

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

TEREZA APARECIDA DA SILVA

**Análise da diversidade e estrutura genética de variedades de milho
pipoca utilizando marcadores microssatélites**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
AGOSTO – 2012

TEREZA APARECIDA DA SILVA

**Análise da diversidade e estrutura genética de variedades de milho
pipoca utilizando marcadores microssatélites**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scapim.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
AGOSTO – 2012

Ao meu maior bem, minha família.

“DA FELICIDADE
Quantas vezes a gente, em busca da ventura,
Procede tal e qual o avozinho infeliz:
Em vão, por toda parte, os óculos procura
Tendo-os na ponta do nariz!”
(Mário Quintana).

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade para a realização do Curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor doutor Carlos Alberto Scapim, pela oportunidade, pela esmerada orientação e dedicação e pelo constante apoio.

Aos professores doutores Ronald José Barth Pinto, Claudete Aparecida Mangolin, Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Adriana Gonela, pelo constante auxílio, carinho e amizade.

À professora doutora Carmen Boto Querol, à Ana Daniela Lopes, Liriana Cantagalli e ao Javier Saavedra, pela colaboração durante a realização desse trabalho e pela amizade.

Ao Oélcio, pela disposição e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais, do Laboratório de Genética Animal do Núcleo de Pesquisas Aplicada à Agricultura (Nupagri), pela presença e apoio constantes.

À minha família, pelo amor, apoio sentimental e financeiro.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Tereza Aparecida da Silva, filha de Valdir José da Silva e de Maria Aparecida Martinez da Silva, nasceu em São Carlos do Ivaí, estado do Paraná, aos vinte dias do mês de abril de 1984.

Cursou o Ensino Fundamental e Médio, no Colégio Estadual Paraíso do Norte, na cidade de Paraíso do Norte, estado do Paraná, no período de 1990 a 2001.

Em março de 2006, graduou-se em Ciências Biológicas, com Habilitação em Licenciatura Plena e Bacharelado, na Universidade Paranaense (Unipar).

Cursou Pós-Graduação em nível de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Mestre em fevereiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Doutorado, também no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Classificação botânica e características do milho pipoca	4
2.2. Origem e evolução do milho pipoca	7
2.3. Melhoramento genético do milho pipoca.....	9
2.3.1. Diversidade genética e heterose	13
2.3.2. Uso de marcadores moleculares para estimar a diversidade genética	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Material genético.....	21
3.2. Extração do DNA	21
3.3. Quantificação do DNA.....	23
3.4. Amplificação do DNA	24
3.5. Análise dos dados.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Seleção de <i>primers</i>	28
4.2. Estrutura das populações.....	31
4.3. Análise de variância molecular.....	45
4.4. Abordagem bayesiana	45
4.5. Distância genética, agrupamento hierárquico e análise de coordenadas principais.....	48
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

SILVA, Tereza Aparecida. Universidade Estadual de Maringá, agosto de 2012. **Análise da diversidade e estrutura genética de variedades de milho pipoca utilizando marcadores microssatélites** Orientador: Carlos Alberto Scapim. Conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin, Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Ronald José Barth Pinto.

No presente estudo foram utilizados marcadores SSR para avaliar a diversidade genética e a estrutura de 31 genótipos de milho pipoca do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá. Foram testados 159 pares de *primers* SSR, mapeados para milho comum, dos quais 42 foram polimórficos. Destes, 30 foram selecionados para estudo das populações em questão. Com estes *primers*, foram identificados 127 alelos entre os 30 locos avaliados. O número de alelos por loco nos genótipos variou de 2 a 8, com um número médio de 4,23 alelos/loco. Considerando todos os genótipos, a média geral de locos polimórficos foi de 79,89%. O genótipo BOZM 260 apresentou polimorfismo para todos os 30 locos testados, razão pela qual pode ser recomendado para cruzamento com plantas que apresentem características agronômicas desejáveis, no sentido de ampliar a base genética de genótipos do milho pipoca. Os *primers* Umc 1549 e Umc1072 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, podendo, portanto, serem apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho pipoca. A heterozigosidade média observada variou entre 0,071 e 0,3, sendo o genótipo BOZM 260 o que apresentou maior proporção de plantas heterozigotas observadas (0,3). Esta variedade com maior heterozigosidade pode ser considerada promissora para seleção continuada de progênies. O método de Evanno et al. (2005) indicou que as 31 populações estão distribuídas em três grupos. O dendograma obtido pelo método UPGMA revelou que os genótipos TATU 2 e ARZM 05 083 apresentam menor similaridade genética em relação aos demais.

Palavras-chave: pipoca; *Zea mays* L.; SSR.

ABSTRACT

SILVA, Tereza Aparecida. Universidade Estadual de Maringá, august 2012. **Analysis of Genetic Diversity and Population Structures of Popcorn using Microsatellite Markers.** Advisers: Carlos Alberto Scapim. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin, Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Ronald José Barth Pinto.

Primers for SSR locos were used in the current research to evaluate genetic diversity and the structure of 31 popcorn genotype from germplasm bank of the State University of Maringá (Maringá, PR, Brazil). 159 pairs of SSR primers, mapped for common maize, were tested. It was found that 26.4% were polymorphs and 30 primers were selected to this study. 127 alleles were identified from these primers between 30 locos evaluated, the number of alleles per loco in the genotypes varied between 2 and 8, with 4.23 alleles/loco. Mean proportion of polymorphic locos in a set of 31 genotypes reached 79.89%, BOZM 260 showed polymorphism to all 30 locos -studied (100%). This genotype can be indicated to cross with plants which show agronomic characteristic wanted to expand the genetic base of popcorn genotype. The primers UMC1549 e UMC1072, showing polymorphism to every genotype, can be considered promising to detect polymorphism in popcorn genotypes. Mean heterozygosity varied between 0.071 and 0.3. The genotype BOZM 260 was the one with the highest proportion of heterozygous plants (0.3) can be considered promising to continued selection of progenies. Evanno et al. (2005) method indicated that the 31 populations are distributed in three groups. The UPGMA method showed that genotype TATU 2 and ARZM 05 083 has higher genetic dissimilarity in relation to the others.

Keywords: Popcorn; *Zea mays* L.; SSR.

1. INTRODUÇÃO

O milho é o único cereal nativo do Novo Mundo, tendo como centro de origem a América Central. Na época do descobrimento das Américas, o milho era o alimento base de todas as civilizações do continente. Das raças identificadas no mundo, praticamente todas tiveram sua origem direta ou indireta nos trabalhos pioneiros dessas civilizações pré-colombianas (CIB, 2011).

A maior parte da evolução ocorrida no rendimento da cultura, permitindo os altos rendimentos hoje obtidos pelos agricultores mais tecnificados, teve por base o milho híbrido de linhagens. A importância do método da hibridação no melhoramento do milho transcende a própria cultura, dados os fatos históricos, científicos e econômicos intimamente a ele associados. O milho encaixa-se entre as espécies para as quais a hibridação é recomendada como método adequado de melhoramento, devido à relativa facilidade de produção de sementes híbridas, tanto para pesquisa como comercialmente (Paterniani e Campos, 2005).

A proposição de vários pesquisadores envolvidos com o melhoramento de plantas é que, para um programa de melhoramento genético, um dos requisitos mais importantes é conhecer os genótipos disponíveis para programar de forma objetiva os cruzamentos mais promissores na geração de híbridos e/ou de novas variedades. Lima et al. (2000) consideram que o sucesso de um programa de melhoramento depende da indicação da população mais promissora para a extração de linhagens e da escolha de linhagens divergentes para a formação de híbridos. Esta proposição pode ser aplicada para o melhoramento de milho pipoca, por exemplo.

O milho pipoca é um alimento muito apreciado pelos brasileiros, principalmente nos momentos de lazer, movimentando um mercado de bilhões de dólares, anualmente (Rangel et al., 2007; Faria et al., 2008; Santos et al., 2008). Apesar do grande consumo, a recomendação de genótipos superiores de milho pipoca no país ainda é limitada.

No Brasil, o melhoramento do milho pipoca tem sido considerado um investimento importante para reduzir a importação de grãos e para desenvolver novas variedades adaptadas às diferentes regiões do país (Galvão et al., 2000; Ruffato et al., 2000; Scapim et al., 2002, 2006; Miranda et al., 2003; Seifert et al., 2006; Ricci et al., 2007; Cruz e Pereira Filho, 2008). Considerando as dimensões

continentais do Brasil, é indispensável um número relativamente grande de materiais selecionados para uma maior oferta de variedades e híbridos adaptados às diversas regiões do país, garantindo alta produtividade e qualidade aos agricultores de alta, média e baixa tecnologia (Vilarinho et al., 2003).

A identificação dos genitores para melhores combinações híbridas, de acordo com Hallauer e Miranda Filho (1988), é estabelecida segundo determinados grupos heteróticos. Por isso, os estudos sobre divergência genética têm sido de grande importância em programas de melhoramento envolvendo hibridações, pois orientam a seleção de genitores potencialmente promissores para gerar populações com elevada variabilidade e adaptação. Quando cruzados, esses genitores aumentam as chances de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes, permitindo aos melhoristas a concentração de esforços em um menor número de combinações híbridas obtidas a partir dos materiais mais divergentes (Fuzatto et al., 2002; Eckert, 2006; Rinaldi et al., 2007).

A caracterização genética de populações de milho pipoca destinadas ao melhoramento pode ser feita usando características agronômicas e/ou usando marcadores moleculares. A análise de locos *SSR* (*Simple Sequence Repeated*; Sequências Simples Repetidas de DNA genômico; Tautz, 1989, 1993) tem sido uma técnica de análise molecular considerada adequada para estimar a diversidade genética em genótipos de milho pipoca. Esta técnica tem sido aplicada para estimar a divergência genética entre linhagens de milho pipoca (Liu et al., 2003; Dandolini et al., 2008; Leal et al., 2010) ou entre genótipos de diferentes origens (Wu et al., 2004; Silva et al., 2009). As referidas investigações têm caracterizado basicamente a proporção de locos *SSR* polimórficos, o número de alelos por loco polimórfico e as distâncias genéticas (dissimilaridade) entre os genótipos analisados. Mais recentemente, Carvalho (2010) e Eloiet al. (2012) têm investigado a heterozigosidade observada e esperada dentro de populações de híbridos e de variedades de polinização aberta de milho pipoca.

Apesar dos trabalhos acima citados, o número de investigações que procuram caracterizar a diversidade genética de milho pipoca no Brasil ainda pode ser considerado restrito frente ao número de variedades potencialmente disponíveis para serem usadas pelos programas de melhoramento. A proposta do presente estudo é analisar locos *SSR* em 31 genótipos de milho pipoca mantidos no banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, com o objetivo de: a) selecionar

e relacionar os locos *SSR* promissores para estimativas de diversidade genética; b) analisar a estrutura das populações; e c) analisar a variabilidade genética das populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação botânica e características do milho pipoca

O milho é uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zeamays*. É um cereal essencialmente americano, pois é neste continente que se encontram seus parentes mais próximos: teosintee *Tripsacum*. Fora das Américas, não existem fósseis nem evidências escritas, históricas ou pictóricas sobre o milho. As evidências indicam que o milho foi domesticado entre 8.000 e 10.000 anos atrás, tornando-se o principal cultivo de astecas, maias e incas (Paterniani e Campos, 2005).

As plantas de milho pipoca são anuais, monóicas, apresentando flores masculinas dispostas em panículas apicais e flores femininas em espigas laterais, tratando-se de uma espécie alógama (Zinsly e Machado, 1987). O sistema radicular contém raízes primárias e adventícias. O caule é cilíndrico, tipo colmo com nós e entrenós mais curtos na base. As folhas são lanceoladas e alternadas, com limbo e bainha. Na inflorescência masculina o pendão é constituído de um eixo central com ramificações e espiguetas (Moll et al., 1965; Geraldi et al., 1985). Cada estilo-estigma da espiga, quando fecundado, dá origem a uma semente (Paterniani e Campos, 2005).

A semente do milho é o fruto e este fruto é seco e indeiscente. A semente é envolvida pelo pericarpo, podendo apresentar diversas colorações e ser de espessura variável. A função do pericarpo é proteger o interior da semente, dificultando o ataque de patógenos (Oliveira, 1984).

Muito energético, o milho traz em sua composição vitaminas do complexo B, vitamina A, proteínas, gorduras, carboidratos, cálcio, ferro, fósforo e amido, além de ser rico em fibras. Cada 100 gramas do alimento têm cerca de 360 Kcal, sendo 70% de glicídios, 10% de protídeos e 4,5% de lipídios (CIB, 2011).

A espécie *Zea mays* L. é altamente politépica, com grande variabilidade genética. Com relação ao tipo de endosperma, por exemplo, quase 40% dos milhos são amiláceos, cerca de 30% têm grãos duros cristalinos, pouco mais de 20% são dentados, aproximadamente 10% são classificados como milho pipoca e 3% como milho doce (Paterniani e Campos, 2005).

O milho pipoca caracteriza-se por possuir sementes pequenas e duras que estouram sob a ação do calor. Isso o torna diferente do milho comum, ainda que ambos pertençam à mesma espécie (Zinsly e Machado, 1987; Sawazaki, 2001a). Tem-se conhecimento de que o grão duro também pode estourar, porém em menor expansão quando comparado ao milho pipoca, além de não apresentar maciez e sabor em nível desejado (Goodman, 1980).

O tamanho das sementes do milho pipoca, quando comparado ao milho comum, é bastante reduzido. Em geral, suas variedades caracterizam-se por apresentar uma planta mais frágil, menor, de colmo mais fino e com menor número de folhas. Em relação ao milho comum, o milho pipoca tem maior prolificidade, maior susceptibilidade ao acamamento, quebramento, doenças e, conseqüentemente, menor rendimento de grãos (Zinsly e Machado, 1987). Provavelmente, a maior diferença seja a forma e o tamanho dos grãos, pois são menores e mais duros que o milho comum e apresentam maior proporção de endosperma duro em relação ao endosperma macio, características essenciais da pipoca (Ziegler e Ashman, 1994). A variabilidade nos grãos entre variedades é grande, tanto em coloração como na forma e tamanho. As cores branca e amarela são as mais comuns (Zinsly e Machado, 1987).

A capacidade de expansão do milho pipoca é explicada pela resistência do pericarpo, associada à presença de óleo e umidade no grão. Quando aquecido em temperatura apropriada, o óleo e a umidade exercem pressão sobre o pericarpo, até que se rompa, expondo o endosperma (Zinsly e Machado, 1987). O sucesso da exposição do endosperma depende da integridade do pericarpo, uma vez que essa estrutura deve suportar uma elevada pressão interna, na semente, até atingir a temperatura de expansão da pipoca (cerca de 180°C). Caso o pericarpo esteja trincado ou rompido, a pressão ideal poderá não ser atingida e, conseqüentemente, a pipoca não se expandirá totalmente (Luz, 2005). Silva et al. (1993) observaram correlação positiva entre a capacidade de expansão e a espessura do pericarpo.

Analisando a difusividade térmica e a capacidade de expansão, os maiores valores de difusividade térmica e condutividade sugeriram que o pericarpo do milho pipoca é estruturalmente mais organizado que o pericarpo de milho comum. A maior resistência mecânica do pericarpo do milho pipoca (aproximadamente quatro vezes maior que o pericarpo de milho comum) torna possível sustentar maior pressão, privilegiando o alto valor de expansão.

O milho pipoca, depois de estourado, oferece características de maciez e sabor que, associadas à sua capacidade de expansão, justificam a sua utilização. Assim, uma variedade poderá ser comercializada quando apresentar uma capacidade de expansão superior a 15 (Zinsly e Machado, 1987). Segundo Matta e Viana (2001), uma população com CE menor que 28 mL.g^{-1} é considerada pobre, entre 28 e 30 mL.g^{-1} é boa; entre 30 e 35 mL.g^{-1} é muito boa; e acima de 35 mL.g^{-1} caracteriza-se por excelente. Quanto maior for o valor da capacidade de expansão maior o valor comercial da cultivar, pois essa característica está intimamente relacionada à maciez da pipoca (Zinsly e Machado, 1980; Sawazaki, 2001a).

A capacidade de expansão (CE) é calculada pela relação entre o volume de pipoca obtido e o volume de grãos utilizados (Ruffato et al., 2000). A expansão é a principal característica considerada na avaliação da qualidade do milho pipoca (Ruffato et al., 2000; Miranda et al., 2003; Seifert et al., 2006).

A CE do milho pipoca está condicionada tanto a fatores genéticos quanto a não-genéticos, como as condições de desenvolvimento em campo, de colheita e do pré-processamento (Ruffato et al., 2000). As estimativas da herdabilidade da CE variam de 50% a 90% (Alexander e Greech, 1977).

A umidade da semente é um dos fatores que mais influenciam a capacidade de expansão. A umidade associada à máxima CE depende da população e do método adotado para a sua determinação (Luz, 2005). Para Sawazaki (2001b), a umidade ideal dos grãos para a comercialização deve estar em torno de 13,5%, o que proporciona alta CE. Quanto à secagem, processos rápidos e com altas temperaturas causam o trincamento do endosperma, depreciando a qualidade e CE da pipoca. Portanto, os processos de secagem lenta com baixas temperaturas ($< 35^{\circ}\text{C}$) são mais indicados.

O armazenamento dos grãos é outro fator importante para a qualidade da pipoca. A armazenagem realizada após a secagem contribui para uniformizar a umidade dos grãos, proporcionando maior CE. Assim, a temperatura e a umidade relativa do ambiente (silo ou armazém) devem ser em torno de 23°C e 75%, respectivamente. Zinsly e Machado (1987) ressaltaram que, ao contrário da perda de poder germinativo após dois ou três anos de armazenamento, a capacidade de expansão sob condições favoráveis de armazenamento é mantida por um período de 20 a 25 anos.

Outro aspecto relacionado à qualidade da pipoca é o pericarpo quebradiço da pipoca estourada. Esse aspecto proporciona menores resíduos de casca após a ingestão. Para a agroindústria, a produtividade de grãos e outras características correlacionadas são secundárias em relação à qualidade e à quantidade da pipoca (Miranda et al., 2003).

2.2. Origem e evolução do milho pipoca

Existem diversas hipóteses quanto à origem do milho. Para Weatherwax (1935) e Randolph (1955), o milho, o teosinte e o *Tripsacum* se originaram de um ancestral comum, mas evoluíram em linhas diferentes. Mangelsdorf e Reeves (1939), baseando-se em características morfológicas, consideraram que o teosinte poderia ser o resultado da hibridação entre milho e *Tripsacum*. Goodman (1980) relata outra hipótese apresentada por Mangelsdorf, em 1974, a de que o teosinte poderia ter sido originado do milho.

As hipóteses mais aceitáveis são: o progenitor do milho atual é um ancestral silvestre do milho da América do Sul, já extinto (Mangelsdorf e Galinat, 1964); o milho tem como ancestral uma gramínea silvestre, originária do México e da Guatemala, denominada Teosinte [*Z. mexicana* (Schard.) *kuntze*], pois atualmente o milho e o teosinte pertencem ao mesmo gênero chamado *Zea* (Reevis e Mangelsdorf, 1942); a maior fonte de divergência entre as variedades modernas de milho é devida à introgressão de germoplasma de *Tripsacum*. Beadle (1939) acredita ser o teosinte o progenitor do milho moderno. Segundo Bennetzen et al. (2001), a teoria do teosinte como ancestral do milho moderno tem sido a mais aceita, pois existem evidências arqueológicas (Piperno e Flannery, 2001) e moleculares (Doebley, 1990; Matsuoka et al., 2002) de que o milho moderno foi domesticado a partir do teosinte.

A proposta de que o teosinte fosse o único progenitor do milho é conhecida como “hipótese do teosinte”. O milho e o teosinte exibem extremas diferenças na sua morfologia adulta, tanto é que taxonomistas inicialmente consideraram o teosinte mais fortemente relacionado com o arroz que com o milho. Porém, segmentos do genoma do teosinte e do milho são tão similares que eles apresentam o mesmo número de cromossomos (com exceção do teosinte tetraplóide), ou morfologia idêntica dos cromossomos, além de serem facilmente cruzados. Híbridos F₁ entre milho e alguns tipos de teosinte exibem meiose completamente normal e completa

fertilidade (Doebley, 2004). Além disso, o cruzamento entre teosinte e milho pode ocorrer livremente (Almeida, 2003). Estudos recentes comprovam que a subespécie do teosinte mais intimamente relacionada com o milho é *Z. mays parviglumis* (Doebley et al., 1984; Buckler e Holtsford, 1996; Freitas, 2001).

