

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

BRUNA RODRIGUES

**Análise da diversidade genética entre linhagens de milho-pipoca**

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
MARÇO – 2015

BRUNA RODRIGUES

**Análise da diversidade genética entre linhagens de milho-pipoca**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
MARÇO – 2015



Aos meus pais, Helena Rodrigues e Hélio Rodrigues, pelo amor, apoio e sustentação nos momentos difíceis.

À minha irmã, Michelli Rodrigues Rigolin, que muito me apoiou.

Ao meu namorado, Vitor Hugo D. Tolentino, por sempre estar ao meu lado nas tarefas e decisões, com muita compreensão e amor.

Com muito amor, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor e presença constante.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realizar este Curso e por colaborar para que este se tornasse uma grande experiência de aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao professor doutor Ronald José Barth Pinto, pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo e, sobretudo, pela amizade e confiança.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, por toda confiança, paciência, compreensão e auxílio constante no laboratório e por sua grande amizade e carinho.

Ao professor doutor Carlos Alberto Scapim, pela esmerada coorientação e auxílio durante a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos de laboratório, em especial à Liriana, Vanessa, Andréa e Danuza, pelo auxílio neste trabalho e, sobretudo, pela amizade e pelos momentos de alegria.

À Camila Castro, pela ajuda coletas de campo, pelo seu apoio e principalmente pela amizade e carinho.

Às professoras, líderes do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, doutora Maria de Fátima Pereira da Silva Machado, doutora Claudete Aparecida Mangolin e doutora Sandra de Oliveira Collet, pela cessão do espaço e dos materiais necessários ao desenvolvimento deste trabalho e por todos os conselhos e experiências compartilhados.

Aos técnicos Leila e Sérgio, pela ajuda nos trabalhos de laboratório e pela amizade.

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

## **BIOGRAFIA**

Bruna Rodrigues, filha de Helena Rodrigues e Hélio Rodrigues, nasceu em 13 de agosto de 1988, na cidade de Maringá, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Fundamental, em dezembro de 2002, no Colégio Estadual Márcia Vaz Tostes de Abreu, na cidade de São Jorge do Ivaí, estado do Paraná, mesma Instituição de ensino que, em 2005, concluiu o Ensino Médio.

Em fevereiro de 2007, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Estadual de Maringá (UEM), cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em Janeiro de 2011.

Em março de 2013, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, estado do Paraná.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Características do milho-pipoca .....	4
2.2. Melhoramento do milho-pipoca .....	7
2.3. Diversidade genética, heterose, e grupos heteróticos .....	10
2.4. Marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética .....	13
2.5. Marcadores microssatélites ou SSR .....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Material vegetal.....	18
3.2. Extração de DNA .....	19
3.3. Quantificação do DNA.....	20
3.4. Amplificação do DNA .....	21
3.5. Medidas de distância genética.....	22
3.6. Método de agrupamento .....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
4.1. Seleção de <i>primers</i> .....	25
4.2. Dissimilaridade e distâncias genéticas.....	30
4.3. Métodos de agrupamento .....	31
4.4. Ajuste entre o dendrograma e a matriz de distâncias .....	36
4.5. Projeção das distâncias no plano e no espaço .....	37
4.6. Relação entre os agrupamentos e a genealogia das linhagens.....	39
4.7. Agrupamento e utilização do germoplasma .....	41
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## RESUMO

RODRIGUES, Bruna, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2015. **Análise da diversidade genética entre linhagens de milho-pipoca.** Orientador: Ronald José Barth Pinto. Coorientadores: Claudete Aparecida Mangolin e Carlos Alberto Scapim.

