141.
- Bergamaschi, H., Dalmago, G.A., Bergonci, J.I., Bianchi, C.A.M., Müller, A.G., Comiran, F., Heckler, B.M.M. (2004) Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:831-839.
- Berilli, A.P.C.G., Pereira, M.G., Gonçalves, L.S.A., da Cunha, K.S. (2011) Use of molecular markers in reciprocal recurrent selection of maize increases heterosis effects. *Genetics and Molecular Research*. 10: 2589-2596.
- Berilli, A.P.C.G., Pereira, M.G., Tindade, R.S., da Costa F.R. (2013) Response to the selection in the 11th cycle of reciprocal recurrent selection among full-sib families of maize. *Acta Scientiarum*, 35:435-441.
- Bertini, C.H.C.M., Almeida, W.S., Silva, A.P.M., Silva, J.W.L., Teófilo, E.M. (2010) Análise multivariada e índice de seleção na identificação de genótipos superiores de feijão-caupi. *Acta Scientiarum*, 32:613-619.
- Borém, A., Fritsche-Neto, R. (2013) *Biotecnologia Aplicada ao melhoramento de plantas*. 1 Ed. Viçosa, UFV:336p.
- Borém, A., Giúdice, M.P. del (2004) Cultivares Transgênicos. In: Galvão, J.C.C.; Miranda, G.V. (eds) *Tecnologias de Produção do Milho*. 20.ed. Viçosa:UFV, p.85-108.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32:314–331.

- Butron, A., Widstrom, N.W., Snook, M.E., Wiseman, B.R. (2000) Recurrent selection for corn earworm resistance in three corn synthetics. *Maydica*, 45:295-300.
- Butruille, D.V., Silva, H.D., Kaeppler, S.M., Coors, J.G. (2004) Response to selection and genetic drift in the three populations derived from golden glow maize population. *Crop Science* 44:1527–1534.
- Câmara, T.M.M., Bento, D.A., Alves, G.F., Santos, M.F., Moreira, A.J.U.V., Souza Júnior, C.L. (2007) Parâmetros genéticos de caracteres relacionados à tolerância à deficiência hídrica em milho tropical. *Bragantia*, 66: 595-603.
- Chabane, K., Ablett, G.A., Cordeiro, G.M., Valkoun, J., Henry, R.J. (2005) EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 903-909.
- Chagné, D., Chaumeil, P., Ramboer, A., Collada, C., Guevara, A., Cervera, M.T., Vendramin, G.G., Garcia, V., Frigerio, J.M., Echt, C., Richardson, T., Plomion, C. (2004) Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1204-1214.
- Civardi, E.A., Silveira Neto, A.N., Ragagnin, V.A., Godoy, E.R., Brod, E. (2011) Uréia de liberação lenta aplicada superficialmente e ureia comum incorporada ao solo no rendimento do milho. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41:52-59.
- Cochran, W.G. & Cox, G.M. (1957) Experimental designs. 2.ed. London, *John Wiley*, 611p.
- Coimbra, R.R., Miranda, G.C., Cruz, C.D., Melo, A.V., Eckert, F.R. (2010) Caracterização e divergência genética de populações de milho resgatadas do Sudeste de Minas Gerais. *Revista Ciência Agronômica*, 41:159-166.
- Comstock, R.E., Robinson, H.F. (1948) The components of genetic variance in

- populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics*. 4:254-266.
- Comstock, R.F., Robinson, H.F., Harvey, P.H. (1949) A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agronomy Journal*, 41:360-367.
- Conab (2015) - Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (2014/2015), v.2, n.11, 11° levantamento. Brasília, 101p.
- Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C.L., Manners, J.M., Henry, R.J. (2001) Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross-transferable to *Erianthus* and *sorghum*. *Plant Science*, 160:1115–1123.
- Costa, M.M., DI Mauro, A.O., Unêda-Trevisoli, S.H., Arriel, N.H.C., Bárbaro, I.M., Muniz, F.R.S. (2004) Ganho genético por diferentes critérios de seleção em populações segregantes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:1095-1102.
- Cunha, J.P.A.R., Silva, L.L., Boller, W., Rodrigues, J.F. (2010) Aplicação aérea e terrestre de fungicida para o controle de doenças do milho. *Revista Ciência Agronômica*, 41: 366-372.
- Cunha, K.S., Pereira, M.G., Gonçalves, L.S.A., Berilli, A.P.C.G. (2012) Full-sib reciprocal recurrent selection in the maize populations Cimmyt and Piranão. *Genetics and Molecular Research*, 11: 3398-3408.
- Cruz, C.D., Vencovsky, R., Silva, S.O., Tosello, G.A. (1993) Comparison of gains from selection among corn progenies, based on different criteria. *Brazilian Journal of Genetics and Molecular Biology*, 16:79-89.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2004) *Modelos biométricos aplicados as melhoramento genético*. 3. ed. Viçosa: UFV, 480 p.

- Cruz, C.D., Regazzi, A.J., Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 4 ed. Viçosa: UFV, 514 p.
- Cruz, C.D. GENES (2013) A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, 35:271-276.
- Cruz, J.C., Pereira Filho, I.A., Pimentel, M.A.G., Coelho, A.M., Karam, D., Cruz, I., Garcia, J.C., Moreira, J.A.A., Oliveira, M.F. de, Gontijo Neto, M.M., Albuquerque, P.E.P. de, Viana, P.A., Mendes, S.M., Costa, R.V. da, Alvarenga, R.C., Matrangolo, W.J.R. (2011) *Produção de milho na agricultura familiar*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 45 p.
- Daros, M., Amaral Junior, A.T., Pereira, M.G., Santos, F.S., Scapim, C.A., Freitas Junior, S.P., Daher, R.F., Avila, M.R. (2004) Correlações entre caracteres agrônomicos em dois ciclos de seleção recorrente em milho-pipoca. *Ciência Rural*, 34:1389-1394.
- Dutta, S., Kumawat, G., Singh, B.P., Gupta, D.K., Singh, S., Dogra, V., Gaikwad, K., Sharma, T.R., Raje, R.S., Bandhopadhyaya, T.K., Datta, S., Singh, M.N., Bashasab, F., Kulwal, P., Wanjari, K.B., Varshney, R.K., Cook, D.R., Singh, N.K. (2011) Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *BMC Plant Biology*. 11:1-13.
- Engelsing, M.J., Coimbra, J.L.M., Vale, N.M., Barili, L.D., Stingen, J.C., Guidolin, A.F., Bertoldo, J.G. (2012) Adaptabilidade e estabilidade em milho: rendimento de grãos x severidade de cercosporiose. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 11: 106-117.
- Eujayl, I., Sledge, M.K., Wang, L., May, G.D., Chekhovskiy, K., Zwonitzer, J.C., Mian, M.A. (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 414-422.

- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Tradução de M.A. Silva; J.C. Silva. Viçosa: UFV, 279p.
- Falconer, D.S., MacKay, T.F.C. (1996) *Introduction to quantitative genetics*. 4. ed. Longman Scientific & Technical, Burnt Mill, Harlow, United Kingdom.
- Faleiro, F.G., Andrade, S.R.M., Reis Junior, F.B. (2011) *Bioteecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. In: *Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal*. 1Ed. Planaltina: DF, 55-118.
- Fancelli, A.L., Dourado Neto, D. (2000) *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária, 360p.
- Faria, V.R., Viana, J.M.S., Sobreira, F.M., Silva, A.C. (2008) Seleção recorrente recíproca na obtenção de híbridos interpopulacionais de milho de pipoca. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 43:1749-1755.
- Ferrão, R.G., Silva, J.C., Cruz, C.D. (1985) Avaliação da capacidade combinatória de oito linhagens de milho em um sistema dialélico desbalanceado. *Revista Ceres*, 32:283-292.
- FIESP. Safra Mundial de Milho 2015/16 - 2º Levantamento do USDA. Disponível em: <[http://az545403.vo.msecnd.net/uploads/2015/06/boletim\\_safra-mundial-milho\\_junho2015.pdf](http://az545403.vo.msecnd.net/uploads/2015/06/boletim_safra-mundial-milho_junho2015.pdf)>. Acesso em 03 de Jul, 2015.
- Fraser, L.G., Harvey, C.F., Crowhurst, R.N., Silva, H.N. (2004) EST-derived microsatellites from *Actinidia species* and their potential for mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1010-1016.
- Freitas, I.L.J., Amaral Junior, A.T., Viana, A.P., Pena, G.F., Cabral, P.S., Vittorazzi, C., Silva, T.R.C. (2013) Ganho genético avaliado com índices de

seleção e com REML/Blup em milho-pipoca. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 48:1464-1471.

Freitas Júnior, S.P., Amaral Júnior, A.T. do., Rangel, R.M., Viana, A.P. (2009) Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9:1-7.

Fritsche-Neto, R., Vieira, R.A., Scapim, C.A., Miranda, G.V., Rezende, L.M. (2012) Updating the ranking of the coefficients of variation from maize experiments. *Acta Scientiarum*, 34: 99-101.

Fu, Y.B., Peterson, G.W., Yu, J.K., Gao, L., Jia, J., Richards, K.W. (2006) Impact of plant breeding on genetic diversity of the Canadian hard red spring wheat germplasm as revealed by EST-derived SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:1239–1247.

Gabriel, A.P.C. (2006) *Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (Zea mays L.) assistida por marcadores moleculares*. Tese (mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 112p.

Gabriel, A.P.C. *Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho comum (Zea mays L.) monitorada por marcadores moleculares: avanço de gerações e avaliação do progresso genético*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 103p.

Galinat, W.C. (1974) Intergenomic mapping of maize, teosinte and *Tripsacum*. *Evolution*, 27:644-55.

Galinat, W.C. (1977) The origin of corn. In: Sprague, G.F. (ed.) *Corn and corn improvement*. New York: *Academic Press*, 48p.



- Galon, L., Tironi, S.P., Rocha, A.A., Soares, E.R., Concenço, G., Alberto, C.M. (2010) Influência dos fatores abióticos na produtividade da cultura do milho. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, 4:18-38.
- Galvão, K.S.C., Ramos, H.C.C., Santos, P.H.A.D., Entringer, G.C., Vettorazzi, J.C.F., Pereira, M.G. (2015) Functional molecular markers (EST-SSR) in the full-sib reciprocal recurrent selection program of maize (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Research* 14:7344-7355.
- Gao, L., Tang, J., Li, H., Jia, J. (2003) Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Molecular Breeding*, 12:245–261.
- Ge, H., Li, H., Liu, Y., Li, X., Chen, H. (2011) Characterization of novel developed expressed sequence tag (EST)-derived simple sequence repeat (SSR) markers and their application in diversity analysis of eggplant. *African Journal of Biotechnology*, 10:9023-9031.
- Goodman, M.M. (1980) História e Origem do Milho. In: Paterniani, E. (Ed.). *Melhoramento e produção do milho no Brasil*. Campinas, Fundação Cargill, p. 1-31.
- Goodman, M.M., Smith, J.S.C. (1987) Botânica. In: Parteniani, E., Viegas, G.P. (eds.) *Melhoramento e produtividade de milho*. Campinas: Fundação Cargill, p.41-78.
- Gupta, P.K., Rustgi, S. (2001) Molecular markers from the transcribed / expressed region of the genome in the higher plants. *Functional & Integrative Genomics*, 4: 139-162.
- Gupta, V., Raghuvanshi, S., Gupta, A., Saini, N., Gaur, A., Khan, M.S., Gupta, R.S., Singh, J., Duttamajumder, S.K., Srivastava, S., Suman, A., Khurana, J.P., Kapur, R., Tyagi, A.K. (2010) The water deficit stress and redrot-related genes in sugarcane. *Functional e Integrative Genomics*, 10:207–214.

- Hallauer, A.R. (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 3:01-33.
- Hallauer, A.R., Miranda Filho, J.B. (1988) *Quantitative genetics in maize breeding*. 2 ed. Ames. Iowa State University Press. 468 p.
- Hallauer, A.R., Carena, M. J., Miranda, J.B. (2010) *Quantitative genetics in maize breeding*. 3ed. Iowa: Iowa State University Press/Springer Science. 664p.
- Hallauer, A.R. (1973) Hybrid development and population improvement in maize by reciprocal full-sib selection. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 2:84-101.
- Hallauer, A.R., Eberhart, S.A. (1970) Reciprocal full-sib selection. *Crop Science*, 10:315-316.
- Han, Z., Wang, C., Song, X., Guo, W., Gou, J., Li, C., Chen, X., Zhang, T. (2006) Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSR in allotetraploid cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:430–439.
- Hazel, L.N. (1943) The genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics*, 28:476-490.
- Hinze, L.L., Kresovich, S., Nason, J.D., Lamkey, K.R. (2005) Population genetic diversity in a maize reciprocal recurrent selection program. *Crop Science*, 45:2435–2442.
- Hisano, H., Sato, S., Isobe, S., Sasamoto, S., Wada, T., Matsuno, A., Fujishiro, T., Yamada, M., Nakayama, S., Nakamura, Y. (2007) Characterization of the soybean genome using EST-derived microsatellite markers. *DNA Research*, 14:271–281.