O milho tem provável origem tetraplóide. Uma contemporânea divergência do genoma ancestral do sorgo e dois genomas progenitores do milho ocorreu há cerca de 11,9 milhões de anos atrás. O ancestral dos três genomas era supostamente haplóide 5 (n=5). A tetraploidização deve ter ocorrido há cerca de 4,8 milhões de anos e precedeu a expansão do genoma do milho. O genoma do milho é repleto de duplicações cromossômicas e esta duplicação em larga escala poderia ter resultado de duplicação segmentar ou de todo o genoma por autotetraploidia ou alotetraploidia (Swigonová et al., 2004). Gaut e Doebley (1997) sugerem que o milho seja um alotetraplóide segmentar.

Ao longo do tempo, o homem promoveu uma crescente domesticação do milho por meio da seleção visual no campo, considerando importantes características, tais como produtividade, resistência a doenças e capacidade de adaptação, entre outras, dando origem às variedades hoje conhecidas. Inicialmente, os grãos eram expostos fora da casca, formando um sabugo, parecido com a forma que conhecemos atualmente. Essa estrutura, que reteve os grãos e os organizou em pequenos pares de fileiras, atraiu os nativos antecessores dos astecas. Mais tarde, esses nativos, por meio de um processo inconsciente de seleção, escolhiam as espigas mais fáceis de serem colhidas e armazenadas. Isso levou, naturalmente, à redução do número de espigas por planta e ao aumento do número de fileiras de grãos no comprimento das espigas, que se tornaram maiores. Com o tempo, eram colhidas as plantas mais vigorosas, produtivas e de maior qualidade. A domesticação do milho, realizada por indígenas americanos, foi tão intensa que o milho atualmente não sobrevive no campo sem a participação do homem (CIB, 2011).

Segundo Doebley (2004), a domesticação é uma porção de um conjunto gênico da espécie silvestre, utilizada para “criar” uma nova espécie. O tamanho da população, durante a domesticação, poderia causar uma redução na diversidade genética na cultura relativa ao genitor. Para o milho, resultados isoenzimáticos indicam uma perda de aproximadamente 25% de genes encontrados em *Z. mays parviglumis*.

A origem do milho pipoca confunde-se com a dos demais tipos de milho e também é objeto de hipóteses. Erwin (1949) considera este milho originário de uma mutação do milho de endosperma duro (*flint*). Kantety et al. (1995), utilizando como ferramenta os marcadores moleculares ISSR, confirmam esta hipótese: o milho pipoca adveio do milho comum do tipo duro, pois estes marcadores revelaram maior proximidade genética entre essas formas de milho em relação ao tipo dentado.

Ziegler e Ashman (1994) consideram improváveis as ideias defendidas por Erwin (1949) e Kantety et al. (1995), devido às evidências arqueológicas e ao caráter poligênico da “pipocabilidade” (potencial do grão para estourar quando aquecido). Um dos mais primitivos exemplares de milho, descoberto em Bat Cave, Novo México, data de 2.500 a.C., era milho pipoca. Em certas tumbas peruanas pré-históricas havia utensílios de barro supostamente utilizados para o preparo de pipoca, junto com sementes do milho pipoca (Zinsly e Machado, 1987). Outros autores mencionados por Mangelsdorf (1974) sugeriram que a origem seja partir de hibridação intergenérica *Euchalena* x *Zea*. Ambas as hipóteses geram controvérsias, não sendo passíveis de aceitação. Segundo Zinly e Machado (1987), a evolução teria ocorrido no sentido do milho pipoca para os demais tipos de milho, mas, apesar das incertezas das hipóteses, as descobertas arqueológicas apontam para o seu importante papel no desenvolvimento pré-histórico do milho no continente, sendo sua participação essencial para o desenvolvimento (Pereira, 2004) e a formação do patrimônio genético atual da espécie *Zea mays* (Zinly e Machado, 1987).

2.3. Melhoramento genético do milho pipoca

O interesse na produção deste cereal vem crescendo a cada ano, devido à importância do milho nos variados âmbitos da alimentação,. A possibilidade de utilização de praticamente todas as partes da planta para fins alimentícios diretos ou indiretos faz do milho um dos cereais mais versáteis em termos de aproveitamento e diversidade de produtos (Laborda, 2003).

Além da sua importância econômica como principal componente na alimentação de aves, suínos e bovinos de leite, o milho cumpre papel técnico importante para a viabilidade de outras culturas, como a soja e o algodão. Por meio da rotação de culturas, minimiza possíveis problemas, como nematóide de galha, nematóide de cisto e doenças, como o mofo branco e outras, dando sustentabilidade

para diferentes sistemas de produção em muitas regiões agrícolas do Brasil e do mundo (CIB, 2011).

O primeiro esquema para a produção de sementes híbridas de milho foi criado pelo botânico e geneticista norte americano George Harrison Shull em 1909. Ele mostrou que, ao fecundar a planta com o próprio pólen, eram produzidos descendentes menos vigorosos. Repetindo o processo nas seis ou oito gerações seguintes, os descendentes fixavam características agrônômicas e econômicas importantes. Por meio da seleção, esses descendentes tornavam-se semelhantes. As plantas que geravam filhos geneticamente semelhantes e também iguais às mães passaram a ser chamadas de linhas puras. Shull notou que duas linhas puras diferentes ao serem cruzadas entre si produziam descendentes com grande vigor, chamado de vigor híbrido ou heterose, dando origem ao milho híbrido (CIB, 2011).

O sistema de cruzamentos para obtenção de híbridos duplos, de acordo com Meireles (2009), foi proposto por Jones, em 1922, uma vez que os híbridos simples não foram prontamente aceitos pelos agricultores. Mais tarde, com a evolução tecnológica e cultural dos agricultores americanos, os híbridos triplos e simples começaram a ser aceitos e hoje praticamente 100% da semente de milho comercializada naquele país provém de híbridos simples. No Brasil esse tipo de mudança está em curso e os híbridos simples estão ganhando espaço na faixa de agricultores de alta tecnologia. Os híbridos duplos estão diminuindo no mercado de sementes, sendo utilizados principalmente pela faixa de média tecnologia, e os híbridos triplos dominam a faixa de média/alta tecnologia.

O conhecimento a respeito dos híbridos permitiu que os programas de melhoramento conseguissem introduzir novas características ao milho, como resistência a doenças e pragas, maior proteção dos grãos por meio do melhor empalhamento, maior resposta às práticas de manejo, melhor qualidade nutricional e menor tombamento e quebramento de plantas. Esse conjunto de melhorias, para o qual a participação de pesquisadores brasileiros foi de extrema importância, fez com que o milho se adaptasse a diferentes regiões, condições de clima, solos e finalidades de uso (CIB, 2011).

O primeiro híbrido comercial de milho pipoca foi obtido em 1934, em Minnesota, como resultado do cruzamento entre duas linhas puras, derivadas do grupo heterótico *Japanese Hulless*. A partir de 1940, as variedades começaram a ser substituídas pelos híbridos (Santacruz-Varela et al., 2004).

A cultura do milho pipoca no Brasil vem recebendo maior atenção pelos melhoristas e produtores devido ao aumento de consumo, principalmente em razão da chegada de milho pipoca importado dos Estados Unidos para uso em fornos de micro-ondas. Como o mercado de produtos agrícolas é um fator determinante nos rumos da agricultura, seu cultivo tende a expandir-se ainda mais em razão desse crescente consumo (Matta e Viana, 2001).

O consumo nacional de milho pipoca estava em torno de 80 mil toneladas em 2001. Deste total, 75% correspondia ao milho pipoca americano, importado principalmente da Argentina (Sawazaki, 2001a). Em 2003, o consumo era de 65 a 70 mil toneladas e as importações 30%. Em 2004/2005, houve uma nova redução na importação para cerca de 20 mil toneladas (Freitas Júnior et al., 2009).

O mercado de milho pipoca tem passado por diversas mudanças nos últimos anos (Luz, 2005). A primeira mudança foi a introdução do sistema de parceria entre produtores e empresas empacotadoras. Tais empresas fornecem as sementes e garantem a compra do produto, desde que o mesmo alcance determinado padrão de qualidade. Desta forma, houve uma grande redução da dependência de sementes importadas. Outro fator que também contribuiu para a redução da importação foi o lançamento comercial do híbrido simples modificado IAC-112.

A parceria entre produtores e empresas empacotadoras tem crescido no país; A empresa escolhe a região onde será plantado o material, disponibiliza sementes e tecnologia aos produtores, aumentando, assim, a produtividade e reduzindo os custos de produção. Na safra de 2003, por exemplo, os melhores produtores colheram de 50 a 60 sacas por hectare e a empresa pagou R\$55,00 por saca aos produtores, com custo de produção de R\$800,00 ha⁻¹ (Santos et al., 2007).

Um dos maiores problemas enfrentados pelos produtores de milho pipoca é a falta de opção devida à escassez, no mercado, de cultivares que reúnam boas características agronômicas e um alto índice de expansão (Seifert et al., 2006). O uso de híbridos americanos ou de gerações avançadas é de alto risco, pois requer a orientação de técnicos experientes com a cultura. Esse risco decorre da maior suscetibilidade do milho pipoca a doenças e pragas, acamamento e quebramento do colmo e podridão de grãos, além de um cuidado especial na colheita e secagem dos grãos para evitar danos no pericarpo e endosperma (Sawazaki, 2001a).

Apesar da existência de poucas cultivares brasileiras, o programa de melhoramento de milho pipoca no Brasil não é uma atividade recente. Iniciou-se, em

1932, no Instituto Agrônomo de Campinas-IAC (Krug et al., 1943). A primeira variedade nacional foi liberada em 1947 e foi derivada de ciclos de seleção em massa, originada a partir da população americana *South American Muschroom* (SAM). Somente em 1988, houve a liberação do híbrido simples modificado IAC-112 e quase simultaneamente a liberação do híbrido triplo Zélia, comercializado pela *Pioneer* (Rangel et al., 2008).

Como o número reduzido de cultivares é limitante à expansão da cultura no Brasil, é necessário que novos programas de melhoramento sejam iniciados por empresas públicas ou privadas (Scapim et al., 2002). O valor comercial do milho pipoca é maior que do milho normal, o que justifica, inclusive, a aplicação de recursos federais nos programas de melhoramento vegetal (Sawazaki, 2001a).

A possibilidade de total mecanização e a ausência de controle de preço pelo governo fazem com que o valor comercial do milho pipoca seja, no mínimo, três vezes superior ao do milho comum (Machado, 1997).

Na safra 2002/2003, das 206 cultivares de milho então disponíveis no mercado, apenas duas eram de milho pipoca, RS 20 e Zélia. Na safra de 2008/2009, das 302 cultivares disponíveis no mercado, apenas quatro eram do tipo pipoca, IAC-112, IAC-125, RS 20 e UFVM2 Barão de Viçosa (Cruz e Pereira Filho, 2008; Conab, 2009).

No melhoramento do milho pipoca, devem ser levados em consideração não só a produtividade e os caracteres agrônômicos como também aspectos relacionados à qualidade da pipoca, como textura e maciez. Ao agricultor interessa produtividade elevada e os demais atributos do milho normal; o consumidor busca na pipoca alta capacidade de expansão, melhor textura e maciez (Vendruscolo et al., 2001; Scapim et al., 2002).

O milho pipoca apresenta algumas dificuldades adicionais no trabalho de melhoramento, quando comparado ao milho comum (Zinsly e Machado, 1987). Exemplificando, a capacidade de expansão é negativamente correlacionada à produtividade. Ao melhorista cabe a tarefa de contornar o problema, oferecendo um produto intermediário que satisfaça aos produtores e aos consumidores. Deve ser destacado que a correlação negativa entre as duas principais características de interesse econômico dificulta o melhoramento, mas não o impossibilita (Granate et al., 2002).

No melhoramento de milho pipoca, diferentes germoplasmas têm sido utilizados para aumentar o valor das características de interesse comercial. Em países de clima temperado, têm-se utilizado cruzamentos do milho pipoca com milho duro, seguidos por seleção exclusivamente voltada ao aumento da capacidade de expansão. Além desses cruzamentos, também são realizados retrocruzamentos sucessivos do milho pipoca com linhagens elite de milho comum (Miranda et al., 2003).

Apesar das diferenças fenotípicas entre o milho pipoca e o milho comum, a maioria dos métodos de melhoramento aplicáveis ao milho comum pode ser utilizado para o milho pipoca. Isso significa que, no melhoramento de milho pipoca, são também empregados os métodos intra e interpopulacionais, bem como os métodos de obtenção de híbridos (Zinsly e Machado, 1987). Assim, o melhoramento genético do milho possui duas alternativas que podem ser conduzidas de forma conjunta: a obtenção de populações melhoradas e a obtenção de híbridos (Vilarinho et al., 2003). Segundo Rangel (2006), trabalhos baseados no melhoramento intrapopulacional e no desenvolvimento de híbridos de linhagens de milho pipoca vêm sendo desenvolvidos em São Paulo (ESALQ), Rio Grande do Sul (UFRGS), Minas Gerais (UFV, UFLA), Rio de Janeiro (UENF) e Paraná (UEM, UEL), além do Instituto Agrônomo de Campinas e do Centro Nacional de Milho e Sorgo da EMBRAPA.

Um exemplo de material melhorado é a variedade de milho pipoca BRS Angela, selecionada pela Embrapa - Milho e Sorgo. Essa variedade apresenta alta produtividade de grãos, estabilidade de produção e bom índice de capacidade de expansão, 28 mL.g^{-1} . Porém, a cor do grão é branca, o que não tem boa aceitação comercial (Embrapa Milho e Sorgo, 2009).

Outros exemplos a serem citados são os híbridos Jade e Zélia, desenvolvidos pela Pioneer. Ambos possuem elevado potencial produtivo, maciez e boa aceitação no mercado. O híbrido Jade possui capacidade de expansão igual a 28 mL.g^{-1} e o Zélia capacidade de expansão igual a 35 mL.g^{-1} (Pioneer, 2009).

2.3.1. Diversidade genética e heterose

Segundo Borém e Miranda (2005), heterose ou vigor híbrido é o aumento do vigor, da altura da planta, do conteúdo de carboidratos, da produtividade e da intensidade de outros fenômenos fisiológicos, decorrentes do cruzamento entre

indivíduos contrastantes. Do ponto de vista acadêmico, o híbrido expressa heterose quando é superior aos seus genitores; do ponto de vista comercial, o híbrido expressa heterose quando é superior ao melhor genitor.

Pacheco et al. (2000), avaliando o efeito econômico na substituição de variedade por milho híbrido, na região central do Brasil, verificaram que, na média dos híbridos e variedades, os híbridos simples foram os mais produtivos, independentemente do ambiente.

É necessário, para desenvolver um híbrido, obter as linhagens por meio de sucessivas autofecundações, seja de um composto, população não melhorada ou mesmo de um híbrido. Após, em média seis autofecundações, é obtida uma nova linhagem, onde os indivíduos são uniformes com características fixadas dentro da linha. A seguir, essas linhagens são cruzadas em diversas combinações e os híbridos superiores podem ser lançados como produto comercial. Os cruzamentos entre linhagens de diferentes grupos gênicos são preferidos, uma vez que, em geral, produzem híbridos superiores aos gerados com o cruzamento entre linhagens do mesmo grupo heterótico. (Hallauer e Miranda Filho, 1988; Borém e Miranda, 2005; Paterniani e Campos, 2005; Ortiz et al., 2008).

A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos são etapas de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento (Borém e Miranda, 2005). Para a escolha dos genitores, é de fundamental importância a predição da heterose. Desenvolver e selecionar linhagens com base na performance "*per se*" não é um processo muito difícil, mas é bastante demorado. Também não é possível prever a performance do híbrido a partir da performance parental, devido ao alto efeito de dominância para algumas características de interesse, por exemplo, para a produção de grãos (Shieh e Thseng, 2002).

Os métodos de cruzamentos dialélicos são muito usados para predição de médias e um melhor conhecimento sobre a capacidade de combinação de genótipos de milho, mas, nesses cruzamentos, com o desenvolvimento de n linhagens, é possível formar $n*(n-1)/2$ híbridos simples, que serão avaliados em diversos experimentos e em vários ambientes (Hallauer e Miranda Filho, 1988).

Dois tipos de habilidade de combinação podem ser distinguidos. A capacidade geral de combinação (CGC) refere-se à habilidade de um genótipo produzir progênes com dado comportamento, quando cruzado com uma série de outros genitores. A capacidade específica de combinação (CEC) refere-se ao

comportamento de uma combinação específica, que pode se desviar do comportamento esperado, com base na CGC. Os conceitos da CGC e CEC são úteis na caracterização das linhagens em cruzamentos. A CGC está associada principalmente a genes de efeito aditivo e a CEC depende basicamente de genes de efeito não aditivo (dominância e epistasia). Os cruzamentos dialélicos têm sido muito usados no melhoramento de milho e se mostraram eficientes para detectar divergências genéticas entre as linhagens e alocar estas em grupos heteróticos distintos (Hallauer, 1990; Borém e Miranda, 2005). Entretanto, com um número considerável de linhagens, o processo fica caro, demorado e trabalhoso (Smith, 1986; Hallauer e Miranda Filho, 1988). De fato, um dos maiores entraves à exploração comercial da heterose está na avaliação da capacidade combinatória das linhagens (Serafini et al., 2001).

Xiao et al. (1996) consideram que seria interessante, se fosse possível, desenvolver um método simples, eficiente, com baixo custo e viável tecnicamente, para prever a heterose antes dos testes de campo, permitindo investimentos em cruzamentos promissores “*a posteriori*” e reduzindo os trabalhos de polinização e o tamanho dos experimentos de campo.

A análise de divergência genética pode ser uma resposta para o problema proposto por Xiao et al. (1996). Ela é muito utilizada pelos melhoristas de milho para a seleção de parentais. Como a divergência genética pode estar associada à heterose, sua análise pode ser útil para a predição preliminar de cruzamentos que otimizem a heterose. Esse enfoque visa selecionar os materiais mais promissores, diminuindo os gastos e o tempo necessário para a realização de várias combinações híbridas, muitas vezes desnecessárias. Os esforços são concentrados nas combinações entre os materiais mais divergentes (Miranda et al., 2003; Rinaldi et al., 2007).

A diversidade genética do germoplasma pode ser caracterizada em nível molecular. Esta caracterização permite a identificação de grupos heteróticos, fornecendo dados úteis para auxiliar o melhorista na identificação e na seleção dos genitores para estabelecer o programa de melhoramento (Pinheiro, 2003). Como o mecanismo genético da heterose ainda não está bem entendido, os estudos revelam que cruzamentos entre genótipos geneticamente divergentes proporcionam grande vigor em relação aos cruzamentos entre indivíduos semelhantes geneticamente (Hallauer, 1999).

A aplicação da Biotecnologia no desenvolvimento de novas cultivares é uma grande aliada do melhoramento genético, propiciando benefícios diretos a agricultores e consumidores. Pela sua importância na economia mundial, o milho já foi objeto de estudo de destacados cientistas, resultando em milhares de trabalhos científicos. Atualmente, é um dos principais temas pesquisados pela Genética e Biotecnologia (CIB, 2011).

2.3.2. Uso de marcadores moleculares para estimar a diversidade genética

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

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

Um marcador molecular pode ser definido, segundo Agarwall et al. (2008), como sendo um segmento particular de DNA, que pode ser usado para comparar e representar diferenças em nível genômico. Esses marcadores podem ou não ser correlacionados com a expressão fenotípica de uma característica, além de oferecerem numerosas vantagens em relação às alternativas convencionais baseadas no fenótipo, uma vez que são estáveis e detectados em todos os tecidos, independentemente do estágio fisiológico do organismo (crescimento, diferenciação, desenvolvimento) ou estágios de defesa da célula. Portanto, não são confundidos com efeitos ambientais, pleiotrópicos ou epistáticos.

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para a

avaliação da diversidade genética, com aplicações filogenéticas e evolutivas (Dias, 1998).

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

Durante a avaliação de genótipos por meio dos marcadores moleculares, a presença de bandas comuns a todos sugere a ocorrência de semelhanças genéticas entre tais genótipos. Obviamente, a presença de bandas não comuns aos materiais analisados é um indício de diferenças genéticas entre os mesmos (Dias, 1998). Uma vez obtidas as estimativas de distância genética, os resultados são codificados de forma a gerar uma matriz de similaridade que pode ser graficamente interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada (Santana e Malinovski, 2002; Guimarães e Moreira, 2005).

A análise de agrupamento tem por finalidade reunir, por algum critério de classificação, as unidades amostrais em grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos (Cruz e Regazzi, 2001).

As técnicas de agrupamento podem ser classificadas em hierárquicas e não-hierárquicas. A técnica hierárquica consiste em uma série de sucessivos agrupamentos, nos quais os elementos são agregados; ou sucessivas divisões, nas quais os elementos são desagregados.