A divergência genética entre 15 linhagens de milho-pipoca foi estimada utilizando-se DNA genômico de sete plantas de cada genótipo. Para essa estimativa, foram utilizados 40 *primers* microssatélites distribuídos por todos os cromossomos. Os valores de PIC (Conteúdo de Informação do Polimorfismo) variaram de zero (Bnlg1297 e Umc2075) a 0,2061 (Mmc0181), com média de 0,0869. Um total de 128 alelos polimórficos foi detectado entre as linhagens. O número de alelo variou de 2 a 7 por loco, com uma média de 3,2 alelos por loco. A heterozigosidade média variou de 0,0176 a 0,2561. Os índices de dissimilaridade genética foram obtidos com base na frequência de alelos comuns às linhagens contrastadas. A matriz de dissimilaridade permitiu a realização das análises de agrupamento pelo método de Tocher modificado e pelos métodos do vizinho mais próximo, vizinho mais distante e UPGMA. Os coeficientes de correlação cofenética de cada agrupamento indicaram que o método UPGMA foi o mais adequado entre os modelos hierárquicos aglomerativos utilizados para discriminar as linhagens. Os resultados obtidos pela metodologia de Tocher modificada apontaram a presença de quatro grupos de linhagens, um dos quais constituído por dez genótipos. O número de grupos indicado pelo método UPGMA foi superior ao obtido sob a metodologia de Tocher, evidenciando vantagens práticas do método UPGMA. Grande parte dos *clusters* indicado pela análise molecular agrupou materiais de mesma origem. As linhagens 1 e 4, originadas, respectivamente, dos híbridos Colombiana e Zélia, manifestaram elevada dissimilaridade genética em relação às demais. Considerando os locos estudados, a grande distância genética, também evidenciada entre as linhagens 3 e 4, oriundas de IAC-125 e Zélia, respectivamente, permitiu indicá-las como genitoras de cruzamentos destinados à exploração prática da heterose.

**Palavras-chave:** variabilidade, linhagens, milho-pipoca, microssatélites.



## ABSTRACT

RODRIGUES, Bruna, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, march 2015. **Analysis of genetic diversity among popcorn inbred lines.** Advisor: Ronald José Barth Pinto. Committee members: Claudete Aparecida Mangolin and Carlos Alberto Scapim.

The genetic divergence among 15 popcorn lines was estimated using genomic DNA of seven plants of each genotype. For this estimate 40 microsatellite primers spread over all chromosomes were used. The PIC values (polymorphism information content) ranged from zero (Bnlg1297 and Umc2075) to 0,2061 (Mmc0181), with an average of 0,0869. A total of 128 polymorphic alleles were detected among the lines. The number of allele varied from 2 to 7 per locus with an average of 3,2 alleles per locus. The average heterozygosity ranged from 0,0176 to 0,2561. The rates of genetic dissimilarity were obtained based on the frequency of common alleles to contrasting lines. The matrix of dissimilarity allowed the performance of cluster analysis by the modified method of Tocher and the methods of nearest neighbor, furthest neighbor and UPGMA. The cophenetic correlation coefficients of each grouping methodology indicated that the UPGMA method was the most appropriated one to explain the varietal discrimination. The results obtained by the modified method Tocher showed the presence of four groups of lines, one of which consists of ten genotypes. The number of groups indicated by the UPGMA method was higher than that obtained under the Tocher method, showing practical advantages of UPGMA method. Despite some discrepancies, most of the clusters indicated by molecular analysis grouped materials of the same origin. The lines 1 and 4 derived from Colombiana and Zélia, respectively, showed great genetic dissimilarity in relation to the others. The lines 3 and 4 derived from IAC-125 and Zélia, respectively, expressed great genetic distance in the analyzed loci, making it possible on crosses intended to produce hybrids with the possibility of heterosis. Considering the studied loci, the large genetic distance between lines 3 and 4 allowed state them as parental genotypes to be used in the exploitation of heterosis.

**Keywords:** variability, inbred lines, popcorn, microsatellite markers.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais importantes na alimentação humana. Embora a espécie tenha sido submetida a um intenso processo de domesticação e seleção, sua variabilidade genética permite a continuidade das atividades de melhoramento.

Existem centenas de variedades de milho que incluem o milho comum e os vários tipos especiais de milho, entre eles, o milho-pipoca. Considerado primitivo, o milho-pipoca teria sido o primeiro a ser consumido, estourado em fogueiras antes da invenção das panelas (Granate et al., 2001).

O Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo, apresentando um grande potencial para a produção de milhos especiais (Bordallo et al., 2005), entre eles o milho-pipoca, alimento bastante apreciado no país.

A importância comercial e industrial do milho-pipoca foi reconhecida somente na metade do século XX, como resultado de uma grande demanda do produto, a qual estimulou a sua produção em larga escala (Ruffato et al., 1999).