- Hull, F. H. (1945) Recurrent selection for specific combining ability in corn. *Journal of the American Society of Agronomy*, 37:134-145.
- INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Dados meteorológicos. Disponível em:  
[http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg\\_dspDadosCodigo\\_sim.php?QTYwNw==](http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QTYwNw==)  
Acessado em novembro de 2015.
- Jakelaitis, A., Silva, A. A., Ferreira, L.R. (2005) Efeitos do nitrogênio sobre o milho cultivado em consórcio com *Brachiaria brizantha*. *Acta Scientiarum*, 27:39-46.
- Jenweerawat, S., Aekatasanawan, C., Laosuwan, P., Hallauer, A.R. (2009) Interpopulation hybrid development in maize using modified reciprocal recurrent selection. *Thai Journal of Agricultural Science*, 42:139–148.
- Keeratinijakal, V., Lamkey, K.R. (1993) Responses to reciprocal recurrent selection in BSSS and BSCB1 maize populations. *Crop Science*, 33:73-77.
- Kuleung, C., Baezinger, P.S., Dweikat, I. (2004) Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 1147-1150.
- Kumar, L.S. (1999) DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*, 17: 143-182.
- La Rota, M., Kantety, R.V., Yu, J.K., Sorrells, M.E. (2005) Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. *BMC Genomics*, 23:1-12.
- Lea, P.J., Mifflin, B.J. (2011) Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. In: Foyer C, Zhang H, eds. Nitrogen metabolism in plants in the post-genomic era. *Annual Plant Reviews*, Vol. 42. West Sussex: Blackwell Publishing Ltd., 1–40.

- Liu, K., Muse, S.V. (2005) Powermarker: integrated analysis environment for genetic markers data. *Bioinformatics*, 21: 2128–2129.
- Lonquist, J.H., Williams, N.E. (1967) Development of maize hybrids through selection among full-sib families. *Crop Science*, 7:369-370.
- Maia, L.C., Palmieri, D. A., Souza, V.Q., Kopp, M.M., Carvalho, F.I.F., Oliveira, A.C. (2008) SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. *International Journal of Plant Genomics*, 1-9.
- Mangesdorf, P.C. (1974) *Corn its origin, evolution and improvement*. Cambridge: Harvard University Press, 262p.
- Martins, I.S., Martins, R.C.C., Pinho, D.S. (2006) Alternativas de índices de seleção em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Cerne*, 12: 287-291.
- Menezes Júnior, J.A.N., Ramalho, M.A.P., Abreu, A.F.B. (2008) Seleção recorrente para três caracteres do feijoeiro. *Bragantia*, 67:833-838.
- Moe, K.T., Zhao, W.G., Song, H.S., Kim, Y.H., Chung, J.W., Cho, Y.I., Park, P.H., Park, H.S., Chae, S.C., Park, Y.J., (2010). Development of SSR markers to study diversity in the genus *Cymbidium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 585-594.
- Mian, M.A., Saha, M.C., Hopkins, A.A., Wang, Z.Y. (2005) Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome*, 48:637–47.
- Montagnon, C., Leroy, T., Cilas, C., Legnate, H., Charrier, A. (2008) Heterozygous genotypes are efficient testers for assessing between-population combining ability in the reciprocal recurrent selection of *Coffea canephora*. *Euphytica*, 160:101–110.

- Mudge, J., Cannon, S.B., Kalo, P., Oldroyd, G.E.D., Roe, B.A., Town, C.D., Young, N.D. (2005) Highly syntenic regions in the genomes of soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 5:15-30.
- Mulamba, N.N., Mock, J.J. (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egypt Journal of Genetics and Cytology*, 7:40-57.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Database of Expressed Sequence Tags (dbEST). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessado em: fevereiro de 2015.
- Oliveira, E. J., Santos, V. S., Lima, D. S., Machado, M. D., Lucena, R. S., Motta, T. B. N., Castellen, M. S. (2008) Seleção em progênies de maracujazeiro-amarelo com base em índices multivariados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:1543-1549.
- Parentoni, S.N., Souza Junior, C.L. (2008) Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 43:893-901.
- Pashley, C.H., Ellis, J.R., McCauley, D.E., Burke, J.M. (2006) EST databases as a source for molecular markers: Lessons from the *Helianthus*. *Journal of Heredity*, 97: 381-388.
- Parteniani, E. (1967) Selection among and within half-sib families in a Brazilian population of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*, 7:212-216.
- Parteniani, E. (1980) Melhoramento e Produtividade do milho no Brasil. *Fundação Cargil*. Vol. Único 650 p.

- Paterniani, M.E.A.G.Z., Guimarães, P.S., Lüders, R.R., Gallo, P.B., Souza, A.P., Laborda, P.R., Oliveira, K.M. (2008) Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. *Bragantia*, 67: 639-648.
- Peakall, R., Smouse, P. (2009) GenAlEx Tutorials – Part 1: *Introduction to Population Genetic Analysis*. Australian National University, Australia.
- Pedrozo, C.A., Benites, F.R.G., Barbosa, M.H.P., Resende, M.D.V., Silva, F.L. (2009) Eficiência de índices de seleção utilizando a metodologia reml/blup no melhoramento da cana-de-açúcar. *Scientia Agrária*, 10:31-36.
- Peiris, B.L., Hallauer, A.R. (2005) Comparison of half-sib and full-sib reciprocal recurrent selection and their modifications in simulated populations. *Maydica*, 50:25–37
- Pesek, J., Baker, R.J. (1969) Desired improvement in relation to selection indices. *Canadian Journal of Plant Science*, 49:803-804; 1:215-274.
- Pinto, L.R., Vieira, M.L.C., Souza Junior, C.L., Souza, A.P. (2003) Genetic diversity by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. *Euphytica*, 134:277–286.
- Pokou, N.D., N’Goran, J.A.K., Lachenaud, P., Eskes, A., Montamayor, J.C., Schnell, R., Kolesnikova-Allen, M., Clement, D., Sangare, A. (2009) Recurrent selection of cocoa populations in Cote d’Ivoire: comparative genetic diversity between the first and second cycles. *Plant Breed*, 128:514–520.
- Poncet, V., Rondeau, M., Tranchant, C., Cayrel, A., Hamon, S., de Kochko, A., Hamon, P. (2006) SSR mining in coffee tree EST database: potencial use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. *Molecular Genetics and Genomics*, 276: 436-449.
- Premier Biosoft. NetPrimer.

Available at: <[http:// www.premierbiosoft.com/netprimer/](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/)>. Acessado em: fevereiro de 2015.