A técnica não-hierárquica foi desenvolvida para agrupar elementos em K grupos, em que K é a quantidade de grupos definida previamente (Albuquerque et al., 2006).

Uma vantagem significativa dos métodos hierárquicos é a de possibilitar a visualização do resultado da classificação por meio de um dendograma, que ilustra de forma hierárquica o grau de semelhança entre os agrupamentos formados por fusões (ou divisões) em cada estágio sucessivo da análise, no qual um eixo

representa os indivíduos e o outro representa as distâncias obtidas após a utilização de uma metodologia de agrupamento (Gonçalves et al., 2008; Faria, 2009).

Segundo Cruz e Regazzi (2001), há várias formas de representar esta estrutura de agrupamento, tais como: o método do vizinho mais próximo, método do vizinho mais distante, método UPGMA, método de Ward, entre outros. O método mais comumente usado é o agrupamento pareado não ponderado, baseado na média aritmética (UPGMA), que realiza os cálculos dos valores médios das variáveis e atribui sempre o mesmo peso aos dois elementos que estão sendo integrados (Faria, 2009). Segundo Dudley (1994), para aplicações relacionadas ao melhoramento genético, o método UPGMA pode ser considerado superior aos métodos do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante.

A análise do dendograma permite observar a separação dos materiais em grupos heteróticos (Pinto et al., 2001). Desta forma, os marcadores moleculares podem ser usados para a obtenção de inferências sobre o potencial heterótico interpopulacional, contribuindo para a seleção das populações que poderão ser utilizadas, tanto para o seu melhoramento *per se* como para o desenvolvimento de híbridos a partir da condução de métodos interpopulacionais, particularmente os de seleção recorrente recíproca, capitalizando os efeitos aditivos e de dominância (Borém e Miranda, 2005; Paterniani e Campos, 2005).

Os métodos de seleção recorrente recíproca visam a melhorar duas populações simultaneamente, por meio de modificações de suas frequências gênicas, resguardada a individualidade de cada uma. Na medida em que uma população é utilizada como testadora da outra, tais métodos conferem muitas vezes um aumento na resposta heterótica entre ambas, tanto em híbridos interpopulacionais como em linhas puras. Desta forma, aumenta a probabilidade de obtenção de linhagens que, intercruzadas, constituem híbridos superiores em rendimento e outros atributos de interesse agrônômico (Borém e Miranda, 2005; Paterniani e Campos, 2005; Pinto, 2009).

2.3.2.1. Marcadores microssatélites

A técnica de marcadores microssatélites ou SSR (*Sequências Simples Repetidas*) é uma das alternativas mais utilizadas atualmente e consiste na análise de segmentos de sequência repetida de DNA, amplificados com o uso de pares de *primers* específicos. Tais segmentos encontram-se distribuídos aleatoriamente no

genoma (Padilha et al., 2003). Para a amplificação de regiões repetitivas do tipo microssatélite, é necessário utilizar um par de *primers* específicos, que possua homologia com uma região única no genoma e que flanqueie uma sequência contendo no máximo seis pares de bases que se repetem um determinado número de vezes, em '*tandem*'. O número de repetições pode variar, dependendo do indivíduo (Freitas, 2005).

A técnica de microssatélites é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, sendo ainda facilmente automatizada. Esses marcadores possuem características de multialelismo e codominância, apresentando um elevado conteúdo de informação genética por loco. A característica de codominância permite que sejam detectadas as diferentes contribuições parentais nas progênes. Outra vantagem dos microssatélites é que eles requerem uma pequena quantidade de DNA, sendo, portanto, extraídos de qualquer material biológico, como sementes ou plântulas em diferentes fases do desenvolvimento, permitindo uma avaliação precoce e eficiente (Padilha et al., 2003; Guimarães e Moreira, 2005).

Os microssatélites também podem ser usados durante o processo de introgressão de genes. Neste programa, o híbrido F₁ é retrocruzado repetidamente ao parental receptor, com o objetivo de restaurar o seu genoma com o traço introgridido incluído nele. O número de retrocruzamento neste programa pode ser reduzido com o uso dos microssatélites (Gupta et al., 1996).

Outra característica importante dos microssatélites é serem herdados de forma Mendeliana e sua hipervariabilidade os tornam marcadores importantes para o mapeamento genético, tanto de monogenes como de locos para caracteres quantitativos (*Quantitative Trait Loci*; QTLs), sendo altamente eficientes em espécies com pouco polimorfismo intraespecífico, como é o caso da maioria das espécies autógamas (Röder et al., 1995).

A maior limitação do método de análise dos locos SSR é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam as repetições. Para a obtenção destes *primers* há a necessidade do desenvolvimento prévio desses marcadores, o que requer infraestrutura especializada de laboratório, pois é necessário a construção de bibliotecas genômicas, sequenciamento de DNA em larga escala, grande quantidade de trabalho envolvendo pessoal especializado, aliado ao alto custo de um empreendimento desta natureza (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Chin et al., 1996).

Uma vez obtidos os *primers* para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, aumentando a acessibilidade da técnica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Para a avaliação da variabilidade e distância genética, foram utilizadas 15 plantas de 31 genótipos de milho pipoca, totalizando 465 amostras (Quadro 1).

Quadro1- Genótipos de milho pipoca avaliados

Genótipo	Dias para florecimento	Peso de 100 sementes (g)	Pericarpo	Cariopse		Procedência
				Endosperma		
1- CHZM 13 0134	50	11,09	marrom	AM/AL *		CIMMYT
2- ARZM 13 050	63	16,22	Incolor	Branco e Amarelo		CIMMYT
3- URUG 298	59	7,83	Vermelha	Laranja		CIMMYT
4- ARZM 05 083	76	9,76	Incolor	Branca		CIMMYT
5- PARA 172	69	12,14	Incolor	Branco e Amarelo		CIMMYT
6-ARZM 07 049	70	16,47	Incolor	Laranja		CIMMYT
7- BOZM 260	61	12,86	Incolor	Branco		CIMMYT
8- BOYA 462	82	16,54	Incolor	Incolor e Preto/roxa		CIMMYT
9- IAC-125	-	15,00	Incolor	Laranja		IAC
10- IAC-112	-	13,30	Incolor	Laranja		IAC
11- JADE	-	17,83	Incolor	Laranja		Pioneer Hi-bred
12- Zélia	-	13,72	Incolor	Laranja		Pioneer Hi-bred
13- ARGENTINA	-	-	Incolor	AM/AL *		UEM
14- SE 013	-	-	Incolor	Branco e Amarelo		UEM
15- Viçosa	62	14,64	Amarela	Laranja		UFV
16- RS-20	59	10,75	Incolor	Laranja		Ipagro/Agroeste
17- BEIJA-FLOR	56	15,69	Incolor	Laranja		UFV
18- UNB-2U C1	59	14,77	Incolor	Laranja		UENF
19- UNB-2U C2	56	15,18	Incolor	Laranja		UENF
20- UENFV-Explosivo C4	56	15,68	Incolor	Laranja		UENF
21- UNB-2U C3	56	15,63	Incolor	Laranja		UENF
22- PA 091	-	-	Incolor	Amarelo		UEM
23- PR-023	68	16,80	Incolor	Laranja		UEM
24- BRS ANGELA	74	10,52	Incolor	Branco		Embrapa
25- SAM	-	14,49	Incolor	Laranja		Sul-americana/EUA
26- PARA 170	85	6,55	Incolor e marrom	Branco		CIMMYT
27- COLOMBIANA	-	11,66	Incolor	Laranja		UEM
28- TATU 1	-	8,70	Incolor	Preto/Roxo		UEM
29- UNB-2U C0	60	14,30	Incolor	Laranja		UENF
30- UFVM2-Barão Viçosa	62	12,18	Incolor	Laranja		UFV
31- TATU 2	-	8,00	Incolor	Branco		UEM

*AM=Amarelo e AL=Aalaranjado.

3.2. Extração do DNA

foram utilizadas, para a extração de DNA das amostras, folhas jovens, com cerca de 20 dias no momento das coletas. Os vasos foram levados até o laboratório e as plantas coletadas no momento da extração. O DNA genômico foi isolado de

acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações, que consistiram em:

- a) Adicionou-se menor volume de tampão CTAB e de solução clorofórmio: álcool isoamílico (800 μ L ao invés de 1 mL, devido a um menor volume de sobrenadante recuperado);
- b) Substituiu-se o octanol por álcool isoamílico na purificação com clorofórmio: álcool isoamílico;
- c) Acrescentaram-se duas purificações com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1);
- d) Acrescentaram-se duas precipitações do DNA com isopropanol (uma sem sal e uma com sal);
- e) Adicionou-se menor volume de RNase (2 μ L ao invés de 10 μ L);
- f) Acrescentou-se uma purificação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1);
- g) Acrescentaram-se duas lavagens com etanol 70%.

Para a extração de DNA, cada planta foi considerada um indivíduo dentro de cada genótipo, sendo estes representados por cada microtubo de extração.

A extração foi realizada em microtubo plástico, tipo *ependorf*, com capacidade para 2 mL, contendo tecido vegetal previamente pulverizado com nitrogênio líquido e 800 μ L de tampão de extração CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 0,5M pH 8,0; CTAB 1% e 140 mM de β -mercaptoetanol), previamente preparado. Os tubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria, a 65°C, durante 1 hora, realizando-se agitações suaves a cada cinco minutos. Após serem removidos do banho, os tubos foram mantidos sobre o balcão até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 800 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1, com inversão suave durante cinco minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante cinco minutos, sob temperatura ambiente, a 13.000 r.p.m. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para microtubos novos, com capacidade para 1,5 mL, aos quais foram adicionados 800 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com agitação suave durante cinco minutos. Após uma nova centrifugação a 13.000 r.p.m., durante cinco minutos e em temperatura ambiente, o sobrenadante coletado foi transferido para um tubo *ependorf* limpo. Para precipitar o DNA, foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol gelado por volume de sobrenadante recuperado, misturando-se

levemente por inversão por um minuto. As amostras foram mantidas *over-night* a -20°C para uma melhor precipitação.

Após a etapa descrita acima, foi efetuada uma centrifugação a 13.000 r.p.m., por cinco minutos, em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 800 µL de etanol 70% gelado, misturando-se levemente, por inversão, durante um minuto, seguindo com uma nova centrifugação a 13.000 r.p.m., por cinco minutos, em temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante e feita a secagem do *pellet* de DNA, foram adicionados 400 µL de TE, mantendo-se o material *over-night* a 4°C.

Foram adicionados ao material, após 24 horas, 2 µL de RNase 10 ng/µL, mantendo-o em temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, foram adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e realizadas agitações. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante cinco minutos, sob temperatura ambiente, a 13.000 r.p.m. A fase aquosa (superior) foi transferida para um *ependorf* limpo, adicionando-se 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo com agitação e nova centrifugação. A fase aquosa (superior) foi transferida para tubos *ependorf* limpos, adicionando-se 250 µL de isopropanol e 25 µL de NaCl 5M. O material Foi misturado por inversões suaves, por 1 minuto, e o resultado da mistura foi mantido *overnight* a -20°C.

Após o período descrito acima, foi realizada uma centrifugação a 13.000 r.p.m., por cinco minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol 70% gelado, misturando-se, por inversão, por um minuto. Após efetuar uma nova centrifugação a 13.000 r.p.m., por cinco minutos e em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco e ressuspenso em 50 µL de TE. O DNA foi então armazenado a 4°C.

3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o equipamento Qubit fluorometer. Para a quantificação foi utilizado 1µL de cada amostra e, após a diluição, a concentração do DNA utilizada para amplificação foi ajustada para 10ng/µL.

3.4. Amplificação do DNA

O estudo da diversidade genética em milho pipoca utilizando marcadores SSR foi feito a partir dos testes de 159 microssatélites já mapeados para o milho comum (Anexo 1). Todos os microssatélites analisados foram obtidos a partir do *site Maize DB* acessado em <http://www.maizegdb.org/ssr.php>.

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, usando um termociclador Techne TC-512. Para a amplificação do DNA e seleção dos *primers*, foram utilizados: 25 ng de DNA de três amostras, com 2,0 µl de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada dNTP, 1 U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen), e 0,4 µM de *primers* Forward e Reverse específicos para um volume final de 20 µl (Quadro2).

A seleção dos microssatélites foi feita utilizando-se três amostras de DNA, escolhidas ao acaso e analisadas em gel de agarose Metaphor ou MS-8 para verificar a complementaridade e reprodutibilidade dos *primers*.

Quadro 2 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação dos microssatélites de milho pipoca

Reagentes	Concentração estoque	Concentração final/reação	Volume (µl)/ reação
H ₂ O			12,1
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	1,6
DNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (F)	10 µM	0,2 µM	0,4
<i>Primer</i> (R)	10 µM	0,2 µM	0,4
Taq-DNA Polimerase	5 U/ µL	1 U	0,2
DNA		25ng	2,5
Total			20 µL

A amplificação dos microssatélites foi feita com o auxílio do programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991) (Quadro 3). Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 4%, usando 50% de agarose comum e 50% agarose Metaphor (CAMBREX) ou MS-8 e tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 60 volts durante aproximadamente 4 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução com brometo de etídio, contendo 0,5 µg/ml ou SYBR® Safe

DNA gel stain, e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290, utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen).

Quadro 3 - Sequência do programa utilizada para a amplificação do DNA de *Zea mays* L.

Passo	Etapa	Temperatura	Touchdown
01	Desnaturação inicial	94 ^o C	1 minuto
02	Desnaturação	94 ^o C	1 minuto
03	Anelamento	65 ^o C(-1 ^o C/ciclo)	1 minuto
04	Extensão	72 ^o C	2 minutos
05	Retorna ao Passo 2 por 9X	-	-
06	Desnaturação	94 ^o C	1 minuto
07	Anelamento	55 ^o C	1 minuto
08	Extensão	72 ^o C	2 minutos
09	Retorna ao Passo 6 por 17X	-	-
10	Extensão Final	72 ^o C	2 minutos
11	Imersão	04 ^o C	-

3.5. Análise dos dados

Visando a analisar a diversidade genética nas populações de milho pipoca, cada fragmento de DNA amplificado e identificado como uma banda no gel foi considerado como um fenótipo distinto e independente dos demais, determinando os alelos de cada loco SSR.

Esses dados foram utilizados para determinar as frequências dos alelos nos 30 locos microssatélites analisados para os 31 genótipos de milho pipoca.

A heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada de Nei (H_e) também foi determinada; o número de alelos em cada um dos locos SSR; o número médio de alelos por loco (N_a); o número efetivo de alelos (N_e), calculado como $N_e=1/(1-H_o)$; e a porcentagem de alelos polimórficos, para cada população.

Foram estimados para cada loco o coeficiente de endogamia (F_{IT}), definido como a probabilidade de que dois alelos presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência; o déficit de heterozigotos (F_{IS}), determinado pelo desvio das frequências fenotípicas e estimado por $F_{IS}=\sigma_{subpopulações}/p(1-p)$, em que σ é a variância e p é a frequência do alelo A na população; a proporção da diversidade gênica entre os *primers* testados (F_{ST}), dado pela probabilidade de que dois

indivíduos pertencentes a populações diferentes possuam um alelo idêntico por descendência, estimado por $F_{ST}=1-H_o/H_e$ (Alfenas, 1998).

A estimativa destes parâmetros foi realizada, empregando-se o programa GenAlEx 6.1 (Peakall e Smouse, 2006).

Os cálculos do conteúdo polimórfico informativo (PIC) e do alelo mais frequente por loco foram obtidos com o uso do aplicativo Power Marker 3.25 (Liu e Muse, 2005).

A análise Bayesiana, para complementar os dados populacionais, foi realizada, implementada pelo programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). A base dessa análise é o modelo de separação de grupos (*clusters*), que atribui indivíduos a um número K de populações, com base na estimativa Bayesiana, em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados, dentro de cada população (Lima, 2010).

As análises no programa STRUCTURE foram realizadas com valor de corte (burnin) de 3.000 permutações e Markov Chain Monte Carlo (MCMC), com 30.000 permutações.

O número de *clusters* foi inferido pelo método proposto por Evanno et al. (2005). Para essa análise, foram realizadas dez réplicas (runs) para cada valor de K (K= 2 a K= 8), definindo-se, em seguida, os agrupamentos por meio do delta K.

A distância genética entre os acessos avaliados neste trabalho foi estimada pela distância modificada de Rogers (1972), calculada com o auxílio do programa Tools for Population Genetic Analyses.

A distância modificada de Rogers tem como base a distância euclidiana, a partir de estimativas de frequências alélicas. No entanto, é de mais fácil aplicabilidade que a distância euclidiana, pois os valores da distância de Rogers estão compreendidos entre 0 e 1, constituindo uma medida métrica de fácil interpretação, ao contrário da distância euclidiana, onde os valores variam de 0 a $\sqrt{2}$. Se p_{ij} e q_{ij} correspondem às frequências do alelo i no loco j, nas respectivas populações P e Q, tomando m como o número de locos contendo os alelos estudados, a distância entre as populações P e Q (dPQ) se estima por:

$$d_{PQ} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \sqrt{\frac{1}{2} \sum_{i=1}^m (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

MELHORAR ESTA FÓRMULA

A partir das distâncias genéticas de Rogers, foi construído um dendograma por meio da análise de agrupamento (*cluster*) UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using the Arithmetic Average), utilizando o programa Mega 5.05 (Tamura et al., 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de *primers*

O método de extração de DNA descrito por Hoisington et al. (1994), com modificações, foi adequado para obtenção de DNA de qualidade e em quantidade suficiente para estudar a estrutura de população e divergência genética entre as 465 plantas dos 31 genótipos de milho. A média de DNA extraído dos 465 indivíduos foi de 172,31ng/μL. No Quadro, 4 estão demonstrados os detalhes da quantificação para as 15 plantas da população URUG 298.

Quadro 4 - Detalhes da quantificação do DNA proveniente da população URUG 298. O valor de fluorescência corresponde ao informado pelo equipamento Qubit fluorometer. Os volumes de DNA e água foram calculados para obter a diluição desejada de 10ng/μL em um volume final de 100μL

Amostra	Fluorescência	Concentração(ng/μL)	DNA(uL)	Água (uL)
3,1	0,346	69,2	14,45	85,5491
3,2	0,501	100,2	9,98	90,02
3,2	0,39	78	12,82	87,1795
3,4	1,64	328	3,049	96,9512
3,5	0,841	168,2	5,945	94,0547
3,6	0,927	185,4	5,394	94,6063
3,7	0,376	75,2	13,3	86,7021
3,8	0,389	77,8	12,85	87,1465
3,9	0,631	126,2	7,924	92,0761
3,10	1,04	208	4,808	95,1923
3,11	0,584	116,8	8,562	91,4384
3,12	0,955	191	5,236	94,7644
3,13	0,92	184	5,435	94,5652
3,14	0,795	159	6,289	93,7107
3,15	0,449	89,8	11,14	88,8641

Treze dos 159 *primers* microssatélites isolados para milho comum e testados para milho pipoca não amplificaram nos 31 genótipos de milho pipoca. É possível que a falta de amplificação se deva ao fato de que os *primers* desenvolvidos para os locos *SSR* de milho comum não foram complementares aos segmentos de DNA do genoma de milho pipoca. Assim, para os 31 genótipos de milho pipoca analisados no presente estudo, foi obtido um aproveitamento de 91,8% dos pares de *primers* desenvolvidos para milho comum.

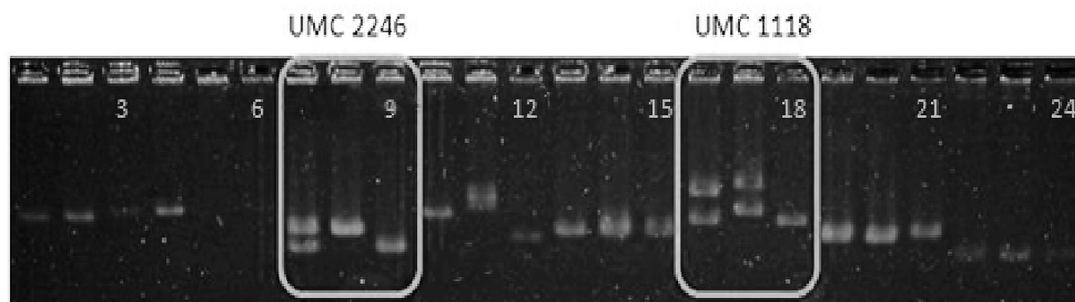


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 4%. A cada três poços um *primer* diferente foi testado. Cada par de *primer* foi testado com indivíduos escolhidos aleatoriamente de populações diferentes.