As atividades de melhoramento do milho-pipoca no Brasil e nos E.U.A. iniciaram quase na mesma época (década de 1930). Contudo, o melhoramento no Brasil ainda depende de materiais geralmente derivados de programas americanos, cultivados no Brasil por produtores associados a empresas como Yoki e Hikari. Essas parcerias movimentam anualmente bilhões de dólares, no Brasil. Os dados da CONAB (2004) registraram que, com o lançamento de novas cultivares, as empresas empacotadoras vêm incentivando e financiando a produção de milho-pipoca. Isso ocorre por meio do sistema integrado com produtores, aumentando gradativamente a quantidade do produto no mercado interno e, portanto, reduzindo o volume de importações. Devido aos altos investimentos, o milho-pipoca é cultivado em diversas regiões do país, como no Sul, Sudeste, Centro Oeste, e Sul da Bahia (Rangel et al., 2007).

O reduzido número de cultivares é fator limitante para a expansão da cultura no Brasil (Scapim et al., 2002). Por isso, é necessário o desenvolvimento de cultivares adaptada às condições brasileiras, gerando pipocas de qualidade semelhante ou superior à verificada nas cultivares importadas (Coimbra et al., 2002).

Além da produtividade e de caracteres agronômicos de interesse, o melhoramento do milho-pipoca considera aspectos relacionados à qualidade do produto, como textura e maciez. Ao agricultor, interessa uma produtividade elevada e os demais atributos de uma boa variedade de milho normal. Ao consumidor, interessa uma alta capacidade de expansão (CE), que confere à pipoca melhor textura e maciez (Simon et al., 2004). Esses diferentes interesses podem constituir uma limitação no melhoramento da cultura, pois a capacidade de expansão está negativamente correlacionada com outros caracteres de importância econômica. Tal correlação dificulta o trabalho do melhorista, que precisa satisfazer tanto aos produtores quanto aos consumidores (Zinsly e Machado, 1978).

As populações de milho-pipoca pouco melhoradas apresentam grande depressão endogâmica, dificultando a obtenção de linhagens, alta suscetibilidade à helmintosporiose e à ferrugem, baixa qualidade de colmo e baixa capacidade de expansão dos grãos (Andrade, 1995; Coimbra, 2002).

As dificuldades enfrentadas no melhoramento do milho-pipoca vêm sendo gradativamente superadas (Scapim et al., 2006; Ricci et al., 2007; Cruz e Pereira Filho, 2008; Rocha et al., 2009). A maioria dos métodos de melhoramento aplicáveis ao milho comum pode ser utilizado para o milho-pipoca, sejam métodos intra ou interpopulacionais, bem como os métodos de desenvolvimento de híbridos de linhagens (Zinsly e Machado, 1978).

Num programa de melhoramento, o conhecimento do germoplasma disponível tem sido considerado um dos requisitos mais importantes para qualquer cultura, pois o sucesso depende da indicação da população mais promissora para a extração de linhagens (Lima et al., 2000). A caracterização genética dessas populações pode ser estimada através de características agronômicas e/ou por marcadores moleculares, ferramentas que têm auxiliado as análises de divergência genética entre linhagens endogâmicas. Tais análises podem ser utilizadas na predição preliminar de cruzamentos que otimizem a heterose, a partir da distância genética dos genitores.

Os marcadores moleculares fornecem uma medida confiável da diversidade genética dos materiais analisados, pois detectam a variabilidade existente diretamente no DNA. A avaliação de polimorfismos moleculares em regiões não codificadoras tem fornecido informações importantes sobre os vários níveis de diversidade genética (Caixeta et al., 2013).

Entre os marcadores moleculares mais utilizados encontram-se os marcadores microssatélites, também chamados de SSR (*simple sequence repeats*). Eles são altamente reproduzíveis, estáveis, codominantes e multialélicos, fornecendo um elevado nível de informação genética por loco (Caixeta et al., 2013).

Os estudos de diversidade genética no melhoramento de plantas visam a agrupar genótipos similares, de maneira que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados, com o objetivo de identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigosidade (Cruz et al., 2006; Cruz et al., 2013).

No Brasil, as cultivares de milho-pipoca não são distribuídas em grupos heteróticos complementares para a obtenção de híbridos, como ocorre com o milho comum (Miranda et al., 2003). Portanto, há uma necessidade de maiores informações sobre a diversidade genética dessa cultura, que permita auxiliar o melhorista e minimizar seus esforços na produção de cultivares superiores de milho-pipoca.