Ramu, P., Billot, C., Rami, J.F., Senthilvel, S., Upadhyaya, H.D., Ananda, R. L., Hash, C.T. (2013) Assessment of genetic diversity in the *sorghum* reference set using EST-SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 126:2051–2064.

Rangel, R.M., Amaral Júnior, A.T., Viana, A.P., Freitas Júnior, S.P., Pereira, M.G. (2007) Prediction of popcorn hybrid and composites means. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7:287-295.

Rangel, R.M., Amaral Junior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Freitas Junior, S.P., Candido, L.S. (2011) Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. *Revista Ciência Agronômica*, 42: 473-481.

Rademacher, M.A.M., Hallauer, A.R., Russell, W.A. (1999) Comparative response of two reciprocal recurrent selection methods in BS21 and BS22 maize populations. *Crop Science*, 39:89-97.

Ramalho, M.A.P., Ferreira, D.F., Oliveira, A.C. (2012) Experimentação em genética e melhoramento de planta, 3ed. Lavras: UFLA, 328p.

Ramos, H.C.C., Pereira, M.G., Silva, F.F., Gonçalves, L.S.A., Pinto, F.O., de Souza Filho, G.A., Pereira, T.S.N. (2011) Genetic characterization of papaya plants (*Carica papaya* L.) derived from the first generation of backcross. *Genetic and Molecular Research*. 10: 393-403.

Reis, M.C., Souza, J.C., Ramalho, M.A.P., Guedes, F.L., Santos, P.H.A.D. (2009) Progresso genético com a seleção recorrente recíproca para híbridos interpopulacionais de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44:1667-1672.

- Ribeiro Junior, J.I., Cruz, C.D., Scapim, C.A., Pacheco, C.A.P. (2000) Metodologia para avaliar os ganhos por seleção recorrente recíproca em populações de milho. *Revista Ceres*, 40:591-602.
- Ribeiro, R.M., Amaral Junior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Candido, L.S., Silva, T.R.C., Pena, G.F. (2012) Genetic progress in the UNB-2U population of popcorn under recurrent selection in Rio de Janeiro, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 2: 1417-1423.
- Romay, M.C., Ordas, B., Revilla, P., Ordas, A. (2011) Three cycles of fullsib reciprocal recurrent selection in two Spanish maize populations. *Crop Science*, 51:1016–1022.
- Russell, W.A., Eberhart, S.A. (1975) Hybrid performance of selected maize lines from reciprocal recurrent and testcross selection programs. *Crop Science*, 15:1-4.
- Santos, C.A.F., Araujo, F.P. (2001) Aplicação de índices para seleção de caracteres agrônômicos de feijão-de corda. *Ciência Agrônômica*, 32:78-84.
- Santos, M.F., Aguiar, A.M., Filho, N.O. (2003) Efeitos da seleção recorrente recíproca em um programa de melhoramento de milho. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Porto seguro, Bahia, 2003.
- Santos, F.S., Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S. de P., Rangel, R.M., Pereira, M.G. (2007) Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho-pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. *Bragantia*, 66:389-396.
- Santos, M.F., Câmara, T.M.M., Moro, G.V., Costa, E.F.N., Souza Júnior, C.L. (2007) Responses to selection and changes in combining ability after three cycles of a modified reciprocal recurrent selection in maize. *Euphytica*, 157:185-194.



- Santos, F.S., Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S. de P., Rangel, R.M., Pereira, M.G. (2007) Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho-pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. *Bragantia*, 66:389-396.
- Santos, F.S., Amaral Júnior, A.T., Freitas Júnior, S.P., Rangel, R.M., Scapim, C.A. (2008) Genetic gain prediction of the third recurrent selection cycle in a popcornpopulation. *Acta Scientiarum*, 30: 651-65.
- Santos, M.F., Aguiar, A.M., Souza Júnior, C.L., Moro, G.V. (2005) Responses to a reciprocal recurrent selection and changes in genetic variability in IG-1 and IG-2 maize populations. *Genetics and Molecular Biology*, 28:781-788.
- SAS INSTITUTE, *Statistical Analysis Software: SAS*, 9.1, 2003, Cary-NC, EUA.
- Sawazaki, E. (2001) A cultura do milho pipoca no Brasil. *O Agrônomo*, 53:11-13.
- Scapim, C.A., Carvalho, C.G.P., Cruz, C.D. (1995) Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30:683-686.
- Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablet, T. E.M., Lee, L.S., Henry, R.J. (2000) Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 5:723–726.
- Senthilvel, S., Jayashree, B., Mahalakshmi, V., Sathish, K.P., Nakka, S., Nepolean, T., Hash, C.T. (2008) Development and mapping of simple sequence repeat markers for pearl millet from data mining of expressed sequence tags. *BMC Plant Biology*, 8:1-19.
- Sharopova, N., McMullen, M.D., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardiner, J., Bergstrom, D., Houchins, K., Melia-Hancock, S., Musket, T., Duru, N., Polacco, M., Edwards, K., Ruff, T., Register, J.C., Brouwer, C.R., Thompson, R.D., Velasco, R., Chin, E., Lee, M., Woodman-Clikeman,

- W., Long, M.J., Liscum, M., Cone, K., Davis, G., Coe, E.H. (2002) Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular Biology*, 48: 463–481.
- Sharma, P.C., Grover, A., Kahl, G. (2007) Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology*, 25: 490-498.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58:221-227.
- Silva, A. J. (2015). Mulamba and Mock (1978) in SAS (Version 2.0). *Jaboticabal, SP, Brazil*.
- Silva, F.A., Freitas, F.C.L., Rocha, P.R.R., Cunha, J.L.X.L., Dombroski, J.L.D., Coelho, M.E.H., Lima, M.F.P. (2015) Milho para ensilagem cultivado nos sistemas de plantio direto e convencional sob efeito de veranico. *Ciências Agrárias*, 36: 327-340.
- Silva, M.G.M., Viana, A.P., Goncalves, G.M., Amaral Junior, A.T., Pereira, M. G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro- amarelo: Alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciência e Agrotecnologia*, 33:170-176.
- Silva, M.G.M., Viana, A.P., Amaral Junior, A.T., Goncalves, L.S.A., Reis, R.V. (2012) Biometria aplicada ao melhoramento intrapopulacional do maracujazeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica*, 43: 493-499.
- Silva, M.G. M., Viana, A.P. (2012) Alternativas de seleção em população de Maracujazeiro-Azedo sob Seleção Recorrente Intrapopulacional. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34: 525-531.
- Simons, M., Saha, R., Guillard, L., Clément, G., Armengaud, P., Canãs, R., Maranas, C.D., Lea, P.J., Hirel, B. (2014) Nitrogen-use efficiency in maize

(*Zea mays* L.): from 'omics' studies to metabolic modeling. *Journal of Experimental Botany*, 1 -15.