Quarenta e dois, dos 146 pares de *primers* microsatélites que amplificaram o DNA de milho pipoca, foram considerados polimórficos para os 31 genótipos, sendo utilizados 30 desses pares de *primers* para estudar a variabilidade genética (Figura 1). Estes *primers* foram escolhidos porque os produtos da amplificação foram facilmente revelados como diferentes alelos em gel de agarose Metaphor ou MS-8. Os *primers* selecionados estão situados nos 10 cromossomos do milho. Os locos selecionados com as sequências dos *primers*, repetições flanqueadas e localização dos mesmos estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Locos microsatélites, sequências dos *primers*, bloco de repetição e a localização de cada *primer* usado na estimativa da diversidade genética de 31 genótipos de milho pipoca

Locos	Seqüência dos <i>primers</i>	Repetição	Bin
<i>Umc1071</i>			
Forward	AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG	(TACGA) ₅	1,01
Reverse	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT		
<i>Umc1363</i>			
Forward	TGTTTAAGTGTTGGCAGAAAGCAA	(ACG) ₄	1,01
Reverse	TCTCCCTCCCCTGTACATGAATTA		
<i>Bnlg2295</i>			
Forward	CGGAGGAGTGTTCTTGAAA	(AG) ₃₀	1,04
Reverse	GGTTAGTGAAAGGGTTGCCA		
<i>Umc1118</i>			
Forward	ATCAGATTCCGAAGGGTCCATAAT	(GAGCA) ₄	1,11
Reverse	GTAGTGAAATGAATCGTGAGAGCG		
<i>Umc2246</i>			
Forward	AGGCTCCAGCTCTAGGGGAGT	(CCTCCT) ₄	2,00
Reverse	GTGAACTGTGTAGCGTGGAGTTGT		

Quadro 5, cont.

<i>Bnlg1175</i>			
Forward	ACTTGACGGTCTCGCTTAT	(AG) ₃₈	2,04
Reverse	GCACTCCATCGCTATCTTCC		
<i>Umc1635</i>			
Forward	GCTGAGCAGATCTTTCCTTGTTTC	(GAAGG) ₄	2,05
Reverse	AAGGAGCAGAACTCGGAGACG		
<i>Umc1065</i>			
Forward	ACAAGGCCATCATGAAGAGCGTA	(ACA) ₁₇	2,05
Reverse	CACGGTCTGGCACACTAACCTTAT		
<i>Umc1755</i>			
Forward	CTCCTCGGCATCCTACGAGATAC	(CACGAG) ₄	2,06
Reverse	GTGCTCGTGCTCGTGGCTAT		
<i>Mmc0271</i>			
Forward	CGTAATGCGTAGCAACATAG	(GA) ₃₉	2,07
Reverse	CAACATCCTTCCACCG		
<i>Umc2205</i>			
Forward	CATGATCATTGGCGATGGTAAT	(CTCTCTCTCT) ₄	2,07
Reverse	ATGGTGAGCGAGTGAAAGAGAGAT		
<i>Umc2118</i>			
Forward	CGTCTCCGTCTGCAGTCACTATTA	(CTTT) ₄	3,00
Reverse	TATGGTCCCTCGGAGTTTGTGGTT		
<i>Umc2108</i>			
Forward	CCTTTTAATTTGCAAAGAGAGGTGG	(CTGCA) ₄	3,00
Reverse	CAAACAAAGAAAGTCTCGGCAGC		
<i>Umc2166</i>			
Forward	TACGTGCTACATCGCCCACC	(GCCTC) ₄	3,05
Reverse	GTCGTAGCCATATCAGTTGGAACG		
<i>Umc1847</i>			
Forward	GCCCAAGGTAGATTTTTACTCTCCA	(CGC) ₆	4,07
Reverse	AAGTCGTAGAGCTCGTCGTGATG		
<i>Umc2302</i>			
Forward	GCATATGCGAGATCATATCGTTGA	(AGAAAGAA) ₄	5,04
Reverse	CTATACAGCCCTCAGCTCTGCTGT		
<i>Umc2164</i>			
Forward	AGCACACAGACAAGAGAGACAACG	(CGGC) ₄	5,05
Reverse	GACCGACAACAGAGATCGAGTACA		
<i>Umc1524</i>			
Forward	TACAAGTAAACACGCGCAGGAGTA	(GGA)CTG) ₈	5,06
Reverse	TGTTTGAGCGACTTACTTGACCTG		
<i>Umc1072</i>			
Forward	GAGGAGACCGCCTCTGGTTC	(GGA) ₁₀	5,07
Reverse	CTTCGGGTTCCCTGGACCTTCT		
<i>Umc2165</i>			
Forward	AGAACACCAAATGGTGACGTTATGT	(TTC) ₁₂	6,07
Reverse	CTAGCTCGTCTTCCCTGTGGTCT		
<i>Umc1653</i>			
Forward	GAGACATGGCAGACTCACTGACA	(GAAA) ₂₄	6,07
Reverse	GCCGCCACGTACATCTATC		
<i>Umc2059</i>			
Forward	GGAAAAGGAGGAACAGTGTAAAGCA	(CAG) ₈	6,08
Reverse	AGCGTGATCAGACGTACAATGCTA		
<i>Umc1642</i>			
Forward	CACTACAGCGCCTGTAAGTACC	(GCTA) ₆	7,00
Reverse	CATGAGCTAAGCAAGAGGGGTATG		

Quadro 5, cont.

<i>Umc1549</i>			
Forward	ATTCACTCTTGCATTGCCTCTCC	(GCCTCT) ₄	7,02
Reverse	ATGAACGAGTCCAGGAGTTTCTTC		
<i>Umc1125</i>			
Forward	CGTCCGACATCTTGCTTTTCTATC	(CTCG) ₅	7,04
Reverse	TTTTACTTCTCAGCGGTAGATCGG		
<i>Umc1415</i>			
Forward	GTGAGATATATCCCCGCCTTCC	(GAC) ₁₀	8,03
Reverse	AGACTTCCTGAAGCTCGGTCCTA		
<i>Umc2401</i>			
Forward	GCACCTGATGCAGTAGGGAGTC	(CTCTCT) ₄	8,05
Reverse	TTTTCTTCTCCTTCCCTCACCTG		
<i>Umc1137</i>			
Forward	ATCAGTCACTCTTCTGCCTCCACT	(CT) ₁₅	9,08
Reverse	GGCTGGATAATGTTGTAGCTGGTC		
<i>Mmc0501</i>			
Forward	TGCTGAACACTCTAAGCAATAC	(GA) ₃₆	10,02
Reverse	ATTACTCTACTCGCTGCCTG		
<i>Umc1336</i>			
Forward	GTACAAATGATAAGCAAGGGGCAG	(ACCAG) ₄	10,03
Reverse	CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTGG		

4.2. Estrutura das populações

Dentre os 30 *primers* polimórficos utilizados para a análise dos 30 locos SSR, 9 apresentaram 4 alelos, 7 apresentaram 3 alelos, 6 apresentaram 5 alelos, 3 apresentaram 2 alelos, 3 apresentaram 6 alelos e 2 apresentaram 8 alelos (Quadro 6). Com estes 30 *primers*, foram identificados 127 alelos e o número de alelos por loco nos genótipos variou de 2 a 8, com um número médio de alelos por loco polimórfico de 4,23. Na Figura 2, está demonstrado o loco *Umc1653* que se destacou como um dos mais polimórficos, apresentando um total de oito alelos.

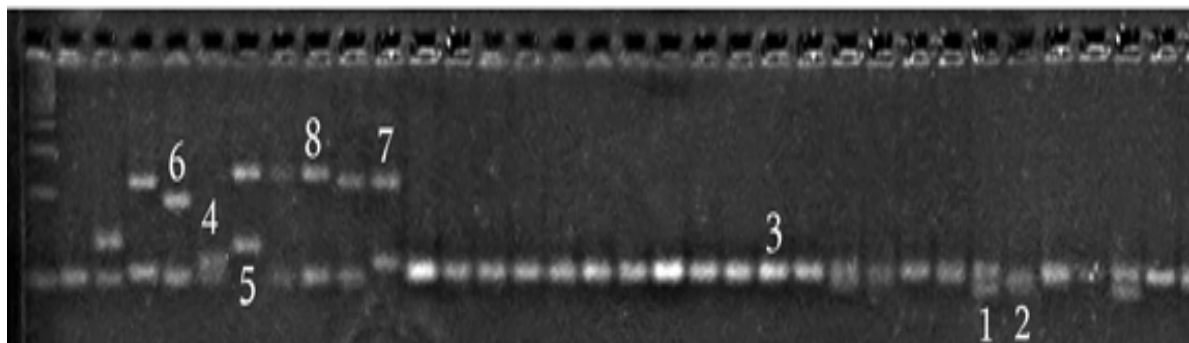


Figura 2 – Amplificação do DNA de milho pipoca com o *primer Umc1653* e a observação de 8 alelos.

Quadro 6 - Número de alelos observados nos 30 locos microssatélites e porcentagem do alelo com maior frequência

Locos\Alelos	Nº total de alelos	Porcentagem do alelo com maior frequência
<i>Umc2401</i>	3	0,483
<i>Umc2108</i>	3	0,433
<i>Umc1125</i>	2	0,629
<i>Mmc0271</i>	6	0,466
<i>Umc2246</i>	5	0,418
<i>Bnlg1175</i>	8	0,31
<i>Umc1755</i>	5	0,408
<i>Umc2166</i>	5	0,302
<i>Umc1118</i>	5	0,614
<i>Umc1065</i>	6	0,269
<i>Umc1642</i>	5	0,556
<i>Umc2118</i>	3	0,467
<i>Umc1137</i>	4	0,843
<i>Umc2059</i>	3	0,461
<i>Umc1635</i>	5	0,377
<i>Umc1071</i>	4	0,463
<i>Umc1415</i>	4	0,968
<i>Umc1336</i>	2	0,578
<i>Umc1363</i>	3	0,582
<i>Umc2205</i>	6	0,374
<i>Umc1549</i>	4	0,611
<i>Bnlg2295</i>	4	0,725
<i>Umc2302</i>	3	0,7
<i>Umc1072</i>	4	0,467
<i>Umc2165</i>	3	0,451
<i>Umc1847</i>	2	0,732
<i>Umc1653</i>	8	0,529
<i>Mmc0501</i>	4	0,329
<i>Umc1524</i>	4	0,415
<i>Umc2164</i>	4	0,387

O número médio de alelos por loco nos 31 genótipos de milho pipoca analisados no presente estudo é maior que o número de alelos (2,71alelos/loco) descritos por Li et al. (2004), em 56 linhagens de milho pipoca e em 21 linhagens de milho comum (3,58 alelos/loco), analisando 113 locosSSR. Também é maior que o número de alelos descrito por Leal et al. (2010), em 10 linhagens de milho pipoca, usando 14 locosSSR(3,36 alelos/loco); maior que o número descrito por Eloi et al.

(2012) em 8 variedades de milho pipoca, usando 15 locos SSR (3,73 alelos/loco); maior que o número descrito por Shah et al. (2009), em 17 genótipos de milho, usando 10 locos SSR (1,56 alelos/loco); maior que o número descrito por Dandolini et al. (2008), em 10 linhagens de milho pipoca, usando 14 *primers* microssatélites (3,35 alelos/loco); e maior também que o número de alelos descrito por Liu et al. (2005) que detectaram uma média de 4,1 alelos com 50 *primers* SSR, em 38 variedades de milho comum.

Números maiores de alelos por loco SSR que o número observado no presente estudo têm sido descritos por alguns investigadores, como Wuet al. (2004) e Qi-Lun et al. (2008). O número médio de alelos por loco descrito por Wu et al. (2004) em raças de pipoca, analisando 61 *primers* SSR, foi de 5,4 alelos/loco e Qi-Lun et al. (2008) encontraram uma média de 6,4 alelos por loco, em 124 cultivares de milho comum, analisando 45 locos SSR.

Quando se trabalha com o mesmo marcador e a mesma espécie, é natural que diferentes pesquisadores utilizem *primers* em comum. Neste sentido foi possível realizar uma comparação em relação ao número de alelos encontrados. No Quadro 7 está demonstrado o número de alelos encontrados por: Trindade et al. (2010), utilizando 8 linhagens de milho pipoca e 8 amostras de cada linhagem; Laborda (2003), utilizando 85 linhagens de milho tropical do Banco de germoplasma do IAC e 15 plantas de cada linhagem; Dandolini et al. (2008), utilizando 10 linhagens de milho pipoca e 7 plantas por linhagem; Franzoni et al. (2012), utilizando ciclos de seleção do composto CMS-43 de milho pipoca e 15 plantas de cada ciclo de seleção; Lopes (2008), utilizando 15 linhagens de milho doce e 5 indivíduos de cada linhagem; Silva et al. (2009), utilizando 25 genótipos de milho pipoca e 78 plantas de cada genótipo, sendo a maioria variedades de polinização aberta; Eloi et al. (2012), utilizando 8 genótipos de milho pipoca e 8 a 9 plantas de cada genótipo, sendo variedades de polinização aberta ou híbridos; e Terra et al. (2011), utilizando duas populações de milho doce, duas de milho comum e uma de teosinto, sendo 19 plantas de cada população.

Para todos os *primers* em comum, o presente estudo apresentou um número menor de alelos em relação ao trabalho de Silva et al. (2009) que, apesar de trabalhar com um número menor de populações (25), trabalharam com um número maior de plantas por população. Para o *primer* UMC 1653, Laborda (2003) apresentou um número maior de alelos, também analisando um número maior de

plantas; Eloi et al. (2012) encontrou um número menor de alelos para este mesmo *primer*, trabalhando com um número menor de populações. É possível inferir, assim, que o número de alelos encontrados pode estar intimamente relacionado com o número de genótipos e com o número de plantas avaliadas por genótipo.

Quadro 7 – Comparação do número de alelos por *primer* encontrados no presente estudo e em dados da literatura

	<i>Umc 1363</i>	<i>Umc 2302</i>	<i>Umc 1336</i>	<i>Umc 1071</i>	<i>Umc 1653</i>	<i>BnlG 2295</i>	<i>Mmc 0501</i>
Presente estudo	3 alelos	3 alelos	2 alelos	4 alelos	8 alelos	4 alelos	4 alelos
Laborda (2003)					10 alelos		
Dandolini et al. (2008)			2 alelos	3 alelos	5 alelos		
Lopes (2008)	2 alelos						
Franzoni et al. (2012)			3 alelos	3 alelos			
Silva et al. (2009)			4 alelos	5 alelos		6 alelos	6 alelos
Trindade et al. (2010)		2 alelos	2 alelos				
Eloi et al. (2012)				4 alelos	5 alelos		
Terra et al. (2011)	5 alelos						

No Quadro 8, está demonstrado que, para maior parte dos locos, a heterozigosidade média observada (H_o) foi menor que a heterozigosidade média esperada (H_e), exceto para os locos *Umc1125*, *Umc1415*, *Umc1549* e *Umc1072*. O loco *Umc2108* foi o que apresentou a menor heterozigosidade média observada, enquanto os maiores valores para H_o e H_e foram evidentes no loco *Umc1072*.

Os valores de PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) fornecem uma estimativa do poder discriminatório do marcador e é o grau de polimorfismo detectado a partir de um determinado par de *primer*, que está diretamente relacionado com a variabilidade da região nos genótipos avaliados (Wietholter, 2005), O PIC pode variar de 0 a 1, em que 1 seria o infinito superior (Weiler et al., 2010). Segundo Albuquerque (2005), os valores superiores a 0,5 podem ser considerados muito informativos; entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos e inferiores a 0,25 pouco informativos. O valor médio de PIC no presente estudo foi de 0,529. O maior valor, 0,786, foi para o *primer* BNLG1175, que apresentou 8 alelos; e a frequência do alelo que mais se repetiu foi 0,31. O menor valor, 0,61, foi para o *primer* UMC1415, que apresentou 4 alelos e, apesar de não ser o *primer* que apresenta o menor número de alelos, a frequência do alelo que mais se repetiu foi 0,96 (Quadros 6 e 8). Bered et al. (2005), analisando populações de milho doce, encontraram um valor médio de PIC de 0,57, variando de 0,39 a 0,73. Almeida et al.

(2011) encontraram valores de PIC similares, analisando populações de milho comum e teosinte, com média de 0,50, variando de 0,26 a 0,76.

Quadro 8 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para os 31 genótipos de milho pipoca obtidos com cada um dos 30 *primers* microssatélites. Heterozigosidade média observada (H_o); Heterozigosidade média esperada de Nei (H_e) e Conteúdo de informação de Polimorfismo (PIC)

locos	Ho	He	PIC
<i>Umc2401</i>	0,039	0,392	0,483
<i>Umc2108</i>	0,027	0,392	0,550
<i>Umc1125</i>	0,312	0,301	0,357
<i>Mmc0271</i>	0,218	0,293	0,509
<i>Umc2246</i>	0,116	0,352	0,580
<i>Bnlg1175</i>	0,208	0,493	0,786
<i>Umc1755</i>	0,03	0,349	0,611
<i>Umc2166</i>	0,118	0,429	0,699
<i>Umc1118</i>	0,095	0,321	0,541
<i>Umc1065</i>	0,282	0,497	0,757
<i>Umc1642</i>	0,041	0,372	0,591
<i>Umc2118</i>	0,073	0,279	0,535
<i>Umc1137</i>	0,222	0,223	0,264
<i>Umc2059</i>	0,211	0,332	0,493
<i>Umc1635</i>	0,273	0,415	0,637
<i>Umc1071</i>	0,328	0,447	0,636
<i>Umc1415</i>	0,056	0,05	0,061
<i>Umc1336</i>	0,211	0,289	0,368
<i>Umc1363</i>	0,147	0,315	0,446
<i>Umc2205</i>	0,343	0,479	0,670
<i>Umc1549</i>	0,766	0,463	0,481
<i>Bnlg2295</i>	0,228	0,315	0,405
<i>Umc2302</i>	0,087	0,225	0,397
<i>Umc1072</i>	0,987	0,563	0,548
<i>Umc2165</i>	0,142	0,328	0,571
<i>Umc1847</i>	0,043	0,21	0,315
<i>Umc1653</i>	0,265	0,38	0,625
<i>Mmc0501</i>	0,186	0,423	0,679
<i>Umc1524</i>	0,343	0,474	0,662
<i>Umc2164</i>	0,097	0,399	0,628
Média	0,216	0,36	0,529

Segundo Albuquerque (2005), os valores de PIC e de heterozigosidade refletem o polimorfismo do marcador nas populações estudadas. A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto para o loco marcador e depende do número de alelos e da frequência dele na população. Valores para a heterozigosidade acima de 70% são tidos como mais informativos,

sendo considerado bom indicativo para realizar estudos de populações consistentes e precisos (Susol et al., 2000).

As frequências dos alelos nos 30 locos microssatélites, nos 31 genótipos de milho pipoca, podem ser observadas nos Quadros 9 e 10. Os *primers* UMC1549 e UMC1072 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados no presente estudo, além de apresentarem valores de heterozigidade observada acima de 70% (0,766 e 0,987 respectivamente), podendo, portanto, serem apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho pipoca.