Este trabalho tem como objetivo avaliar a distância genética entre 15 linhagens de milho-pipoca de diversas origens, utilizando marcadores moleculares SSR, para a subsequente aplicação de metodologias de agrupamento de genótipos, como etapa preliminar de um processo voltado à identificação de grupos heteróticos a serem explorados no melhoramento da cultura..

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características do milho-pipoca

O milho-pipoca é uma monocotiledônea da ordem Gramineae, família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e, juntamente com o milho comum, constitui a espécie *Zea mays* L. (Barros, J. F. C. e Calado, J. G. A., 2014). Desta forma, ambos possuem o mesmo número de cromossomos ( $x = 10$ ) e, ao serem intercruzados, produzem progênie férteis (Kerr, 1969). Em trabalhos antigos, o milho-pipoca tem sido classificado como *Zea mays* L. var. *everta* (Sturtev) L.H. Bailey. Entretanto, Graner e Godoy Junior (1959) relatam que o gênero *Zea* é monotípico e que todos os grupos de milho, antigamente classificados como espécies ou subespécies, não passam de formas genéticas bem definidas e outras complexas da estrutura do grão.

As plantas de milho-pipoca são anuais e monóicas, apresentando flores masculinas dispostas em panículas apicais e flores femininas em espigas laterais. Tais características levam à reprodução por polinização cruzada, tratando-se de uma espécie alógama (Zinsly e Machado, 1987). O caráter monóico e sua característica são resultantes da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas (Magalhães et al., 2002).

A origem do milho-pipoca confunde-se com a origem dos demais tipos de milho. 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 descobertas arqueológicas indicam que o milho-pipoca teve um importante papel no desenvolvimento pré-histórico do milho no continente, pois um dos mais primitivos exemplares de milho, encontrado em Bat Cave, Novo México, em 2.500 a.C., era de milho-pipoca (Zinsly e Machado, 1987).

Existe uma grande variabilidade genética em *Zea mays* L. Com relação ao tipo de endosperma, por exemplo, quase 40% dos milhos são amiláceos, cerca de 30% possuem grãos duros cristalinos, pouco mais de 20% são dentados, cerca de 10% são classificados como milho-pipoca e 3% como milho doce (Paterniani e Campos, 2005).

As plantas de milho-pipoca diferem das plantas de milho comum em alguns aspectos. Os colmos são cilíndricos, compactos e mais finos; as folhas, em menor número, são mais estreitas e eretas. As plantas produzem espigas menores e situadas em uma posição mais alta. O ciclo é mais curto, sendo superprecoces na maturação e na secagem dos grãos. As plantas produzem perfilhos com maior frequência do que o milho comum e o sistema radicular é menos desenvolvido, resultando em plantas mais suscetíveis ao acamamento e à seca. Além disso, as plantas sofrem maior dano resultante de doenças que atacam o colmo, as espigas e os grãos (Sawazaki e Duarte, 2014). Os grãos têm formato e tamanho diferente do observado no milho comum, sendo menores e mais duros e apresentando maior proporção de endosperma duro em relação ao macio. Os grãos estouram sob a ação do calor, uma característica essencial da pipoca (Zinsly e Machado, 1987; Ziegler e Ashman, 1994).

Os grãos de milho-pipoca podem variar quanto ao formato (redondo, chato e pontiagudo), tamanho (de 0,5 a 1,0 cm) e coloração (rosa, creme, vermelha, roxa, preta e azul). As cores branca e amarela são as mais comuns. Os tipos com maior aceitação comercial são os redondos, tipo pérola e com endosperma amarelo a laranja (Zinly e Machado, 1987).

A capacidade de pipocamento dos grãos é explicada pela resistência do pericarpo, associada à presença de óleo e umidade que, nos grãos, exercem pressão sobre o pericarpo até que este se rompa, expondo o endosperma quando a temperatura alcance aproximadamente 180°C (Zinsly e Machado, 1987). Para Luz et al. (2005), o sucesso do estouro da pipoca depende da integridade do pericarpo, pois essa estrutura deve suportar uma elevada pressão interna, na semente, até atingir a temperatura apropriada para a expansão da pipoca. Portanto, se o pericarpo estiver trincado ou rompido, a pressão ideal poderá não ser atingida e, conseqüentemente, a pipoca não ficará totalmente expandida.