Singh R.K., Jena, S.N., Khan, S., Yadav, S., Nandita Banarjee, N., Raghuvanshi, S., Bhardwaj, V., Dattamajumder, S.K., Kapur, R., Solomon, S., Swapna, M., Srivastava, S., Tyagi, A.K. (2013) Development, cross-species/genera transferability of novel EST-SSR markers and their utility in revealing population structure and genetic diversity in sugarcane. *Elsevier*, 524: 309–329.

Smith, H. F. (1936) A discriminant function for planta selection. *Ann. Eugen*, 7:240-250.

Souza júnior, C.L., Pinto, R.M.C. (2000) Responses to a short-term reciprocal recurrent selection procedure in maize. *Maydica*, 45:21-28.

Souza Junior, C.L., Barrios, S.C.L., Moro, G.V. (2010) Performance of maize single-crosses developed from populations improved by modified reciprocal recurrent selection. *Scientia Agricola*, 67:198–205.

Souza, L.V., Miranda, G.V., Galvão, J.C.C., Eckert, F.R., Mantovani, E.E., Lima, R.O., Guimarães, L.J.M. (2008) Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:1517-1523.

Sousa, S.M., Clark, R.T., Mendes, F.F., Oliveira, A.C., Vasconcelos, M.J.V., Parentoni, S.N., Kochian, L.V., Guimarães, C.T., Magalhães, J.V. (2012) A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. *Functional Plant Biology*, 39:925–935.

Srinivas, G., Satish, K., Madhusudhana, R., Seetharama, N. (2009) Exploration and mapping of microsatellite markers from subtracted drought stress ESTs in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theoretical and Applied Genetics*, 118:703–717.

- Sun, X., Du, Z., Ren, J., Amombo, E., Hu, T., Fu, J. (2015) Association of SSR markers with functional traits from heat stress in diverse tall fescue accessions. *Plant Biology*, 15:1-13.
- Tang, J., Gao, L., Cao, Y., Jia, J. (2006) Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. *Euphytica*, 151: 87–93.
- Tardin, F.D., Pereira, M.G., Gabriel, A.P.C., Amaral Junior, A.T., Filho, G.A.S. (2007) Selection index and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7: 225-233.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. A. M. (2007) *Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3* Nucleic Acids Research, 35: W71-W74.
- Varshney, R.K., Hoisington, D.A., Tyagi, A.K. (2006) Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends in Biotechnology*, 24:490–499.
- Varshney, R.K., Grandt, A., Sorrells, M.E. (2005a) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23: 48-55.
- Varshney, R.K., Sigmund, R., Börner, A., Korzun, V., Stein, N., Sorrells, M.E., Langridge, P., Graner, A. (2005b) Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science*, 168:195-202.
- Vasconcelos, E. S., Reis, M. S., Sedyiama, T., Cruz, C. D. (2008) Análise não paramétrica da sanidade de sementes e índices de eliminação e classificação de genótipos de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:341-348.
- Vasconcelos, E.S., Ferreira, R.P., Cruz, C.D., Moreira, A., Rassini, J.B., Freitas, A.R. (2010) Estimativas de ganho genético por diferentes critérios de seleção em genótipos de alfafa. *Ceres*, 57: 205-210.

- Vencovsky, R. Herança quantitativa. In: Paterniani, E., Viégas, G. P., (Ed). *Melhoramento e produção do milho*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap.5, p. 137-214.
- Vettorazzi, J.C.F. (2014) *Obtenção e avaliação de híbridos e linhagens de milho comum via seleção recorrente recíproca entre famílias de irmãos completos*. Monografia (Agronomia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 43p.
- Vettorazzi, J.C.F., Entringer, G.C., Cunha, K.S., Catarina, R.S., Pereira, M.G. (2014) Molecular Markers Applied to Reciprocal Recurrent Selection in Maize. II *Genetics and plant breeding* meeting of Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes – RJ.
- Vidal, M.S., Carvalho, J.M.F.C., Meneses, C.H.S.G. (2005) Déficit hídrico: aspectos morfofisiológicos. Campina Grande: *Embrapa Algodão*. 19p. (Embrapa Algodão. Documentos, 142).
- Vilarinho, A.A., Viana, J.M.S., Santos, J.F. dos, Câmara, T.M.M. (2003) Eficiência da seleção de progênies S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> de milho-pipoca, visando à produção de linhagens. *Bragantia*, 6:9-17.
- Weatherwax, P. (1954) *Indian corn in old America*. New York, USA: The MacMilan Co, 253p.
- Wen, Z.X., Ding, Y.L., Zhao, T.J., Gai, J.Y. (2009) Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China. *Theoretical and Applied Genetics*, 119:371-381.
- Williams J.G.K., Kubelik, A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey. S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.

- Willians, J.S. (1962) The evaluation of a selection index. *Biometrics*, 18:375-393.
- Wünsch, A., Hormaza J.I. (2007) Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Scientia Horticulturae*, 113:37-43.
- Yamini, K.N., Ramesh, K., Naresh, V., Rajendrakumar, P., Anjani, K., Kumar, V.D. (2013) Development of EST-SSR markers and their utility in revealing cryptic diversity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22:90–102.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z., Xiyan, J.M. (1999) POPGENE. *Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis*. Version 1.31, Manual.
- Zang, G.W., Xu, S.C., Mao, W.H., Hu, Q.Z., Gong, Y.M. (2013) Determination of the genetic diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using EST-SSR markers. *Journal of Zhejiang University*, 14:279-288.
- Zhang, M., Mao, W., Zhang, G., Wu, F. (2014) Development and Characterization of Polymorphic EST-SSR and Genomic SSR Markers for Tibetan Annual Wild Barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLOS ONE* 9(4): e94881.
- Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R., Schoemaker, C. (2005) Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiology*, 137:1189-1196.