Quadro 9 - Frequências dos alelos nos 30 locos microssatélites. Genótipos de 1 a 15

Locos	Alelo	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8	Pop9	Pop10	Pop11	Pop12	Pop13	Pop14	Pop15
Umc2401	1	0,000	0,000	0,071	0,000	0,133	0,000	0,067	0,367	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,200	0,000
	2	0,467	0,400	0,286	0,067	0,533	0,800	0,333	0,533	1,000	0,600	0,133	0,067	0,000	0,133	0,300
	3	0,533	0,600	0,643	0,933	0,333	0,200	0,600	0,100	0,000	0,400	0,800	0,933	1,000	0,667	0,700
Umc2108	1	0,550	0,000	0,500	0,000	0,250	0,000	0,100	0,385	0,077	0,467	0,133	0,133	0,000	0,000	0,077
	2	0,200	0,800	0,500	1,000	0,583	0,267	0,233	0,385	0,923	0,133	0,000	0,133	0,385	0,067	0,538
	3	0,250	0,200	0,000	0,000	0,167	0,733	0,667	0,231	0,000	0,400	0,867	0,733	0,615	0,933	0,385
Umc1125	1	0,600	0,667	0,300	0,067	0,833	0,900	0,400	1,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200
	2	0,400	0,333	0,700	0,933	0,167	0,100	0,600	0,000	0,833	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,800
Mmc0271	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,833	0,409	0,667	1,000	1,000	0,385	0,667	0,042	0,400	0,300	0,000	0,233	0,000	0,200	0,269
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	5	0,167	0,591	0,333	0,000	0,000	0,308	0,133	0,667	0,600	0,700	1,000	0,767	1,000	0,533	0,000
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,292	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,267	0,731
Umc2246	1	0,667	0,000	0,000	0,633	0,000	0,267	0,143	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,067	0,267
	2	0,133	0,200	0,000	0,233	0,267	0,367	0,357	0,367	1,000	1,000	0,933	1,000	0,933	0,467	0,233
	3	0,167	0,333	0,733	0,133	0,733	0,300	0,500	0,467	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,467	0,233
	4	0,033	0,467	0,267	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,267
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Bnlg1175	1	0,133	0,071	0,000	0,000	0,000	0,033	0,467	0,000	0,000	0,000	0,125	0,133	0,133	0,100	0,000
	2	0,000	0,000	0,100	0,000	0,143	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,000
	3	0,000	0,393	0,200	0,000	0,321	0,033	0,200	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,067	0,393	0,067	0,000	0,000	0,067	0,000	0,533	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167
	5	0,033	0,143	0,133	0,000	0,000	0,067	0,167	0,333	0,000	0,000	0,000	0,333	0,167	0,000	0,400
	6	0,400	0,000	0,333	0,000	0,143	0,067	0,000	0,000	0,000	0,600	0,875	0,533	0,133	0,033	0,033
	7	0,133	0,000	0,167	1,000	0,393	0,467	0,167	0,000	1,000	0,400	0,000	0,000	0,000	0,633	0,267
	8	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,567	0,100	0,133
Umc1755	1	0,688	0,000	0,000	0,000	0,000	0,400	0,000	0,533	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133
	2	0,000	0,067	0,000	0,133	0,933	0,600	0,583	0,467	0,533	0,000	0,000	0,000	0,200	0,067	0,600
	3	0,000	0,533	0,867	0,400	0,067	0,000	0,000	0,000	0,400	1,000	1,000	1,000	0,800	0,433	0,133
	4	0,000	0,400	0,133	0,467	0,000	0,000	0,417	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,133
	5	0,313	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,300	0,000
Umc2166	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,071	0,033	0,900	0,467	0,033	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,067	0,333	0,333	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,133	0,100	1,000	0,933	1,000	0,933	0,667	0,400	0,467
	4	0,067	0,714	0,633	0,000	0,333	0,667	0,733	0,867	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200

Quadro 9, cont.

	4	0,333	0,167	0,000	0,000	0,000	0,367	0,100	0,000	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,600
Umc2302	1	0,000	0,692	0,792	0,633	1,000	1,000	0,800	0,933	0,962	0,700	0,000	0,867	1,000	1,000	0,000
	2	1,000	0,231	0,125	0,200	0,000	0,000	0,200	0,067	0,000	0,100	1,000	0,033	0,000	0,000	0,400
	3	0,000	0,077	0,083	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,200	0,000	0,100	0,000	0,000	0,600
Umc1072	1	0,250	0,400	0,200	0,500	0,267	0,400	0,100	0,033	0,000	0,333	0,467	0,500	0,321	0,067	0,500
	2	0,214	0,100	0,300	0,000	0,167	0,100	0,400	0,467	0,500	0,167	0,033	0,000	0,179	0,433	0,000
	3	0,000	0,000	0,167	0,000	0,233	0,233	0,100	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000
	4	0,536	0,500	0,333	0,500	0,333	0,267	0,400	0,467	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,467	0,500
Umc2165	1	0,321	0,700	0,167	0,000	1,000	0,333	0,633	0,000	0,000	0,267	0,000	0,367	0,000	0,367	0,000
	2	0,607	0,133	0,567	0,000	0,000	0,667	0,267	1,000	1,000	0,400	1,000	0,233	1,000	0,133	0,133
	3	0,071	0,167	0,267	1,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,333	0,000	0,400	0,000	0,500	0,867
Umc1847	1	1,000	0,000	0,800	1,000	0,667	0,200	0,067	0,071	0,133	0,000	0,267	0,000	0,000	0,267	0,000
	2	0,000	1,000	0,200	0,000	0,333	0,800	0,933	0,929	0,867	1,000	0,733	1,000	1,000	0,733	1,000
Umc1653	1	0,036	0,333	0,167	0,000	0,067	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,214	0,000	0,000	0,000	0,100	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000
	3	0,536	0,300	0,333	1,000	0,833	0,633	0,167	0,000	1,000	0,967	1,000	1,000	1,000	0,333	0,000
	4	0,036	0,133	0,067	0,000	0,000	0,000	0,800	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,500
	5	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,167	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,467
	6	0,179	0,100	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,267	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	7	0,000	0,133	0,133	0,000	0,000	0,133	0,000	0,233	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	8	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,033	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
Mmc0501	1	0,321	0,346	0,214	1,000	0,067	0,233	0,233	0,100	0,444	0,100	1,000	0,000	1,000	0,467	0,333
	2	0,321	0,154	0,143	0,000	0,700	0,100	0,367	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,233	0,467
	3	0,286	0,500	0,107	0,000	0,233	0,667	0,300	0,567	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,200
	4	0,071	0,000	0,536	0,000	0,000	0,000	0,100	0,167	0,556	0,900	0,000	1,000	0,000	0,200	0,000
Umc1524	1	0,000	0,033	0,429	0,679	0,143	0,000	0,067	0,067	0,750	0,467	0,833	0,267	0,000	0,067	0,567
	2	0,036	0,233	0,143	0,000	0,286	0,067	0,200	0,700	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000
	3	0,964	0,133	0,250	0,321	0,286	0,200	0,400	0,233	0,214	0,533	0,167	0,667	0,500	0,933	0,233
	4	0,000	0,600	0,179	0,000	0,286	0,733	0,333	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,200
Umc2164	1	0,000	0,233	0,100	0,000	0,000	0,000	0,167	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133
	2	0,000	0,000	0,133	0,133	0,583	0,462	0,333	0,333	0,133	1,000	0,000	0,933	0,000	0,033	0,000
	3	0,077	0,000	0,667	0,867	0,417	0,308	0,300	0,267	0,867	0,000	1,000	0,000	0,200	0,967	0,167
	4	0,923	0,767	0,100	0,000	0,000	0,231	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,800	0,000	0,700

O número das populações corresponde ao do Quadro 1.

Quadro 10 - Frequências dos alelos nos 30 locos microssatélites. Genótipos de 16 a 31

Locos	Alelo	Pop16	Pop17	Pop18	Pop19	Pop20	Pop21	Pop22	Pop23	Pop24	Pop25	Pop26	Pop27	Pop28	Pop29	Pop30	Pop31
Umc2401	1	0,033	0,367	0,233	0,071	0,067	0,067	0,167	0,100	0,067	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,300	0,267
	2	0,867	0,567	0,767	0,143	0,233	0,633	0,633	0,833	0,667	0,714	0,000	0,333	0,400	0,321	0,433	0,000
	3	0,100	0,067	0,000	0,786	0,700	0,300	0,200	0,067	0,267	0,286	1,000	0,567	0,600	0,679	0,267	0,733
Umc2108	1	0,000	0,000	0,100	0,000	0,167	0,321	0,367	0,286	0,100	0,000	0,000	0,077	0,417	0,533	0,333	
	2	0,083	0,500	0,300	0,143	0,367	0,571	0,633	0,714	0,900	0,929	0,125	0,100	0,154	0,583	0,400	0,667
	3	0,917	0,500	0,600	0,857	0,467	0,107	0,000	0,000	0,000	0,071	0,875	0,900	0,769	0,000	0,067	0,000
Umc1125	1	0,233	0,033	0,300	0,367	0,400	0,533	0,200	0,567	0,733	0,267	0,733	0,367	0,567	0,300	0,633	0,133
	2	0,767	0,967	0,700	0,633	0,600	0,467	0,800	0,433	0,267	0,733	0,267	0,633	0,433	0,700	0,367	0,867
Mmc0271	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,577	0,750	0,000	0,333	0,278	0,929	0,964	0,350	0,000	0,167	0,000	1,000	0,533	0,429	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,571	0,000
	5	0,917	0,423	0,250	0,000	0,667	0,722	0,000	0,000	0,500	1,000	0,833	1,000	0,000	0,467	0,000	0,000

Os valores para a proporção de locos SSR polimórficos e os valores para as estimativas da proporção de heterozigotos observada (H_o) e esperada (H_e), para cada população, estão relacionados no Quadro 11.

Quadro 11 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para os 31 genótipos de milho pipoca: Porcentagem de locos polimórficos (**%P**); Número médio de alelos observados (**Na**), Número efetivo de alelos (**Ne**), Heterozigosidade média observada (**H_o**) e heterozigosidade média esperada (**H_e**)

Pop	%P	Na	Ne	Ho	He
1- CHZM 13 0134	86,67	2,600	1,982	0,195	0,393
2- ARZM 13 050	93,33	2,900	2,183	0,223	0,485
3- URUG 298	93,33	3,000	2,111	0,26	0,443
4- ARZM 05 083	56,67	1,867	1,483	0,123	0,234
5- PARA 172	83,33	2,533	1,926	0,192	0,395
6-ARZM 07 049	96,67	3,133	2,134	0,276	0,469
7- BOZM 260	100,00	3,133	2,241	0,3	0,519
8- BOYA 462	90,00	2,833	2,111	0,215	0,446
9- IAC-125	73,33	2,133	1,561	0,277	0,285
10- IAC-112	70,00	2,067	1,609	0,273	0,276
11- JADE	50,00	1,700	1,338	0,142	0,173
12- Zélia	53,33	1,833	1,431	0,207	0,205
13- ARGENTINA	53,33	1,767	1,430	0,128	0,209
14- SE 013	83,33	2,633	1,921	0,269	0,392
15- Viçosa	93,33	2,667	2,116	0,252	0,463
16- RS-20	86,67	2,267	1,560	0,183	0,31
17- BEIJA-FLOR	90,00	2,633	1,809	0,2	0,374
18- UNB-2UC1	96,67	2,967	2,146	0,229	0,466
19- UNB-2UC2	90,00	2,667	1,810	0,23	0,4
20- UENFV-Explosivo C4	93,33	2,767	2,002	0,288	0,446
21- UNB-2UC3	90,00	2,733	1,997	0,254	0,432
22- PA 091	86,67	2,600	1,919	0,248	0,402
23- PR-023	93,33	2,967	2,082	0,286	0,437
24- BRS ANGELA	96,67	2,933	2,074	0,278	0,45
25- SAM	73,33	2,100	1,518	0,166	0,275
26- PARA 170	73,33	2,300	1,823	0,194	0,348
27- COLOMBIANA	70,00	2,067	1,639	0,134	0,303
28- TATU 1	56,67	1,967	1,545	0,121	0,229
29- UNB-2U C0	93,33	2,800	2,016	0,243	0,438
30- UFM2-Barão Viçosa	83,33	2,400	1,840	0,253	0,372
31- TATU 2	26,67	1,200	1,090	0,071	0,091
Total	79,89	2,457	1,821	0,216	0,36

A população 7-BOZM 260 apresentou a maior proporção de locos polimórficos (100%), apresentando variação alélica em todos os locos

microsatélites analisados (Quadros 9 e 11). No conjunto dos 31 genótipos, a proporção média de locos polimórficos foi de 79,89%. Este valor médio de locos polimórficos foi maior que os encontrados nos trabalhos de Liu et al. (2003) (54%) e de Dandolini et al. (2008) (50%), analisando linhagens de milho pipoca, e também maior que o valor registrado por Elói (2010) (76,66%) investigando híbridos e populações de polinização aberta de milho pipoca.

Qi-Lun et al. (2008) obtiveram uma maior proporção média de locos polimórficos que a observada no presente estudo, que foi de 96,8% em 124 cultivares de milho comum, utilizando 45 locos SSR em amostras de *bulk* simples. De acordo com Liu et al., (2003), o milho pipoca é da mesma espécie que o milho comum, porém, em estudos que comparam a diversidade genética nos locos SSR de linhagens e populações de polinização aberta de milho comum de outras espécies do gênero *Zea*, e de milhos com características especiais, tais como o milho pipoca e milho doce, o milho pipoca tem apresentado um número de alelos por loco menor e valores de heterozigosidade média também menores que os verificados para o milho comum.

A heterozigosidade média observada variou entre 0,07 e 0,3 e a esperada variou entre 0,09 e 0,52, sendo a população 7- BOZM 260 a que apresentou a maior proporção de heterozigotos esperada e observada (Quadro11). Este genótipo com a maior heterozigosidade pode ser considerado promissor para seleção continuada de progênies. A manutenção de diversidade genética durante a formação de progênies é importante para o progresso de seleção, porque ela aumenta as possibilidades de seleção em médio e longo prazo.

O genótipo 31- TATU 2 apresentou a menor heterozigosidade média observada e esperada, pois 20 dos 30 locos analisados estão em homozigose neste genótipo, apresentando apenas 26% de locos polimórficos (Quadros 10 e 11).

Os valores de F_{IS} obtidos (Quadro 12) revelam o déficit de heterozigotos nos 30 locos analisados ($F_{IS} = 0,413$); o valor alto e positivo indica um déficit de 41% de plantas heterozigotas nos 31 genótipos analisados. Valores positivos foram encontrados para quase todos os locos SSR, exceto nos locos *Umc1125*; *Umc1415*; *Umc1549*; *Umc1072*. Valores altos de déficit de heterozigotos foram verificados nos locos *Umc2401*; *Umc2108* e *Umc1755* ($F_{IS} = 0,901$; 0,930 e 0,913 respectivamente). Esses valores indicam um excesso de homozigotos em alguns locos e apontam para uma tendência de fixação de determinados alelos nos referidos locos. Esta

tendência para fixação de alelos pode ser observada nas variedades 31- TATU 2 e 11- Jade, em 20 e 15 locos, respectivamente (Quadros 9 e 10).

Quadro12 - Parâmetros de diversidade genética para os *primers* avaliados nos 31 genótipos de milho pipoca. Déficit de heterozigotos (F_{IS}); Coeficiente de endogamia (F_{IT}) e Proporção da diversidade gênica entre os *primers* testados (F_{ST})

Locos	Fis	Fit	Fst
<i>Umc2401</i>	0,901	0,932	0,319
<i>Umc2108</i>	0,930	0,956	0,376
<i>Umc1125</i>	-0,034	0,332	0,354
<i>Mmc0271</i>	0,258	0,658	0,539
<i>Umc2246</i>	0,670	0,820	0,456
<i>BnlG1175</i>	0,578	0,747	0,401
<i>Umc1755</i>	0,913	0,956	0,488
<i>Umc2166</i>	0,725	0,842	0,424
<i>Umc1118</i>	0,705	0,836	0,443
<i>Umc1065</i>	0,432	0,643	0,371
<i>Umc1642</i>	0,889	0,936	0,426
<i>Umc2118</i>	0,740	0,882	0,545
<i>Umc1137</i>	0,005	0,200	0,196
<i>Umc2059</i>	0,365	0,638	0,430
<i>Umc1635</i>	0,341	0,607	0,403
<i>Umc1071</i>	0,265	0,520	0,347
<i>Umc1415</i>	-0,113	0,082	0,175
<i>Umc1336</i>	0,271	0,565	0,404
<i>Umc1363</i>	0,532	0,720	0,402
<i>Umc2205</i>	0,284	0,523	0,334
<i>Umc1549</i>	-0,654	-0,410	0,148
<i>BnlG2295</i>	0,277	0,483	0,285
<i>Umc2302</i>	0,614	0,809	0,505
<i>Umc1072</i>	-0,754	-0,587	0,095
<i>Umc2165</i>	0,567	0,780	0,491
<i>Umc1847</i>	0,796	0,890	0,462
<i>Umc1653</i>	0,303	0,600	0,426
<i>Mmc0501</i>	0,561	0,745	0,419
<i>Umc1524</i>	0,276	0,518	0,335
<i>Umc2164</i>	0,756	0,859	0,419
Média	0,413	0,603	0,381

Os locos com déficit de heterozigotos podem estar sendo alvo da seleção direcionada juntamente com os locos para características agrônômicas de interesse em determinados genótipos. Este é um aspecto que merece ser investigado.

O valor alto e positivo para o coeficiente F_{IT} ($F_{IT} = 0,603$; Quadro 12) reflete a endogamia global determinada por cruzamentos não causais presente nos 31 genótipos de milho pipoca e provavelmente deve ser resultado de eventos de autopolinização em processos de seleção.

As frequências diferentes dos alelos e os valores altos e baixos para a heterozigosidade observada e esperada nos diferentes genótipos determinaram uma diferenciação genética muito alta entre os 31 genótipos. De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} superiores a 0,25 indicam divergência interpopulacional muito alta e valores de F_{ST} no intervalo 0,15 – 0,25 indicam divergência interpopulacional alta. Apenas em 2 locos os valores de F_{ST} foram inferiores a 0,15 (*Umc1549* e *Umc1072*), permitindo concluir que os 31 genótipos de milho pipoca analisados no presente estudo são altamente diferenciados para os 30 locos *SSR*, formando populações geneticamente estruturadas. A maior diferenciação genética foi evidente no loco *Umc2118* ($F_{ST} = 0,545$; Quadro 12). Esse *primer* é, portanto, o mais adequado ao usado para diferenciar os 31 genótipos no que se refere à frequência diferencial dos alelos desse loco.

De acordo com Bracco et al. (2009), a caracterização genética de cultivares de milho pipoca da Argentina tem mostrado uma alta diferenciação entre as populações de regiões diferentes. Em algumas populações, foi descrito um excesso de homozigotos, a exemplo do verificado no presente estudo.

A alta diferenciação genética entre os 31 genótipos também é observada pela presença de alelos exclusivos de alguns genótipos. O genótipo 6-ARZM 07 049 apresentou um alelo exclusivo (3) com uma frequência de 0,154 para o loco *Mmc0271*. O genótipo 7- BOZM 260 apresentou um alelo exclusivo (4) no loco *Umc1415*, com uma frequência de 0,033 (Figura 3).

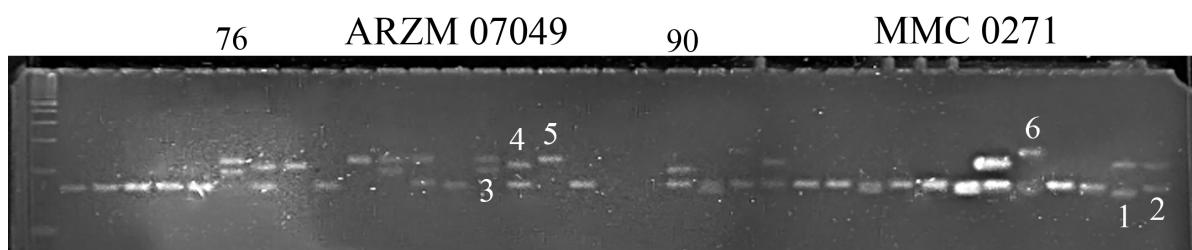


Figura 3 - Amplificação usando o *primer Mmc0271* (Marcador *Laeder* 100pb). De 76 a 90: indivíduos da população ARZM 07049; 3: alelo exclusivo desta população.

4.3. Análise de variância molecular

A análise de variância molecular das 31 populações de milho pipoca deste estudo revelou que a maior parte da variação (60%) está em nível intrapopulacional. Uma porcentagem menor (40%) foi encontrada entre as populações (Figura 4). Resultados similares foram encontrados por Reif et al. (2003), utilizando marcadores SSR em populações de milho tropical (89,8% dentro das populações e 10,2% entre populações).

Porcentagem de variância molecular

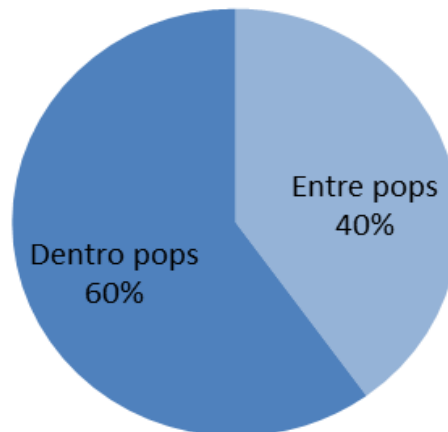


Figura 4 – Análise de variância molecular de 31 populações de milho pipoca utilizando o software GenAIEx.

4.4. Abordagem bayesiana

A estrutura genética das populações também foi avaliada com uma abordagem bayesiana, analisando os SSR com o programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000).

O número de *clusters* foi determinado pelo método proposto por Evanno et al. (2005). Para essa análise, foram realizadas 10 réplicas para cada valor de K e testado de K= 2 a K= 8 para encontrar o K ótimo. Em seguida, os agrupamentos foram definidos por meio do delta K. O K escolhido é aquele que apresenta o maior valor. O maior delta K encontrado permitiu a escolha de K igual a 3 *clusters* (Quadro 13, Figura 5).