O índice de capacidade de expansão (ICE) está altamente relacionado com a maciez da pipoca, sendo o principal parâmetro para a avaliação da qualidade dos grãos de milho-pipoca (Sawazaki e Duarte, 2014). Quanto maior a capacidade de expansão, melhor é a qualidade da pipoca.

O ICE é calculado pelo quociente entre o volume de pipoca após o pipocamento dos grãos e o volume de grãos utilizados (Ruffato et al., 2000; Miranda et al., 2003). Devido à maior precisão de medição da amostra de grãos em balanças

de precisão do que em provetas, o ICE mais utilizado provem da relação volume/massa, expressa em mL/grama (Sawazaki e Duarte, 2014).

Variedades com ICE acima de 15 mL/grama podem ser comercializadas, alcançando a condição de cultivares pelas normas brasileiras (Zinsly e Machado, 1987). Por outro lado, valores bem maiores de ICE, de até 45 mL/grama, são observados em cultivares americanas (Sawazaki, 1996).

O ICE está condicionado tanto por fatores genéticos como por aspectos não genéticos, sendo importantes as condições de desenvolvimento no campo, incluindo colheita e pré-processamento (Sawazaki, 2001).

Além do ICE, o número de grãos sem estourar (piruás) também pode ser usado como parâmetro para a avaliação da qualidade do milho-pipoca. A frequência de piruás é um parâmetro muito importante na opinião dos consumidores, que consideram uma boa pipoca aquela que produz poucos piruás (Sawazaki e Duarte, 2014).

A umidade encontrada nos grãos de milho-pipoca é um dos principais fatores não genéticos que afetam a ICE (Sawazaki e Duarte, 2014). Luz et al. (2005) avaliaram o efeito da umidade no ICE em três genótipos de milho-pipoca, e concluíram que a melhor umidade para embalar as sementes é de 13%, que coincide com o teor de água com que o milho é comercializado. Outro fator é o armazenamento, onde a temperatura e a umidade relativa do ambiente (silo) devem estar em torno de 23°C e 75%, respectivamente. Zinsly e Machado (1987) ressaltam que, embora as sementes de milho-pipoca percam o poder de germinação após o armazenamento por dois ou três anos, mesmo em condições especiais, não ocorre perda da capacidade de expansão quando bem armazenadas, por um período de 20 a 25 anos.

Os grãos de milho-pipoca imaturos devido à morte precoce da planta, ocasionada por seca ou doenças foliares ou de colmo, apresentam menor tamanho e densidade dos grãos, tendo como consequência uma redução da capacidade de expansão e aumento do número de piruás. O ataque de fungos no pericarpo dos grãos do milho-pipoca também afeta a capacidade de expansão, por diminuir sua resistência (Sawazaki e Duarte, 2014).

## 2.2. Melhoramento do milho-pipoca

O milho-pipoca destaca-se como uma cultura típica do continente americano e constitui-se em uma boa opção econômica para os produtores, por apresentar um valor comercial maior que o do milho comum, (Conab, 2011) e também por ser exclusivamente utilizado na alimentação humana (Matta e Viana, 2003). De acordo com o Agriannual (2013), o preço médio comercializado na Ceagesp por quilo de milho-pipoca foi de R\$ 1,51, e uma saca de 30kg seria de R\$ 45,30.

Apesar de a cultura do milho-pipoca no Brasil ter importância econômica em algumas regiões do País, há uma carência de estatísticas oficiais sobre a área semeada, produção e rendimento de grãos. A informação disponível tem sido veiculada através da mídia, por empresários do setor. Segundo essas informações, o consumo de milho-pipoca no Brasil estava em torno de 30 mil toneladas/ano em 1993, com grande participação do milho importado. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de milho pipoca, com produção de 80 mil toneladas/ano (Miranda et al., 2011).