## **ANEXOS**

**Tabela 7.** 87 primers desenhados com a identificação da sequência do banco de dados do NCBI, homologia com proteínas, as sequências *forward* e *reverse*, temperatura de *melting* (Tm), temperatura de anelamento (Ta), tamanho esperado dos alelos, tamanho obtido dos alelos e polimorfismo.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup> pb	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-1	gi 34447092 gb	Malatedehydrogenase	(F) CAGCAGCTGAAGCCCTTAAC (R) TTCCTTTCCATTCCCTCCTT	54	53	163	270	Não
UENF-2	gi 34447091 gb	Lipoxygenase	(F) ACCGAGGAAGTACAGCGAGA (R) AGTTCCCCTACATGCTGCTG	57	54	327	480	Não
UENF-3	gi 34447043 gb	Acr4	(F) TTGTTCCCTCCCTCTCCCTCT (R) CTCCTTTGCTTCCTCCTCCT	56	ND	226	ND	ND
UENF-4	gi 34447013 gb	Eucalyptus grandisleishmanoly sin-like peptidase	(F) CCCTGGCTATCTCATTCCAA (R) GCACAAGCAAGCGATGTA	54	ND	332	ND	ND
UENF-5	gi 34446996 gb	Não caracterizada	(F) GGAGCCGTTATGAACCTGAA (R) TGAAGGTGGGAAAGTTGTC	55	ND	167	ND	Não
UENF-6	gi 34446944 gb	Ferredoxin NADP reductase	(F) AAGAAGGTGGCAGAGCAGAG (R) TGCAAATGTAAACGGGTGAA	53	50	314	297 – 219	Sim
UENF-7	gi 56462105 gb	Aminotransferase	(F) GACAGCAAGGGATGGACAGT (R) TCAAATCAATGGCTGCTCAA	53	56	208	210	Não
UENF-8	gi 56462021 gb	Não caracterizada	(F) CCTCACAGACGACTGGA (R) GCTGTTCTGTGGCTGCATT	56	52	174	190	Não
UENF-9	gi 56462004 gb	Dehydrin	(F) GCGACCACAAGGAGAAGAAG (R) TGCATGACACCAGTGAACA	55	55	208	210	Não
UENF-10	gi 56461937 gb	Não caracterizada	(F) GGAGAACTGGAGATGCAAGC (R) AGAGGGAGATGAGGGGGTAA	56	59	150	150	Não
UENF-11	gi 34447043 gb	Acr4	(F) TTGTTCCCTCCCTCTCCCTCT (R) CTCCTTTGCTTCCTCCTCCT	56	ND	226	ND	ND
UENF-12	gi 34447032 gb	Histone I	(F) AACTTCAAGAAGACTGCCGC (R) TCACAAGGAGCCTAGCCATT	56	ND	345	ND	ND



Tabela 7. Cont.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup>	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-13	gi 34446992 gb	Polyubiquitin	<u>(F) AGCGTCTCATCTTTGCTGGT</u> <u>(R) AGTTCCAACCAAACCTGCTGG</u>	56	ND	322	ND	ND
UENF-14	gi 34446962 gb	Não caracterizada	<u>(F) GAAGACGACGCAAAGAAAGG</u> <u>(R) TGTTCAAGATCGTGCGTCCTA</u>	54	ND	222	ND	ND
UENF-15	gi 56461958 gb	Kinase	<u>(F) ATCTTCAAGGCCGACTACCA</u> <u>(R) GGAGGACATGGAGGAGATGA</u>	56	57	331	298 –304	Sim
UENF-16	gi 34447032 gb	Histone I	<u>(F) TAGAGCCCTCTCTGCCACTC</u> <u>(R) GCCTCCTTGATCATCTCGAA</u>	54	51	176	255	Não
UENF-17	gi 56461958 gb	Kinase	<u>(F) CCTCAGATTGCCTCTTCTCG</u> <u>(R) CTTCCCTGTTCTCCCATCAA</u>	54	ND	240	ND	ND
UENF-18	gi 700849618 gb	Não caracterizada	<u>(F) GAGGAGGAGGAGCACTGATG</u> <u>(R) CACAAGCGAGCACAAAAAGA</u>	54	51	331	330	Não
UENF-19	gi 700849617 gb	Não caracterizada	<u>(F) CAGGGACCAACAGGAACAAC</u> <u>(R) TTCCAGTCTTGAGCTGCTTG</u>	55	59	222	220 –240	Sim
UENF-20	gi 700849614 gb	Putativeproteinkinase	<u>(F) CTTGAGAGGCTGGAGAAGA</u> <u>(R) CGAGGTAGATGGAGGGAGAG</u>	56	56	236	240	Não
UENF-21	gi 700849613 gb	Não caracterizada	<u>(F) GCCAGAGCAGAACAGAGGAG</u> <u>(R) TGTTGTAGGAGCACGACGAC</u>	57	56	252	248	Não
UENF-22	gi 34447042 gb	Não caracterizada	<u>(F) CCTGCTCTAGTTTCGGATGC</u> <u>(R) GAAGAGGTGGTGCTGTAGGC</u>	56	ND	349	ND	ND
UENF-23	gi 34447033 gb	Não caracterizada	<u>(F) CCGTCCAGTCAAAAGTCCTC</u> <u>(R) GATGACTCGGCGGAGTAGAA</u>	55	55	308	430	Não
UENF-24	gi 34447023 gb	Lipoxygenase	<u>(F) CCTCAAGGCTTTCAGAATGG</u> <u>(R) CTCCACCGCAGGTCTCTATC</u>	54	54	204	300	Não
UENF-25	gi 34446999 gb	Não caracterizada	<u>(F) GCAGCAACAGCATTAGACGA</u> <u>(R) CCATTTCCGAGGCAATAGTT</u>	53	ND	160	ND	ND