Quadro13 – Quantidade de K *clusters* testados e valor de Delta K

K	Reps	Delta K
2	10	—
3	10	22.095,317
4	10	4.848,595
5	10	0,005778
6	10	0,507667
7	10	2.564,595
8	10	—

Como já mencionado, a determinação do valor ótimo de K *clusters* indicou que os indivíduos se agruparam em 3 *clusters*. No Quadro 14, estão demonstradas as porcentagens dos indivíduos de cada população pertencentes a cada *cluster*. Quase todas as populações tiveram mais que 60% dos seus indivíduos claramente identificados em cada um dos três grupos estimados, exceto as populações 3-URUG 298 e 27-COLOMBIANA, com 46% e 44% respectivamente.

MELHORAR A FIGURA

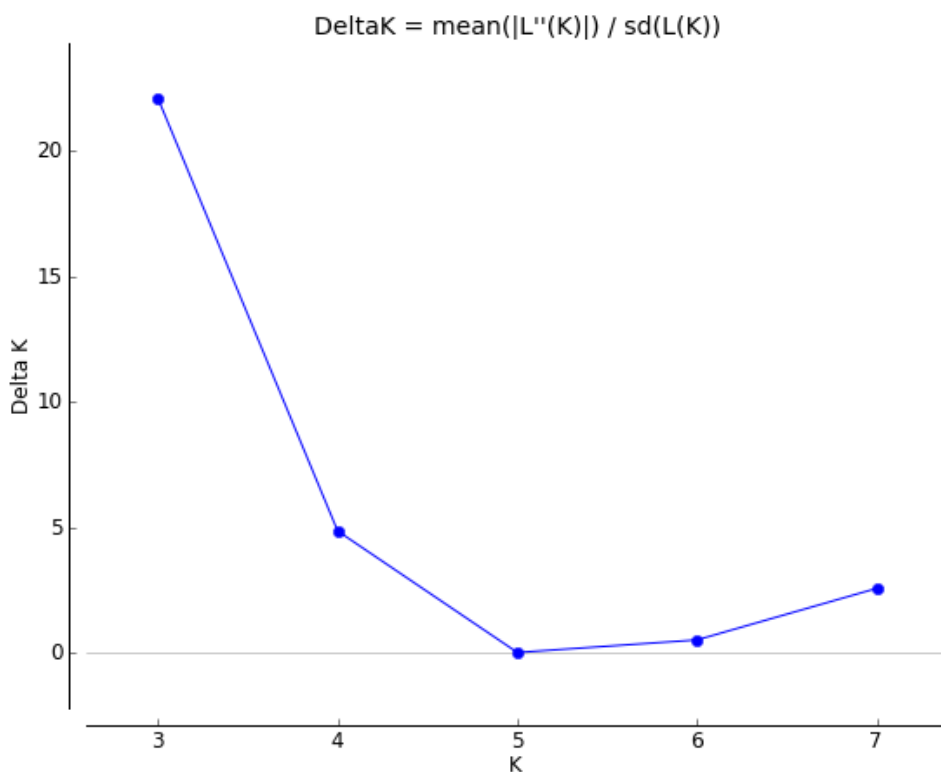


Figura 5 - Determinação de K ótimo de acordo com a metodologia de Evanno et al. (2005).

Quadro14 – Proporção da participação de cada população em cada um dos três *clusters*

Populações	<i>Clusters</i>		
	1	2	3
1- CHZM 13 0134	0,031	0,107	0,863
2- ARZM 13 050	0,025	0,063	0,911
3- URUG 298	0,213	0,326	0,461
4- ARZM 05 083	0,064	0,809	0,126
5- PARA 172	0,028	0,054	0,918
6-ARZM 07 049	0,066	0,145	0,789
7- BOZM 260	0,06	0,056	0,884
8- BOYA 462	0,058	0,035	0,907
9- IAC-125	0,839	0,108	0,053
10- IAC-112	0,969	0,014	0,017
11- JADE	0,971	0,017	0,012
12- Zélia	0,978	0,011	0,011
13- ARGENTINA	0,839	0,132	0,03
14- SE 013	0,166	0,802	0,032
15- Viçosa	0,039	0,872	0,089
16- RS-20	0,013	0,969	0,018
17- BEIJA-FLOR	0,058	0,896	0,046
18- UNB-2UC1	0,045	0,831	0,124
19- UNB-2UC2	0,022	0,905	0,072
20- UENFV-Explosivo C4	0,13	0,603	0,267
21- UNB-2UC3	0,097	0,261	0,642
22- PA 091	0,049	0,263	0,688
23- PR-023	0,068	0,217	0,715
24- BRS ANGELA	0,166	0,151	0,684
25- SAM	0,295	0,083	0,622
26- PARA 170	0,057	0,057	0,885
27- COLOMBIANA	0,445	0,209	0,346
28- TATU 1	0,013	0,033	0,954
29- UNB-2U C0	0,147	0,153	0,7
30- UFVM2-Barão Viçosa	0,098	0,08	0,822
31- TATU 2	0,066	0,018	0,916

Na Figura 6, pode-se observar a distribuição das populações nos 3 *clusters* representados pelas cores azul, verde e vermelho. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas.

Silva (2008) fez uso de marcadores microssatélites para analisar a variabilidade genética de 25 genótipos de milho pipoca, dos quais 11 fazem parte do presente estudo. Mediante análise utilizando a metodologia de Tocher, observou a formação de quatro grupos, sendo que 21 genótipos foram alocados em um único

grupo e concluiu que, se dependesse apenas da informação gerada pela aplicação da referida metodologia, seria plausível dizer que a maioria das variedades guarda uma similaridade genética relativamente grande entre si.

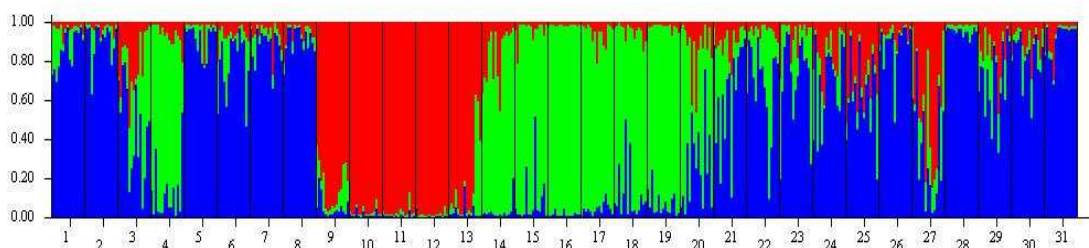


Figura 6 – Estrutura “bar plot” populacional, baseada em 30 locos microssatélites para as 31 populações de milho pipoca. A estrutura mostra a distribuição das populações dentro dos K clusters. Cada cor representa um cluster diferente. O número das populações corresponde ao do Quadro 1.

Obsevando o Quadro 14, que mostra a porcentagem dos indivíduos de cada população pertencentes a cada cluster e estipulando um ponto de corte de 0,7, identificamos quais populações pertencem a cada cluster (Quadro 15). Estes dados serão discutidos posteriormente.

Quadro15 – Populações de milho pipoca dentro dos k clusters

<i>Cluster1</i>	<i>Cluster2</i>	<i>Cluster3</i>
9- IAC-125	4- ARZM 05 083	1- CHZM 13 0134
10- IAC-112	14- SE 013	2- ARZM 13 050
11- JADE	15- Viçosa	5- PARA 172
12- Zélia	16- RS-20	6-ARZM 07 049
13- ARGENTINA	17- BEIJA-FLOR	7- BOZM 260
	18- UNB-2U C1	8- BOYA 462
	19- UNB-2U C2	23- PR-023
		26- PARA 170
		28- TATU 1
		29- UNB-2U C0
		30- UFVM2-Barão Viçosa
		31- TATU 2

4.5. Distância genética, agrupamento hierárquico e análise de coordenadas principais

O nível de divergência genética calculada pelo coeficiente de distância genética de Rogers (1972) entre os 31 genótipos mediante análise dos 30 locos SSR (Quadro 16) está indicado no dendograma da Figura 7.

Quadro 16 - Matriz de distância genética de Rogers (1972) obtida com dados da avaliação de microssatélites para os 31 genótipos de milho pipoca. O número das populações corresponde ao do Quadro 1

	POP1	POP2	POP3	POP4	POP5	POP6	POP7	POP8	POP9	POP10	POP11	POP12	POP13	POP14	POP15	POP16	POP17	POP18	POP19	POP20	POP21	POP22	POP23	POP24	POP25	POP26	POP27	POP28	POP29	POP30	POP31
POP1	***																														
POP2	0,346	***																													
POP3	0,388	0,326	***																												
POP4	0,447	0,449	0,383	***																											
POP5	0,424	0,372	0,366	0,446	***																										
POP6	0,418	0,33	0,39	0,481	0,299	***																									
POP7	0,388	0,267	0,335	0,446	0,334	0,281	***																								
POP8	0,463	0,353	0,393	0,544	0,398	0,301	0,283	***																							
POP9	0,517	0,446	0,358	0,409	0,456	0,404	0,422	0,409	***																						
POP10	0,547	0,491	0,415	0,51	0,489	0,441	0,463	0,455	0,341	***																					
POP11	0,499	0,505	0,405	0,491	0,561	0,494	0,503	0,52	0,361	0,343	***																				
POP12	0,57	0,487	0,403	0,491	0,524	0,459	0,469	0,508	0,329	0,202	0,307	***																			
POP13	0,505	0,431	0,415	0,49	0,525	0,427	0,458	0,494	0,377	0,419	0,301	0,333	***																		
POP14	0,436	0,404	0,331	0,425	0,452	0,418	0,374	0,44	0,348	0,439	0,403	0,405	0,395	***																	
POP15	0,46	0,37	0,396	0,461	0,474	0,408	0,361	0,433	0,442	0,489	0,493	0,468	0,455	0,372	***																
POP16	0,554	0,45	0,453	0,555	0,504	0,422	0,421	0,471	0,468	0,514	0,528	0,513	0,512	0,407	0,327	***															
POP17	0,469	0,375	0,342	0,481	0,401	0,387	0,342	0,405	0,407	0,449	0,449	0,445	0,427	0,379	0,324	0,355	***														
POP18	0,422	0,349	0,293	0,393	0,35	0,314	0,306	0,344	0,374	0,424	0,439	0,448	0,441	0,324	0,337	0,342	0,261	***													
POP19	0,45	0,372	0,356	0,393	0,381	0,367	0,343	0,449	0,427	0,461	0,493	0,492	0,464	0,337	0,372	0,371	0,347	0,276	***												
POP20	0,431	0,319	0,308	0,424	0,351	0,326	0,336	0,412	0,413	0,372	0,401	0,384	0,38	0,332	0,313	0,37	0,301	0,264	0,254	***											
POP21	0,417	0,326	0,324	0,426	0,302	0,304	0,334	0,362	0,39	0,401	0,44	0,429	0,429	0,374	0,359	0,405	0,349	0,275	0,336	0,188	***										
POP22	0,417	0,368	0,342	0,314	0,345	0,362	0,333	0,408	0,42	0,428	0,502	0,502	0,494	0,438	0,428	0,472	0,409	0,318	0,343	0,336	0,286	***									
POP23	0,371	0,347	0,313	0,425	0,338	0,387	0,343	0,422	0,422	0,468	0,498	0,515	0,505	0,375	0,392	0,439	0,363	0,363	0,358	0,322	0,288	0,308	***								
POP24	0,418	0,292	0,328	0,441	0,356	0,356	0,343	0,378	0,379	0,412	0,409	0,418	0,401	0,364	0,372	0,436	0,375	0,33	0,369	0,297	0,3	0,374	0,319	***							
POP25	0,457	0,397	0,402	0,513	0,49	0,444	0,425	0,423	0,415	0,427	0,43	0,449	0,432	0,482	0,413	0,387	0,412	0,431	0,446	0,394	0,394	0,459	0,386	0,311	***						
POP26	0,421	0,356	0,402	0,481	0,398	0,389	0,364	0,434	0,5	0,488	0,483	0,442	0,513	0,443	0,482	0,501	0,437	0,421	0,37	0,363	0,383	0,406	0,41	0,385	0,443	***					
POP27	0,455	0,359	0,402	0,546	0,403	0,364	0,384	0,457	0,431	0,452	0,392	0,421	0,366	0,406	0,383	0,397	0,363	0,355	0,405	0,308	0,315	0,453	0,45	0,382	0,369	0,378	***				
POP28	0,424	0,372	0,44	0,486	0,405	0,487	0,398	0,532	0,525	0,557	0,553	0,506	0,514	0,412	0,498	0,526	0,43	0,43	0,356	0,399	0,417	0,437	0,396	0,416	0,491	0,375	0,456	***			
POP29	0,368	0,315	0,343	0,461	0,41	0,382	0,344	0,418	0,401	0,421	0,426	0,461	0,426	0,435	0,33	0,413	0,335	0,316	0,356	0,303	0,313	0,329	0,337	0,348	0,392	0,404	0,36	0,435	***		
POP30	0,45	0,394	0,375	0,479	0,368	0,373	0,381	0,393	0,402	0,371	0,474	0,431	0,517	0,476	0,408	0,418	0,398	0,359	0,352	0,324	0,312	0,346	0,372	0,375	0,402	0,429	0,435	0,439	0,288	***	
POP31	0,554	0,447	0,472	0,579	0,545	0,548	0,482	0,492	0,515	0,528	0,529	0,571	0,436	0,526	0,489	0,518	0,455	0,494	0,439	0,439	0,507	0,48	0,489	0,421	0,402	0,503	0,474	0,417	0,385	0,451	***

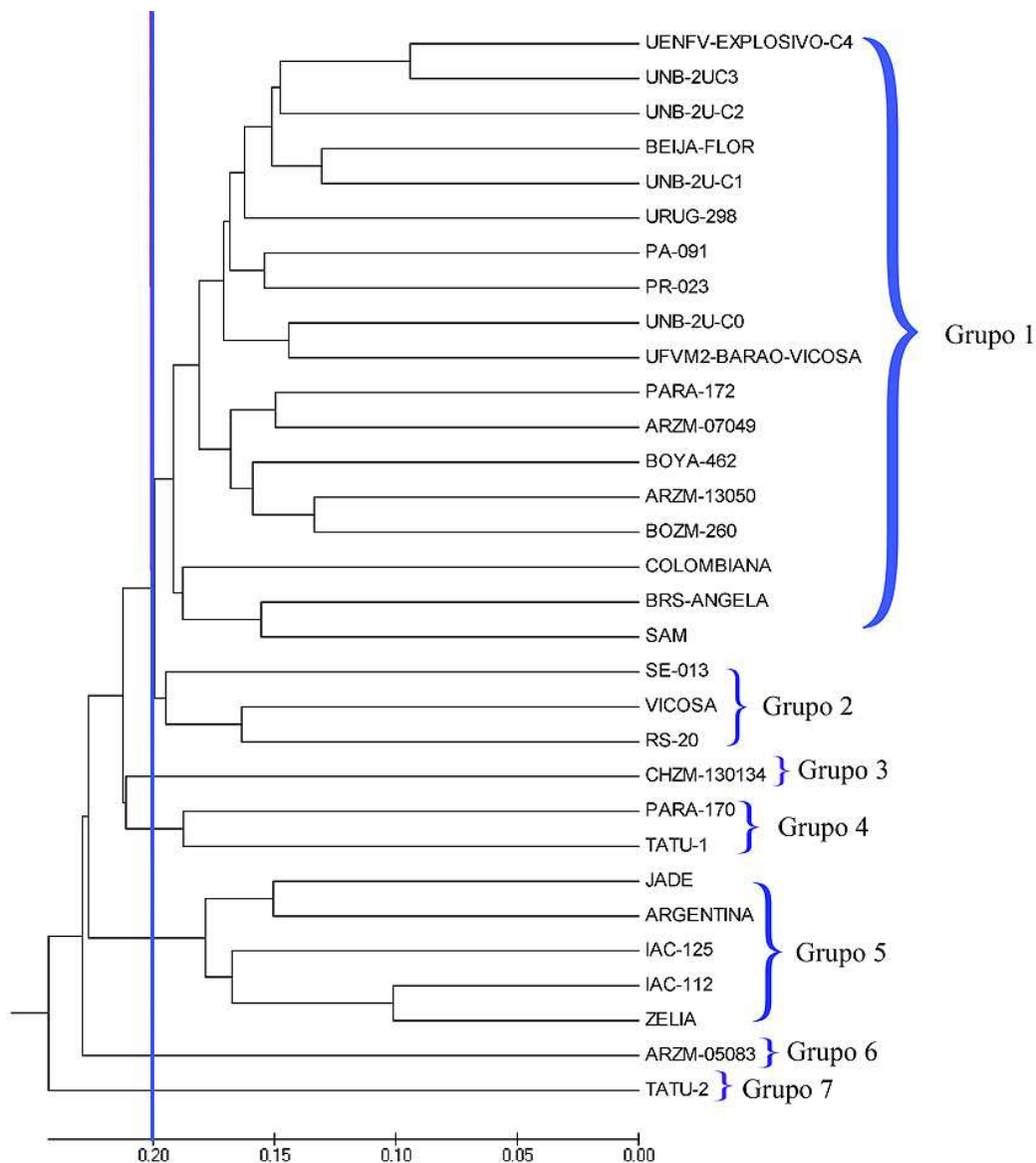


Figura 7 - Distância genética entre os 31 genótipos de milho pipoca (Rogers, 1972). A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA, empregando o programa Mega 5. 05.

O dendrograma obtido pelo método UPGMA (Figura 7) revelou a presença de um grupo inicial formado por 18 genótipos. Os cinco acessos provenientes da Universidade Estadual do Norte Fluminense ficaram alocados neste primeiro grupo, sendo eles: 18- UNB-2U C1; 19- UNB-2U C2; 20- UENFV-Explosivo C4; 21- UNB-2U C3; e 29- UNB-2U C0. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Amaral Junior et al. (2011), que trabalharam com marcadores moleculares ISSR e

acessos de milho comum, pipoca, doce, teosinte e *Tripsacum*, alocando esses mesmo cinco acessos no grupo três de seu dendograma. Oliveira (2010), levando em consideração apenas estes cinco acessos e utilizando o marcador molecular ISSR, observou a formação de dois grupos por meio do método UPGMA. O primeiro grupo, formado pelos acessos UNB-2U C2; UNB-2U C3 e UENFV-Explosivo e o segundo grupo formado pelos acessos UNB-2U C0 e UNB-2U C1. Estes dados estão de acordo com os resultados do presente trabalho, onde UNB-2U C2, UNB-2U C3 e UENFV-Explosivo estão mais próximos em relação ao acesso UNB-2U C0 e ao acesso UNB-2U C1 (Figura 7).

Seis dos nove acessos provenientes do CIMMYT fazem parte do primeiro grupo, sendo eles: 2- ARZM 13 050; 3- URUG 298; 5- PARA 172; 6-ARZM 07 049; 7- BOZM 260; e 8- BOYA 462. Os acessos 1 - CHZM 130134 e 4 – ARZM 05083 ficaram alocados sozinhos nos grupos três e seis, respectivamente, e o acesso 26 – PARA 170 ficou alocado no grupo quatro. Oliveira (2010), trabalhando com ISSR e com 34 acessos de milho pipoca, entre eles os nove acessos utilizados no presente trabalho provenientes do CIMMYT, obteve cinco grupos principais pelo método UPGMA. Estas nove populações ficaram alocadas nos grupos da seguinte forma: URUG 298 no grupo 1; BOYA 462, PARA 172 e CHZM 13 0134 no grupo 2; ARZM 05 083 no grupo 3; ARZM 07 049 e ARZM 13 050 no grupo 4 e BOZM 260 e PARA 170 no grupo 5. Esta diferença pode ser devido ao fato do marcador ISSR ter uma base genética diferente do marcador SSR.

No segundo grupo, foram reunidos os acessos 14- SE 013; 15- Viçosa e 16- RS-20, estes três acessos também ficaram reunidos no mesmo *cluster* de acordo com a metodologia de Evanno et al. (2005).

No quinto grupo encontram-se os acessos brasileiros comerciais 9- IAC-125, 10- IAC-112, 11- Jade e 12- Zélia, e o acesso 13- Argentina. É oportuno destacar que este grupo corresponde exatamente ao *cluster* 1, obtido com o programa STRUCTURE e utilizando a metodologia de Evanno et al. (2005).

Os genótipos Jade e Zélia são híbridos triplos desenvolvidos pela empresa DuPont do Brasil S.A. Pionner sementes, a partir de mesclas entre germoplasma temperado e tropical. O híbrido IAC-112 foi desenvolvido por Eduardo Sawazaki, no Instituto Agrônomo de Campinas e tem origem na combinação de linhagens da variedade SAM, com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani e Viçosa Amarelo. A variedade SAM foi introduzida pelo IAC, em 1941, sendo

proveniente de *South American*, raça de origem Argentina, e melhorada nos Estados Unidos da América (Sawazaki, 1995). O Genótipo IAC – 125 é um híbrido *topcross* também proveniente do Instituto Agronômico de Campinas.

Em consonância com o que ocorreu no presente trabalho, com a presença de parte dos materiais comerciais no quinto grupo, Munhoz et al. (2009), ao avaliarem a diversidade entre acessos de milho pipoca por marcadores RAPD, e Amaral Junior et al. (2011), que trabalharam com marcadores moleculares ISSR e acessos de milho comum, pipoca, doce, teosinte e *Tripsacum*, verificaram o agrupamento de materiais comerciais.

No trabalho de Silva et al. (2009), os quais fizeram uso de marcadores microsatélites para analisar a variabilidade genética de 25 genótipos de milho pipoca, ocorreu uma situação contundente: todos os genótipos comerciais desenvolvidos no país estiveram alocados em um único grupo, pelo método de Tocher.

Resultados semelhantes foram apresentados por Santacruz-Varela et al. (2004) para os E.U.A. Os autores avaliaram a distância genética de 56 acessos de milho pipoca provenientes de 10 países (inclusive o Brasil) e os resultados foram baseados em 29 características morfológicas, 18 locos isoenzimáticos e 31 *primers* SSR (“simple sequence repeat”). Houve o reconhecimento de três grupos: i) “Yellow Pearl Popcorn”, onde ficaram alocados os acessos do mais importante grupo comercial dos E.U.A.; ii) “North American Pointed Rice Popcorns”, que provavelmente se originou de complexo de raças tradicionais de milho pipoca da América Latina; e iii) “North American and North American Early Popcorn”, que têm grande relação com os tipos duro de milho e apresenta característica de maturidade precoce.

De acordo com Oliveira (2010), a reunião de cultivares recomendadas no país no mesmo grupo, associada aos demais resultados com marcadores moleculares e características morfoagronômicas, representa um alerta para os poucos melhoristas de milho pipoca do Brasil, evidenciando a necessidade de aumentar a diversidade genética entre programas de melhoramento realizados por instituições públicas e privadas.

Carvalho et al. (2004), baseados na divergência genética entre 81 acessos de milho comum (“landraces” mantidas por agricultores no sul do Brasil) avaliada com o marcador RAPD, concluíram que o tipo de agricultura praticada pelos

pequenos agricultores de milho tem contribuído para a manutenção da variabilidade genética, pois o isolamento de produção é uma prática regular. Estes resultados podem ser úteis para estabelecer e manter coleções de germoplasma de milho “landraces”, podendo servir como fontes para elaboração de estratégias de melhoramento.

Os acessos TATU 1 e TATU 2, pelo método UPGMA, foram alocados em grupos distintos. Ambos são oriundos da UEM e foram disponibilizados por produtores rurais na região Oeste do Paraná. Eles apresentam algumas distinções, como a cor do endosperma, que no acesso TATU 1 é preto e roxo e no acesso TATU 2 é branco, porém, utilizando a metodologia de Evanno et al. (2005), ambos ficaram alocados no mesmo *cluster*.

O coeficiente de correlação cofenética obtido entre a distância genética de Rogers (1972) e a matriz de distância cofenética, obtida a partir do dendograma, foi de elevada magnitude (0,99), evidenciando consistência do agrupamento.

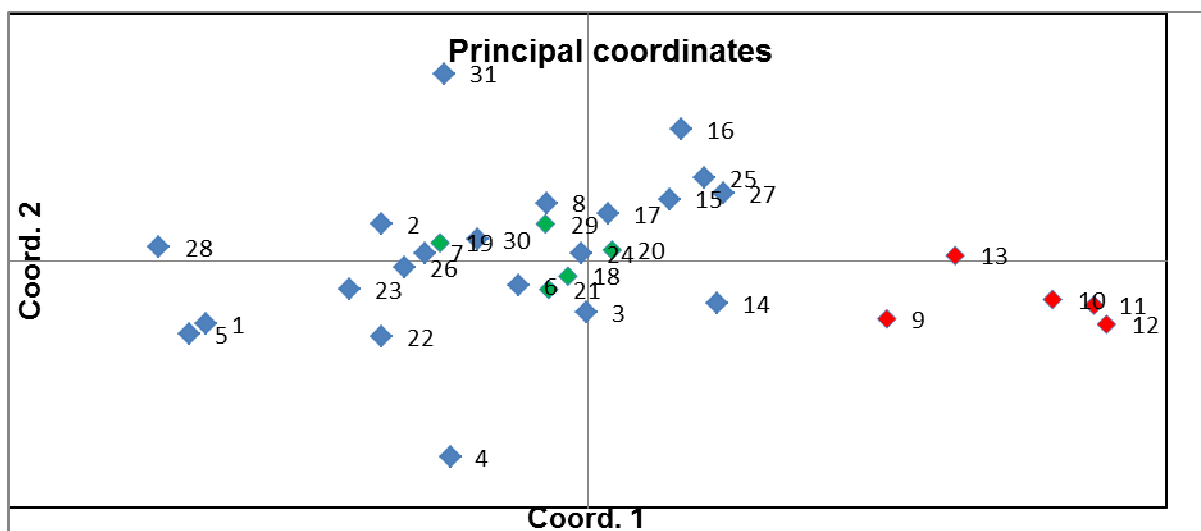


Figura 8 – Análise de coordenadas principais (PCA) via matriz de distancia de Nei (1972) programa GenAlEx. O número das populações corresponde ao do Quadro 1.

A análise de coordenadas principais pode ser utilizada para verificar a dispersão dos indivíduos num plano de segunda ou terceira dimensão. É um método de dimensionamento que se inicia com a matriz de semelhanças ou diferenças entre um conjunto de indivíduos e visa a produzir uma baixa parcela dimensional gráfica

dos dados, de tal forma que as distâncias entre os pontos estejam perto da dissimilaridade original (Mohammadi e Prasanna, 2003; Mingoti, 2007).

É possível observar, na figura 8, que os acessos 9- IAC-125, 10- IAC-112, 11- Jade, 12- Zélia e 13- Argentina (marcados em vermelho) formam um grupo separado dos demais, concordando com as metodologias de Evanno (2005) e UPGMA.

Grande parte dos acessos está agrupado na região central, o que mostra uma proximidade entre eles. Os acessos marcados em verde são provenientes da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Os acessos mais similares, com base na matriz de dissimilaridade (Quadro 16), foram 20 - UENFV-Explosivo C4 e 21- UNB-2U C3, distantes em 0,188, e os mais divergentes foram 4- ARZM 05 083 e 31- TATU 2, distantes em 0,579. Estes resultados estão de acordo com os resultados da PCA, uma vez que as populações 4- ARZM 05 083 e 31- TATU 2 estão separadas das demais e em pólos opostos do gráfico (Figura 8). Estes resultados também podem ser observados na figura 9 que representa a distância genética de Nei.

O segundo par de acessos mais divergentes é 12- Zélia e 31- TATU 2, distantes em 0,571 (Quadro 16 e Figura 9). Resultados muito semelhantes foram encontrados por Oliveira (2010), que trabalhou com marcadores moleculares ISSR e com os mesmos acessos do presente estudo. Em seu estudo, os acessos mais divergentes, TATU 2 e Zélia, foram separados por uma distância de 0.48.

A diagonal da figura 9 representa a variabilidade genética dentro de cada população: quanto maior a intensidade da cor laranja maior a variabilidade. É possível observar que a população 7- BOZM 260 é a que apresenta a maior variabilidade (laranja escuro). Esta população apresentou 100% de locos polimórficos e a maior heterozigidade observada. A alta heterozigidade pode ser um aspecto interessante, porque uma heterozigidade alta em populações de plantas pode prevenir uma resposta uniforme e conferir variação genética adaptativa para escapar de efeitos contrários que comprometam o seu desenvolvimento e manutenção (Allendorf e Luikart, 2007). A menor variabilidade foi apresentada pela população 31 – TATU 2 (Figura 9, cor branca), que apresentou a menor proporção de locos polimórficos (26,67%), com 20 locos em homozigose, e a menor heterozigidade observada (0,071).

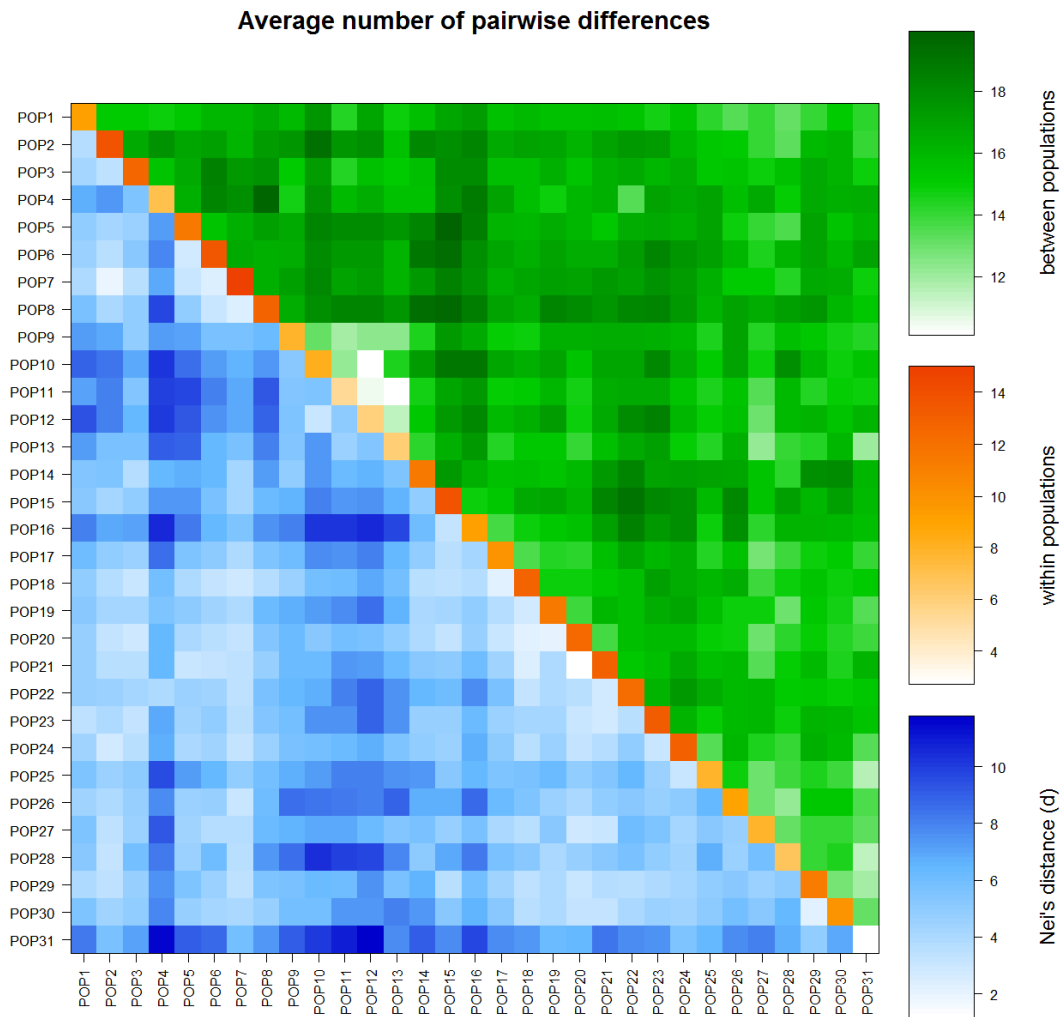


Figura 9 - Distância genética de Nei 1972 (em azul) para cada par de populações. A diagonal representa a variabilidade genética dentro de cada população. Programa Arlequin 3.5.

Baseados na hipótese de associação entre heterose e a frequência de locos heterozigóticos afetando a característica, Hallauer et al. (1988) sugeriram a predição da heterose com base em marcadores moleculares. Rinald et al. (2007), trabalhando com oito populações de milho pipoca, encontraram correlação positiva e significativa entre heterose e diversidade genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD, para os caracteres massa de grãos, altura de plantas, altura de espiga e prolificidade.

Reif et al. (2003) genotiparam 20 populações de milho com 83 marcadores microssatélites (SSR). Os valores de distâncias genéticas foram correlacionados com dados de heterose, obtidos por meio de cruzamentos dialélicos entre estas populações. Os valores de correlação foram positivos e significativos, variando de 0,18 a 0,56.

Desta forma, com base nos resultados aqui expostos, é possível supor que cruzamentos entre plantas do genótipo 4- ARZM 05 083 com plantas do genótipo 31- TATU 2, por exemplo, são promissores para ampliar a base genética de milho pipoca. Com base na hipótese de associação entre heterozigose e heterose anteriormente discutida e na correlação entre heterose e distância genética, estes dois genótipos, que apresentaram os maiores valores de distância genética entre si, podem ser aproveitados em programas de seleção recorrente recíproca, destinados à síntese de linhagens contrastantes que, intercruzadas, podem gerar híbridos superiores.

5. CONCLUSÕES

a) Os *primers* UMC1549 e UMC1072 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, além de apresentarem valores de heterozigosidade observada acima de 70%, podendo, portanto, serem apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em genótipos de milho pipoca.

b) A maior diferenciação genética foi obtida no loco *Umc2118*, sendo este o mais adequado para diferenciar os 31 genótipos, no que se refere à frequência diferencial dos alelos.

c) O genótipo 7- BOZM 260 apresentou heterozigosidade observada alta e pode ser considerado promissor para seleção continuada de progênes.

d) O genótipo 7- BOZM 260 apresentou maior proporção de locos polimórficos (100%), podendo ser recomendado para cruzamento com plantas que apresentem características agronômicas desejáveis, no sentido de ampliar a base genética de genótipos de milho pipoca.

e) Os 31 genótipos de milho pipoca analisados são altamente diferenciados para os 30 locos *SSR* analisados, formando populações geneticamente estruturadas.

f) Grande parte dos *clusters* indicados pela análise molecular agrupou materiais da mesma origem.

g) Considerando que a maior distância superou em mais de três vezes a menor distância, foi observada uma amplitude bastante apreciável da variabilidade entre os materiais, em função da dissimilaridade entre os genótipos.

h) Os genótipos 4- ARZM 05 083 e 31- TATU 2 são os mais divergentes geneticamente, permitindo inferir que a realização de cruzamentos entre eles pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de heterozigose, supondo uma estratégia voltada à seleção e exploração de heterose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWALL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, 27:617–631, 2008.

ALBUQUERQUE, A.M.A.; FERREIRA, R.L.C.; SILVA, J.A.A.; SANTOS, E.S.; STOSIC, B.; SOUZA, A.L. Estabilidade em análise de agrupamento: estudo de caso em ciência florestal. **Revista Árvore**, 30:257-265, 2006.

ALBUQUERQUE, M.S.M. **Marcadores moleculares e variabilidade genética em búfalos do Brasil**. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2005. 111p. Tese (Doutorado em Ciências).

ALEXANDER, E.D.; GREECH, R.G. Popcorn. In: SPRAGUE, G.F. **Corn and corn improvement**. New York: Academic Press, 1977. p. 385-386.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, p. 405-475, 1998. 574p.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Malden/Massachusetts: Copeia, 2007. 664p.

ALMEIDA, C.C.S. **Análise citogenética e molecular em milho (*Zea mays* subsp. *mays*), teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e seus híbridos**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).

ALMEIDA, C.; AMORIM, E.P.; NETO, J.F.B.; FILHO, J. A. C.; SERENO, M.J.C.M. Genetic variability in populations of sweet corn, common corn and teosinte. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 11: 64-69, 2011.

AMARAL JUNIOR, A.T.; OLIVEIRA, E.C.; GONSALVES, L.S.A.; CANDIDO, L.S.; SILVA, T.R.C.; VITORAZZI, C.; SCAPIM, C.A. Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, 10:15462-15469, 2011.

AZEVEDO, V.C.R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cp DNA 79 e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae.** Universidade de Brasília, Brasília, 2007. 202p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular).

BEADLE, G.W. Teosinte and the origin of maize. **Journal Heredity**, 30:235-247, 1939.

BECKMANN, M.Z.; LUZ, F.J.F.; PIVETTA, K.F.L. Marcador AFLP na identificação da diversidade genética de mini-roseiras. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 6:139-143, 2006.

BENNETZEN, J.; BUCKLER, E.; CHANDLER, V.; DOEBLEY, J.; DORWEILER, J. Genetic evidence and the origin of maize. **Latin American Antiquity**, 12:84-86, 2001.

BERED, F.; TERRA, T.F.; SPELLMEIER, M.; NETO, J.F.B. Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:418-425, 2005.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas.** Viçosa: UFV, 2005. 525p.

BRACCO, M.; LIA, V.V.; GOTTLIEB, A.M. HERNANDEZ, J.C.; POGGIO, L. Genetic diversity in maize landraces from indigenous settlements of Northeastern Argentina. **Genética**, 135:39–49, 2009.

BUCKLER, E.S.; HOLTSFORD, T.P. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. **Molecular Biology and Evolution**, 13:612-622, 1996.

CARVALHO, M.S.N. **Análise da variabilidade genética e da estrutura de populações de milho-pipoca (*Zea mays* L.) utilizando marcadores SSR(*Simple sequence repeated*).** Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 51p. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

CARVALHO, V.P.; RUAS, C.F.; FERREIRA, J.M.; ROSANGÉLA, M.P.M.; RUAS, P.M. Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. **Genetic and molecular Biology**, 27:228-236, 2004.

CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SHU, H.; SMITH, J.C.S. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, 39:866-873, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra Brasileira**: grãos. Décimo segundo levantamento, Brasília: CONAB, 2009. 34p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos. 9 levantamento, junho 2011. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília. CONAB, 2011. 45p.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA (CIB). **Guia do milho**. Tecnologia do campo a mesa. São Paulo. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf. Acesso em: 15, outubro, 2011.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Cultivares de milho disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2006/2007. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>. Acesso em: 14, abril, 2006.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. **Milho. Cultivares para 2008/2009**. Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>. Acesso em: 01, novembro, 2008.

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

DANDOLINI, T.S.; SCAPIM, C.A.; AMARAL Jr, A.T.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S.; MOTT, A.S.; LOPES, A.D. Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 8:313-320, 2008.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-475.

DOEBLEY, J.F. Molecular evidence and the evolution of maize. **Economic Botany**, 44:7-25, 1990.

DOEBLEY, J.F. The Genetics of Maize Evolution. **Annual Review of Genetics**, 38:37-59, 2004.

DOEBLEY, J.F.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). **Systematic Botany**, 9:203–218, 1984.

DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, 19:4008-4008, 1991.

DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. **Crop Science Society of America**, 1:3-7, 1994.

ECKERT, F.R. **Melhoramento genético do milho pipoca no Brasil**. Disponível em: [http:// www.ufv.br/dbg/bio240/milhopipocaEckert42100.htm](http://www.ufv.br/dbg/bio240/milhopipocaEckert42100.htm). Acesso em: 14, abril, 2006.

ELOI, I.B.O.; MANGOLIN, C.A.; SCAPIM, C.A.; GONÇALVES, C.S.; MACHADO, M.F.P.S. Selection of high heterozygosity-popcorn varieties in Brazil based on SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, 11:1851-1860, 2012.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Produtos – milho: variedade de milho**: Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/produtosmilho.php>. Acesso em: 29, novembro, 2009.

ERWIN, A.T. The origin and history of popcorn. **Agronomy Journal**, 41:53-56, 1949.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology** 14: 2611-2620, 2005.

FARIA, P.N. **Avaliação de métodos para determinação do número ótimo de clusters em estudo de divergência genética entre acessos de pimenta**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 54p. Dissertação (Mestrado em Estatística Aplicada e Biometria).

FARIA, V.R.; VIANA, J.M.S.; SOBREIRA, F.M.; SILVA, A.C. Seleção recorrente recíproca na obtenção de híbridos interpopulacionais de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43:1749-1755, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1996. 220p.

FRANZONI, J.; SCAPIM, C.A.; BEVILÁQUA, M.R.R.; MACHADO, M.F.P.S.; PACHECO, C.A.P.; MANGOLIN, C.A. Application of microsatellite markers to evaluate the heterozygosity from the popcorn composite CMS-43 (*Zea mays* L.) during eight cycles of selection. **Plant Breeding**, 131:479–485, 2012.

FREITAS JÚNIOR, S.P; AMARAL JÚNIOR, A.T; RANGEL, R.M.; VIANA, A.P. Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9:1-7, 2009.

FREITAS, F.O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 125p. Tese (Doutorado em Agronomia).

FREITAS, P.D. **Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares**: manual prático marcadores microssatélites. São Carlos: **Universidade de São Carlos** . 2005. 25p.