Tabela 7. Cont.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup>	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-26	gi 34447002 gb	Diphosphonucleotide phosphatase2	(F) <u>CCAGTGTGAGGAGGATTGGT</u> (R) <u>AGGATTTGGTTTGCGGTATG</u>	53	50	281	225	Não
UENF-27	gi 34446946 gb	Responsiveto abscisicacid	(F) <u>GGTTTTTGTGGAGGGGAGAT</u> (R) <u>CCAAAGGTTCAACGGACACT</u>	55	55	244	272	Não
UENF-28	gi 34446929 gb	Não caracterizada	(F) <u>GATAGCGTTCCTCGGCAGTA</u> (R) <u>GTCGTGGTGTAGTGCTCCAA</u>	57	ND	285	ND	ND
UENF-29	gi 34446921 gb	Não caracterizada	(F) <u>AACCCAACTCAGGCAGACAC</u> (R) <u>GAAGCCAGACGACATTCACA</u>	55	55	273	471	Não
UENF-30	gi 56462094 gb	Acyl-desaturase	(F) <u>CACATTCAATGCCACCTCAC</u> (R) <u>CCTGTTCTCCTCAGCAGTCC</u>	54	55	350	356	Não
UENF-31	gi 56462080 gb	CTP synthase	(F) <u>TAGCCATAGGGTGGTGAGGT</u> (R) <u>TTTGGCCAAGCATTGTGTA</u>	53	56	191	171	Não
UENF-32	gi 56461983 gb	Type wound-induced proteinase inhibitor WIP1	(F) <u>CACCCAATCAAACATGCAAA</u> (R) <u>GACTTCCTCCCCGAAAACCTG</u>	52	52	161	154 – 159	Sim
UENF-33	gi 56461982 gb	Type wound-induced proteinase inhibitor WIP1	(F) <u>GACTTCCTCCCCGAAAACCTG</u> (R) <u>AAGGGACACCCAATCAAACA</u>	55	58	192	160 – 164	Sim
UENF-34	gi 56461938 gb	Auxin-responsive	(F) <u>TCGCCTTATGGTATTGAGTTG</u> (R) <u>ATAGGAAGCACGACCACCAC</u>	54	54	207	194 – 213	Sim
UENF-35	gi 34447056 gb	Photosystem II 10 kdapolypeptide	(F) <u>GCCCTCCTCGTCTACAACAC</u> (R) <u>ATTACAGTGGGCATCGAAGG</u>	55	55	154	296	Não
UENF-36	gi 34447045 gb	Polyubiquitin	(F) <u>CATCACCCCTTGAGGTGAGT</u> (R) <u>GAGCACAAGGTGGAGAGTCG</u>	55	55	178	ND	ND
UENF-37	gi 34446951 gb	Photosystem II 10 kdapolypeptide	(F) <u>CCCTCCTCGTCTACAACACC</u> (R) <u>ATTACAGTGGGCATCGAAGG</u>	55	55	153	300	Não
UENF-38	gi 34446916 gb	Cleavage andpolyadenylationspecificity	(F) <u>AGATTGACCCAAAGTTCGATG</u> (R) <u>GGGAGCAGAAAGGAGGAGTT</u>	55	52	328	222	Não

Tabela 7. Cont.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup> pb	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-39	gi 56462030 gb	uncharacterized	<u>(F) CAGCGAAGACATCCTGGTAA</u> <u>(R) CACGAGTTTGGTGAGGCTTT</u>	54	57	197	200	Não
UENF-40	gi 56462006 gb	Autophagy-related protein 8 precursor	<u>(F) ACGGATTCTTGAGACGCCTA</u> <u>(R) ACGAGGAGAACAAGGACGAG</u>	56	53	162	153 – 167	Sim
UENF-41	gi 34447087 gb	Cysteine protease	<u>(F) GCGTTCTCCTCCTCCTTTCT</u> <u>(R) CCTTGTAGGACTTGCCGAAC</u>	56	ND	171	ND	ND
UENF-42	gi 34447074 gb	Catalase 1	<u>(F) TTCTTCCCCTTCTGGCTTCT</u> <u>(R) TAAGGGCGGAGTTGTTGTTC</u>	55	55	208	242	Não
UENF-43	gi 34447055 gb	Cysteine protease	<u>(F) GCGTTCTCCTCCTCCTTTCT</u> <u>(R) CTTGTAGGACTTGCCGAACC</u>	56	59	170	200	Não
UENF-44	gi 34447024 gb	Benzylalcohol O-benzoyltransferase	<u>(F) CTCTGGCATCCACCTGTACC</u> <u>(R) GCTCTCGAGGATGAACTGCT</u>	57	TD-62	266	220 – 232	Sim
UENF-45	gi 56462121 gb	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<u>(F) AGTTGCTCGTCTCCAAGCAC</u> <u>(R) GGATGAGAAGGGGCAAGAAT</u>	55	55	172	173	Não
UENF-46	gi 56462109 gb	Não caracterizada	<u>(F) CTGCCAAGGGTTCAAAGAAG</u> <u>(R) CTCCTCAGTGGACAGCATCA</u>	54	57	224	230	Não
UENF-47	gi 56462066 gb	Não caracterizada	<u>(F) CTTTTGGATGGGCATGTTTT</u> <u>(R) CACGGTGCACGCTCTAAATA</u>	52	50	282	269 – 281	Sim
UENF-48	gi 56461965 gb	Polymerase	<u>(F) CGCAGAGCAACGATTACAAG</u> <u>(R) GGATGACGATGGTGGTAAGG</u>	54	57	184	188	Não
UENF-49	gi 34447049 gb	Não caracterizada	<u>(F) A GACTTACGCCGAAGCAAGA</u> <u>(R) CATCCACCAAGGAAGCCTTA</u>	55	58	264	280	Não
UENF-50	gi 56462112 gb	Rab-6A	<u>(F) CTGAGAGGGGCAGTGATGTT</u> <u>(R) CCAAAGATCATGAGCAAGCA</u>	53	50	339	220	Não
UENF-51	gi 56462096 gb	Não caracterizada	<u>(F) AGTGAACCTTGCCACCAATC</u> <u>(R) GAATGGCAGAGATGGCAAAT</u>	53	50	231	300	Não

Tabela 7. Cont.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup>	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-52	gi 56462058 gb	Ribosomalprotein	(F) <u>ATGACCCTCGACTTCCACAC</u> (R) <u>GAGCATCTCCATGGTCTCCT</u>	56	53	249	250	Não
UENF-53	gi 56462046 gb	Glyoxylateaminotransferase	(F) <u>CGTTTGTGTGGGCTCCTAT</u> (R) <u>GTCGGAATCCTCTTTGGTGA</u>	54	57	263	452	Não
UENF-54	gi 56461996 gb	Rab-17	(F) <u>GTCAAAGCCGTA CTCTTCA</u> (R) <u>GAAGGAAAACGTAGCAGCA</u>	55	52	184	200	Não
UENF-55	gi 56461940 gb	Rmlc-type	(F) <u>GCATGTCATCGTAATGCTG</u> (R) <u>CTGCTGCTCAACAAAAACCA</u>	54	54	260	227	Não
UENF-56	gi 700849603 gb	Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	(F) <u>CCCCCTTTTGCCATTTATTT</u> (R) <u>TTGAAGAAGCCCCACAGAGT</u>	51,5	52,5	237	230	Não
UENF-57	gi 700849603 gb	Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	(F) <u>CCCCCTTTTGCCATTTATTT</u> (R) <u>TTGAAGAAGCCCCACAGAG</u>	51,5	54,5	238	229 – 238	Sim
UENF-58	gi 700849600 gb	Accsynthase	(F) <u>CAGCCATCCGATTTTTCTTT</u> (R) <u>CGATGTGAGAGCACTACGG</u>	51,5	58,5	186	236	Não
UENF-59	gi 34447080 gb	Xylemcysteine proteinase	(F) <u>CGACGACTTCTTCTCCATC</u> (R) <u>CACCGTACCTGAAACGACT</u>	55	ND	313	ND	ND
UENF-60	gi 34447057 gb	Não caracterizada	(F) <u>TTAACAAGGGCATGCCAAC</u> (R) <u>GTTCTCAGGGAAGGTGGTC</u>	54	51	186	390	Não
UENF-61	gi 34446962 gb	Não caracterizada	(F) <u>AGGTGCTCGCCAAAACTA</u> (R) <u>CTTTCTTTGCGTCGTCTTCC</u>	54	51	268	290	Não
UENF-62	gi 34446952 gb	Não caracterizada	(F) <u>ATGTGTGCAGTGCTACGA</u> (R) <u>AGGAAATCACAGCGGCTTA</u>	55	51	210	288	Não
UENF-63	gi 56462039 gb	Serine/threonine-protein kinase-like	(F) <u>GCTACACCATCAGCCACAG</u> (R) <u>TGCTGTTGCTTTCCCTTTCT</u>	55	55	157	150	Não
UENF-64	gi 56462033 gb	Pco149599	(F) <u>GTACAATGACGGTGCTGCT</u> (R) <u>TGAACTGCCTCACCACAGA</u>	57	TD-62	159	159	Não