FUZATTO, S.R.; FERREIRA, D.F.; RAMALHO, A.M.P.; RIBEIRO, P.H.E. Divergência genética a sua relação com os cruzamentos dialélicos na cultura do milho. **Ciência e Agrotecnologia**, 26:22-32, 2002.

GALVÃO, J.C.C.; SAWAZAKI, E.; MIRANDA, G.V. Comportamento de híbridos de milho-pipoca em Coimbra. **Ceres**, 47:201-218, 2000.

GAUT, B.S.; DOEBLEY, J.F. DNA sequence evidence for thesegmental allotetraploid origin of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94:6809–6814, 1997.

GERALDI, I.O.; MIRANDA FILHO, J.B.; VENCOVSKY, R. Estimates of genetic parameters for tassel characters in maize (*Zea mays* L.) and breeding perspectives. **Maydica**, 30:1-3,1985.

GONÇALVES, M.L.; NETTO, M.L.A.; ZULLO, J.; COSTA, J.A.F. Classificação não-supervisionada de imagens de sensores remotos utilizando redes neurais auto-organizáveis e métodos de agrupamentos hierárquicos. **Revista Brasileira de Cartografia**, 60:17-29, 2008.

GOODMAM, M.M. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**: Botânica. Piracicaba:Esalq/Marprint, 1980. 650p.

GRANATE, M.J.; CRUZ, C.D.; PACHECO, C.A.P. Predição do ganho genético com diferentes índices de seleção no milho pipoca CMS-43. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:1001-1008, 2002.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 865-895.

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, 70:45–54, 1996.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1988. 468p.

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

HALLAUER, A.R. Temperate maize and heterosis. In: COORS, J.; PANDEY, S. (ed.). **Genetics and exploitation of heterosis in crops**. México: Madison, 1999. p. 353-361.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1994. 50p.

KANTETY, R.V.; ZENG, X.; BENNETZEN, J.; ZEHR, B.E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, 1:365-373,1995.

KRUG, C.A.; VIEGAS, G.P.; PAOLIERI, L. Híbridos comerciais de milho. **Bragantia**, 3:367-552, 1943.

LABORDA, P.R. **Diversidade genética entre linhagens de milho tropical**: estudo com base em marcadores moleculares. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003. 103p. Tese (Mestrado em Genética Vegetal e Melhoramento).

LEAL, A.A; MANGOLIN, C.A; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; SCAPIM, C.A; MOTT, A.S.; ELOI, I.B.O.; CORDOVÉS, V.; SILVA, M.F.P. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**, 9:9-18, 2010.

LI, Y.L.; WANG, Y.Z. ; CHEN, S.J. ; TANG, J.H. Study on the genetic diversity of popcorn inbreds and their germoplasm relationship with normal corn inbreds using SSR markers. **Maydica**, 49:327-333, 2004.

LIMA, M.W.P.; SOUZA, E.A.; RAMALHO, M.A.P. Procedimento para escolha de populações de milho promissoras para extração de linhagens. **Bragantia**, 59:153-158, 2000.

LIMA, S.F.A. **Variabilidade genética em populações de Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) da Amazônia brasileira, por meio de marcadores microssatélites**. Manaus: Ministério da Ciência e Tecnologia-MCT/Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, 2010. 75p. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva).

LIU, K.J.; GOODMAN, M.; MUSE, S.; SMITH, J.S.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, 165: 2117-2128, 2003.

LIU, K.J.; MUSE S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, 21:2128–2129, 2005a.

LIU, Y.J.; HUANG, Y.B.; RONG, T.Z.; TIAN, M.L.; YANG, J.P. Comparative analysis of genetic diversity in land-races of waxy maize from Yunnan and Guizhou using SSR markers. **Scientia Agricultura Sinica**, 4:648–653, 2005b.

LOPES, A.D. **Divergência genética entre linhagens de milho doce estimada por microssatélites**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. 52p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

LUZ, M.L.S.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; BRACCINI, A.L.; ROYER, M.R.; MORA, F. Influência da umidade das sementes na capacidade de expansão de três genótipos de milho pipoca (*Zea mays* L.). **Acta Scientiarum-Agronomy**, 27:549-553, 2005.

MACHADO, P.F. **Efeitos das condições de colheita e secagem sobre a capacidade de expansão de milho pipoca**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 41p. Tese (Mestrado em Fitotecnia).

MANGELSDORF, P.C. **Corn: Its origin, evolution and improvement**. Havard: Havard University Press, 1974. 262p.

MANGELSDORF, P.C.; GALINAT, W.C. Domestication of corn. **Science**, 143:538-545, 1964.

MANGELSDORF, P.C.; REEVES, R.G. The origin of Indian corn and its relatives. **Agricultural Experiment Stations**, 574:1-315, 1939.

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, G.J.; BUCKLER, E.S.; DOEBLEY, J.F. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99:6080–6084, 2002.

MATTA, F.P.; VIANA, J.M.S. Testes de capacidade de expansão em programas de melhoramento de milho pipoca. **Scientia Agricola**, 58:845-851, 2001.

MEIRELES, P.G. **Divergência genética entre linhagens de milho estimada por microssatélites e correlação com desempenho de híbridos simples**. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista, 2009. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia).

MINGOTI, A.S. **Análise de dados através de métodos de estatística multivarida**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2007. 295p.

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

MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, 43:1235-1248, 2003.

MOLL, R.H.; LONNQUIST, J.H.; FORTUNA, J.V.; JOHNSON, E.C. The relation of heterosis and genetic divergence in maize. **Genetics**, 52:139-144, 1965.

MUNHOZ, R.E.F.; PRIOLI, A.J.; AMARAL-JÚNIOR, A.T.; SCAPIM, C.A.; SIMON, G.A. Genetic distances between popcorn populations based on molecular markers and correlations with heterosis estimates made by diallel analysis for hybrids. **Genetics and Molecular Research**, 8:951-962, 2009.

NEI, M. Genetic distance between population. **The American Naturalist**, 106:83-292, 1972.

OLIVEIRA, E.C. **Marcadores ISSR na formação de grupos heteróticos e na inferência evolutiva de milho pipoca**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas).

OLIVEIRA, J.M.V. **O milho**. Lisboa: Clássica, 1984. 214p.

ORTIZ, R.; SEVILLA, R.; ALVARADO, G.; CROSSA, J. Numerical classification of related Peruvian highland maize races using internal ear traits. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 55:1055-1064, 2008.

PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.E.G.; PARENTONI, S.N.; SANTOS, M.S.; LOPES, M.A.; FERREIRA, A.S.; FERNANDES, F.T.; GUIMARÃES, P.E.O.; CORREA, L.A.; MEIRELLES, W.F.; FELDMAN, R.O.; MAGNAVACA, R. **BRS Angela: variedade de milho pipoca**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 2000. 6p. (Comunicado Técnico).

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semiautomatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 85p. Tese (Doutorado em Fitotecnia).

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, E. Avaliação da pureza em sementes de milho utilizando marcadores microssatélites. **Circular Técnica da Embrapa**, 30:65-67, 2003.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 491-552.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6:288-295. 2006.

PEREIRA, L.K. **Avaliação de heterozigosidade entre ciclos de seleção recorrente em um composto de milho pipoca por meio de marcadores isoenzimáticos**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2004. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

PINHEIRO, J.B.; ZUCCHI, M.I.; TELES, F.L.; ÁZARA, N.A. Diversidade genética molecular em acessos de açafrão utilizando marcadores RAPD. **Acta Scientiarum-Agronomy**, 25:195-199, 2003.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Eduem, 2009. 275p.

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

PIONEER. **Sementes**. Disponível em: <http://www.pioneersementes.com.br/produtosdetalhemilho.aspx?id=28>. Acesso em: 06, novembro, 2009.

PIPERNO, D.R.; FLANNERY, K.V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98:2101–2103, 2001.

PRITCHARD, J.K.; STEPHEENS, M.; DONNELLY, P. Interference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959, 2000.

QI-LUN, Y.; PING, F.; KE-CHENG, K.; GUANG-TANG, P. Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. **Journal of Genetics**, 87:287-291, 2008.

RANDOLPH, L.F. History and origin of corn. II. Cytogenetic aspects of the origin and evolutionary history of corn. In: SPRAGUE, G.F. (ed.) **Corn and corn improvement**. New York: Academic Press, 1955. p. 16-61.

RANGEL, R.M. **Dialelo circulante na avaliação de híbridos e na identificação de compostos superiores de milho-pipoca**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006. 127p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal).

RANGEL, R.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. SCAPIM, C.A. FREITAS JÚNIOR, S.P. PEREIRA, M.G. Genetic parameters in parents and hybrids of circulant diallel in popcorn. **Genetics and Molecular Research**, 6-4:1020-1030, 2008.

RANGEL, R.M.; AMARAL JUNIOR, A.T.; VIANA, A.P.; FREITAS JÚNIOR, S.P.; PEREIRA, M.G. Prediction of popcorn hybrid and composite means. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:288-296, 2007.

REEVIS, R.V.; MANGELSDORF, P.C. A proposed taxonomic change in the tribe Maydae. **American Journal of Botany**, 29:815-817, 1942.

REIF, J.C.; MELCHINGER, A.E.; XIA, X.C.; WARBURTON, M.L. Use of SSRs for establishing heterotic groups in subtropical maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:947-957, 2003.

RICCI, G.C.L.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M.S.; SCAPIM, C.A. Microsporogenesis in inbred line of popcorn (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Research**, 4:1013-1018, 2007.

RINALDI, D.A.; PIPOLO, V.C.; GRAGE, A.C.; RUAS, C.F.; JUNIOR, N.S.F.; SOUZA, A.; SOUZA, S.G.H.; GARBUGLIO, D.D. Correlação entre heterose e divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, 66:183-192, 2007.

RÖDER, M.S.; PLASCHKE, J.; KÖNIG, S.U.; BÖRNER, A.; SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular and General Genetics**, 246:327-333, 1995.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in genetics VII. **University of Texas**, 7213:145-153, 1972.

RUFFATO, S.; CORREA, P.C.; MARTINS, J.H.; MANTOVANI, B.H.M; SILVA, J.N. Efeito das condições de colheita, pré-processamento e armazenamento na qualidade do milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35:591-597, 2000.

SANTACRUZ-VARELA, A.; WIDRLECHNER, M.P.; ZIEGLER, K.E.; ALVADOR, R.J.; MILLARD, M.J.; BRETTING, P.K. Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. **Crop Science**, 44:456-467, 2004.

SANTANA, C.M.; MALINOVSKI, J.R. Uso da análise multivariada no estudo de fatores humanos em operadores de motosserra. **Cerne**, 8:101–107, 2002.

SANTOS, F.S.; AMARAL JUNIOR, A.T.; FREITAS JÚNIOR, S.P.; RANGEL, R.M.; PEREIRA, M.G. Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população UNB-2U sob seleção recorrente. **Bragantia**, 66:391-398, 2007.

SANTOS, F.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; FREITAS JÚNIOR, S.P.; RANGEL, R.M.; SCAPIM, C.A.; MORA, F. Genetic gain prediction of the third recurrent selection cycle in a popcorn population. **Acta Scientiarum Agronomy**, 30:651-655, 2008.

SAWAZAKI, E. **Melhoramento do milho pipoca**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1995. 21p.

SAWAZAKI, E. A cultura do milho pipoca no Brasil. **O Agrônomo**, 53:11-13, 2001a.

SAWAZAKI, E. **Tecnologia para produção de milho pipoca**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001b. 10b.

SCAPIM, C.A.; BRACCINI, A.L.; PINTO, R.J.B.; AMARAL Jr, A.T.; RODOVALHO, M.A.; SILVA, R.M.; MOTERLE, L.M. Componentes genéticos de médias e depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Ciência Rural**, 36:36-41, 2006.

SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; TONET, A.; BRACCINI, A.L.; PINTO, R.J.B. Análise dialéctica e heterose de populações de milho-pipoca. **Bragantia**, 61:219-230, 2002.

SEIFERT, A.L.; PIPOLO, C.V.; FERREIRA, J.M.; GERAGE, A.C. Análise combinatória de populações de milho pipoca em topcrosses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:771-778, 2006.

SERAFINI, L.A.; BARROS, M.N.; AZEVEDO, J.L. **Biologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Livraria e editora Agropecuária Ltda., 2001. 463b.

SHAH, Z.; MUNIR, I.; ALI, S.; IQBAL, A. MUNTAZ, S.; NWAZ, R.; SWAI, Z. A. Genetic diversity of Pakistani maize genotypes using chromosome specific simple sequence repeat (SSR) primer sets. **African Journal of Biotechnology**, 8:375-379, 2009.

SHIEH, G.J.; THSENG, E.S. Genetic diversity of Tainan-white maize inbred lines and prediction of single cross hybrid performance using RAPD markers. **Euphytica**, 124:307-313, 2002.

SILVA, T.A. **Divergência genética entre genótipos de milho-pipoca utilizando microssatélites em Bulk de DNA genômico**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. 54p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SILVA, T.A.; PINTO, R.J.B.P.; SCAPIM, C.A.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S.; CARVALHO, M.S.N. Genetic divergence in popcorn genotypes using microsatellites in bulk genomic DNA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 9: 31-36, 2009.

SILVA, W.J.; VIDAL, B.C.; MARTINS, M.E.Q. What makes popcorn pop. **Nature**, 362:417, 1993.

SMITH, J.S.C. Genetic diversity within the Corn Belt Dent racial complex of maize (*Zea mays* L). **Maydica**, 31:349-367, 1986.

SUSOL, E.; EYRE, S.; JOHN, S. High throughput genotyping of microsatellite markers. In: Hajjer A.; Worthington. J.; Jonh S. SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. **Eaton Publishing Natick**, 85-126, 2000.

SWIGONOVÁ, Z.; LAI, J.; MA, J.; RAMAKRISHNA, W.; LLACA, V.; BENNETZEN, J. L.; MESSING, J. Close Split of Sorghum and Maize Genome Progenitors. **Genome Research**, 14:1916–1923, 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17:6463-647, 1989.

TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: PENA, S.D.J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLIN, J.T.; JEFFREYS, A.J. **DNA fingerprinting: state of the science**. Birkhauser, Switzerland:Basel, 1993. p. 21–28.

TERRA, T.F.; WIETHÖLTER, P.; ALMEIDA, C.C.S.; SILVA, S.D.A.; BERED, F.; NETO, J.F.B. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. **Ciência Rural**, 41:205-211, 2011.

TRINDADE, A.P.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S.; PINTO, R.J.B. Genetic diversity underlying heterotic groups of popcorn lines of tropical and temperate germplasm determined by SSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, 13:1-9, 2010.

VENDRUSCOLO, E.C.G.; SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; OLIVEIRA, V. R.; BRACCINI, A.L.; VIDIGAL, M.C.G. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho-pipoca na região centro-sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:123-130, 2001.

VILARINHO, A.A.; VIANA, J.M.S.; SANTOS, J.R.; CÂMARA, T.M.M. Eficiência da seleção de progênies S1 e S2 de milho-pipoca, visando à produção de linhagens. **Bragantia**, 62:9-17, 2003.

WEATHERWAX, P. The pylogeny of Zea mays. **American Midland Naturalist**, 16:1-71, 1935.

WEILER, R.L.; BRUGNARA, E.C.; SCHWARZ, S.F.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, 40:1523-1529, 2010.

WIETHOLTER, P. **Análise da variabilidade genética em genótipos de milho crioulo**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 590p.

WU, Y.S.; ZHENG, Y.L.; SUN, R.; WU, S.Y.; GU, H.B.; BI, Y.H. Genetic diversity of waxy corn and popcorn land-races in Yunnan by SSR markers. **Acta Agronomica Sinica**, 30:36-42, 2004.

XIAO, J.; LI, J.; YUAN, L.; McCOUCH, S.R.; TANKSLEY, S.D. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 92:637-643, 1996.

ZIEGLER, K.E.; ASHMAN, B. Popcorn. In: HALLAUER, A.E. (ed.). **Specialty Corns**. London: CRC, 1994. p. 189-223.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. Milho-pipoca In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Piracicaba: ESALQ/Marprint. 1980. p. 339-717.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J.A. Milho-pipoca. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 413-717.

ANEXO

Anexo 1 - Lista de *primers* testados

	<i>Primer</i>	Polimorfismo
1	UMC 2245	
2	UMC 2075	
3	UMC 2145	
4	UMC 2034	
5	UMC 2237	
6	UMC 2191	
7	UMC 1279	
8	UMC 1685	
9	UMC 1917	
10	UMC 1512	
11	UMC 1336	Polimórfico
12	UMC 1495	
13	UMC 2255	
14	UMC 1397	
15	UMC 2246	Polimórfico
16	UMC 2352	
17	UMC 1431	
18	UMC 1383	
19	UMC 1370	
20	UMC 1703	
21	UMC 1380	
22	UMC 1288	
23	UMC 1668	
24	UMC 1472	
25	UMC 1819	
26	UMC 1458	
27	BNLG 1063	Polimórfico
28	UMC 1108	
29	UMC 1265	
30	UMC 2118	Polimórfico
31	MMC 0271	Polimórfico
32	UMC 1300	
33	UMC 2369	
34	UMC 2116	
35	BNLG 1447	Polimórfico
36	UMC 2249	
37	UMC 1003	Polimórfico
38	UMC 1604	Polimórfico
39	UMC 1755	Polimórfico
40	UMC 1504	

Anexo 1, cont.

41	UMC 2376	
42	UMC 1618	
43	UMC 2257	Polimórfico
44	BNLG 1175	Polimórfico
45	UMC 1465	
46	UMC 2205	Polimórfico
47	UMC 1399	
48	UMC 2267	
49	UMC 2254	
50	UMC 1057	
51	UMC 2023	
52	UMC 2274	
53	UMC 2166	Polimórfico
54	UMC 1528	
55	UMC 1637	
56	UMC 2085	
57	UMC 2102	
58	UMC 2108	Polimórfico
59	UMC 1065	Polimórfico
60	UMC 2259	
61	UMC 2214	
62	UMC 1071	Polimórfico
63	UMC 1635	Polimórfico
64	UMC 1823	
65	UMC 1363	Polimórfico
66	UMC 2227	
67	UMC 1272	
68	UMC 1318	Polimórfico
69	UMC 1354	
70	UMC 2339	
71	UMC 2233	
72	UMC 1754	
73	UMC 2408	
74	UMC 1286	
75	UMC 2198	
76	UMC 1320	
77	UMC 2248	
78	UMC 1696	
79	UMC 1555	
80	UMC 2266	
81	MMC 0001	
82	UMC 1118	Polimórfico
83	UMC 1277	

Anexo 1, cont.

84	UMC 2310	
85	UMC 1400	
86	UMC 1551	
87	UMC 2210	
88	UMC 1258	
89	UMC 2317	
90	UMC 1517	
91	UMC 2130	
92	UMC 1642	Polimórfico
93	UMC 1137	Polimórfico
94	UMC 1415	Polimórfico
95	UMC 2059	Polimórfico
96	UMC 1552	
97	UMC 1331	
98	UMC 1596	
99	UMC 2401	Polimórfico
100	UMC 1887	
101	UMC 1111	
102	UMC 1125	Polimórfico
103	UMC 2370	
104	UMC 2345	
105	MMC 0501	Polimórfico
106	UMC 1136	
107	UMC 2164	Polimórfico
108	UMC 1739	
109	UMC 2027	
110	UMC 1638	
111	UMC 1524	Polimórfico
112	UMC 2080	Polimórfico
113	UMC 2228	
114	UMC 1180	
115	UMC 2281	
116	UMC 1664	
117	UMC 1590	
118	UMC 2025	
119	UMC 1566	
120	UMC 1646	
121	UMC 1426	
122	UMC 1615	
123	UMC 2204	
124	UMC 1684	
125	UMC 1885	Polimórfico
126	UMC 1549	Polimórfico
127	UMC 1153	Polimórfico

Anexo 1, cont.

128	UMC 1661	
129	UMC 1246	
130	BNLG 2295	Polimórfico
131	UMC 1169	
132	UMC 2196	
133	UMC 1912	
134	UMC2302	Polimórfico
135	UMC 1268	
136	UMC 1505	
137	UMC 1414	
138	UMC 1117	
139	UMC 1072	Polimórfico
140	UMC 2352	
141	UMC 2293	
142	UMC 2165	Polimórfico
143	UMC 2389	
144	UMC 1357	
145	UMC 1719	Polimórfico
146	UMC 1582	
147	UMC 2357	Polimórfico
148	UMC 1152	
149	UMC 1496	Polimórfico
150	UMC 1847	Polimórfico
151	UMC 1279	
152	UMC 1711	
153	UMC 1653	Polimórfico
154	UMC 2211	
155	UMC 2206	
156	BNLG 1098	
157	UMC 2181	
158	UMC 2383	
159	UMC 1446	