Tabela 7. Cont.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup>	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-65	gi 56461961 gb	Não caracterizada	(F) CTAGGAAGCAGCTGGAGGAG (R) ATCCGATCGTCAATCAGACC	54	51	209	190	Não
UENF-66	gi 700849603 gb	Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	(F) CCCCCTTTTGCCATTTATTT (R) TTGAAGAAGCCCCACAGAGT	51,5	58,8	237	228 – 2 35	Sim
UENF-67	gi 56462095 gb	Não caracterizada	(F) TCTGGCACTTCTTCAACACG (R) TTCCTGACCTGCTCTTTTCG	55	52	239	290	Não
UENF-68	gi 56462083 gb	Não caracterizada	(F) CCTCGAACTTCTCCTTGACG (R) CAAGCACTTCGACGTCACAC	55	56	174	174	Não
UENF-69	gi 56462025 gb	Não caracterizada	(F) CAGCTATGGGTGGAGCAGAT (R) AGCAATAGCAGCGAGGAGAC	57	TD-62	313	345	Não
UENF-70	gi 56462017 gb	Flavonoid3',5'-hydroxylase	(F) CAGAACTCTGCCTGCCTCTT (R) TAGAGCAGCTCCAGGACACC	57	60	247	247	Não
UENF-71	gi 56461999 gb	Serine/threonine-proteinkinase	(F) GGAGGTATCCTGTGCGCATGT (R) CGGGTTTTTGGTCTGTGAAG	54	57	171	168	Não
UENF-72	gi 56462054 gb	Não caracterizada	(F) AAAACAACAGCCCCAGAATC (R) GAGCTTGCTACTCGGTAATCG	54	ND	185	ND	ND
UENF-73	gi 56462044 gb	Não caracterizada	(F) TCTGGATCTAGCACCAACACC (R) CAGACCTCCGTCCAGAGCTA	57	57	202	198	Não
UENF-74	gi 56461979 gb	Não caracterizada	(F) GCGTCATCAGCCTAGCAGTT (R) CAGGCCATGATGAGATCAGA	54	54	167	159 – 1 64	Sim
UENF-75	gi 56462062 gb	UDP-glycosyltransferase	(F) ACGAAGCACGCATGTGTTAC (R) GCAGTGACCACAGGACAGAA	56	53	219	220	Não
UENF-76	gi 56462048 gb	Serine/threonine-proteinkinase	(F) GGTTTGGATGCTGCTTCAAT (R) CAACAGCAACAACGGAATC	54	53	204	198 – 07	Sim
UENF-77	gi 56462031 gb	Zat9	(F) ATTCACAGCTGGACCTGGAT (R) GCTCTACTCTCCCTGCTTGC	56	TD-62	156	150 – 161	Sim

Tabela 7. Cont.

<i>Primers</i>	Identificação NCBI <sup>(a)</sup>	Homologia com <sup>(b)</sup>	Sequência (5' → 3') <sup>(c)</sup>	TM (°C) <sup>(d)</sup>	Ta (°C) <sup>(e)</sup>	Tamanho esperado (pb) <sup>(f)</sup>	Tamanho obtido (pb) <sup>(g)</sup>	Pol. <sup>(h)</sup>
UENF-78	gi 56462027 gb	Não caracterizada	(F) TTTTTCGGTCCTCGTACCAC (R) CACCACTTCTTCGGCTGATT	55	55	217	210	Não
UENF-79	gi 56462019 gb	Serine/threonine-proteinkinase	(F) GCAGGCACATGAATTTGAGA (R) TGAACCTGAACCAGCAGCAG	54	51	208	194 –226	Sim
UENF-80	gi 56462008 gb	3-UTR bindingprotein	(F) GTTCCAGGGGCTATGGATTI (R) TGGCAAAGGCTTTTCTCAGT	55	ND	249	ND	ND
UENF-81	gi 56462008 gb	3-UTR bindingprotein	(F) GTTTGGAGACGACAACGACA (R) TGGCAAAGGCTTTTCTCAGT	55	ND	224	ND	ND
UENF-82	gi 56461992 gb	Asparaginesynthetase	(F) AGTCCACCAACTCCCTGCTA (R) TAGACCCTTCCACCACCTTG	56	53	276	380	Não
UENF-83	gi 56461954 gb	Cycloartenolsynthase	(F) CCTCAGATTGCCTCTTCTCG (R) CTTCCCTGTTCTCCCATCAA	54	ND	240	ND	ND
UENF-84	gi 56461958 gb	Não caracterizada	(F)GAGGAGGAGGAGCACTGATG (R) CACAAGCGAGCACAAAAAGA	54	51	331	320	Não
UENF-85	gi 34446909 gb	Não caracterizada	(F) TTCACAGTTCTCCTGCCTCC (R) CTCCTTCCCCTCATCCCTAT	57	ND	325	ND	ND
UENF-86	gi 34446909 gb	Não caracterizada	(F) CGAGTACCTGGAGAAGGCAG (R) TCTCCCTTCCCTGTCCCTAT	57	ND	253	ND	ND
UENF-87	gi 34446909 gb	Não caracterizada	(F)GGACAGGGAAGGGAGAGAAC (R) ACGAACATCACGAACCTTCC	55	ND	334	ND	ND

a = Código do banco de dados NCBI; b = Homologia com proteínas; c = Sequência *forward* (F) e *reverse* (R); d = Temperatura de *Melting*; e = Temperatura de anelamento; f = Tamanho do alelo esperado; g = Tamanho do alelo obtido; h = Polimorfismo encontrado em genótipos de milho das populações CIMMYT e Piranão; ND = Não determinado.