A dependência da importação da pipoca americana deve-se à baixa qualidade da pipoca disponível no mercado brasileiro (Freitas Júnior et al., 2006, Rangel et al., 2008). No primeiro Ensaio Nacional de Milho-pipoca, desenvolvido no ano agrícola 1991/92, a média de capacidade de expansão (CE) foi de 17,5 mL/mL, sendo de 20,8 mL/mL para a melhor cultivar. Na década de 1940, a CE de híbridos e variedades comerciais dos Estados Unidos já variava de 23,2 a 32,7 mL/g (Simon et al., 2004).

O registro de novos híbridos levou a um aumento da produção nacional do milho pipoca, e, portanto, a redução na importação de grãos e de sementes de híbridos exóticos. Na safra 2004/05, segundo informações das empresas empacotadoras, a importação brasileira foi apenas 20 mil toneladas, devido à entrada do híbrido simples modificado IAC-112. Dessa forma, o País começou a diminuir a dependência de sementes importadas (Scapim, 2006).

As principais regiões produtoras de milho-pipoca, no Brasil, são justamente as áreas onde atuam as grandes empresas empacotadoras do produto, através de contratos de parceria com os agricultores, envolvendo o fornecimento de sementes e a compra parcial ou total da produção. Como exemplo, tem-se as regiões de Nova Prata – RS e Campos Novos do Parecis – MT, que são as maiores regiões



produtoras de milho-pipoca do Brasil. Outras regiões expressivas são Itumbiara (GO); Primavera do Leste (MT) e Itapetininga (SP) (Sawazaki e Duarte, 2014).

O milho-pipoca vem recebendo ultimamente uma maior atenção de melhoristas e produtores brasileiros, em decorrência do aumento no consumo. Para tanto, foi importante a chegada do milho-pipoca importado dos Estados Unidos para uso em microondas (Matta e Viana, 2001; Daros et al., 2004). Em 2001, sete cultivares híbridas estavam registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC), sendo duas nacionais (IAC-112 e Zélia) e cinco exóticas. Em 2010, constavam no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) cerca de 46 cultivares, entre elas 8 variedades de polinização livre e 38 híbridos, sendo 6 nacionais e 32 exóticos (Sawazaki e Duarte, 2014). No entanto, ainda é necessária a criação de novos programas de melhoramento, tanto em empresas públicas como privadas (Scapim et al., 2006), pois, considerando as dimensões continentais do Brasil, é indispensável um número relativamente grande de materiais selecionados para uma oferta de variedades e híbridos adaptados às diversas regiões do país (Vilarinho et al., 2003), a partir da introdução de populações com alta variabilidade genética.

Os programas de melhoramento do milho-pipoca devem considerar a existência da correlação negativa entre produtividade e caracteres agronômicos com aspectos relacionados à qualidade da pipoca. Nesse sentido, o conhecimento das associações entre caracteres de interesse no melhoramento da cultura é de fundamental importância na obtenção de genótipos melhorados (Pípolo et al., 2002).

Em milho-pipoca, o rendimento de grãos pode estar inversamente correlacionado com a capacidade de expansão (Sawazaki, 1995; Coimbra et al., 2001). Isto dificulta o ganho de seleção simultâneo às duas características por ocasião do melhoramento intrapopulacional (Miranda et al., 2003). No entanto, Sawazaki et al. (2000) e Galvão et al. (2000) relataram bons resultados de produtividade e da capacidade de expansão em São Paulo e na Zona da Mata - MG. A capacidade de expansão média variou de 32-36 mL/g e a produtividade média de grãos ficou acima de 4.000 kg/ha. As linhagens foram extraídas das populações Guarani e IAC-64. Os híbridos de linhagens apresentaram boa adaptação nas duas regiões.

Atualmente, instituições e universidades públicas como a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a Universidade Federal de Viçosa (UFV), a Universidade Federal de Lavras (UFLA), a Universidade Estadual de

Maringá (UEM), a Universidade Estadual de Londrina (UEL), a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e a Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) têm mantido programas de melhoramento de milho-pipoca, visando diminuir a dependência de genótipos importados, principalmente da Argentina e dos Estados Unidos (Ribeiro et al., 2012).

O conhecimento do germoplasma é um dos requisitos mais importantes para o melhoramento de qualquer cultura. Ele engloba tanto os materiais genéticos não melhorados, disponíveis em banco de germoplasma, como os materiais melhorados, contidos especialmente em instituições públicas (Lima et al., 2000).

Diferentes germoplasmas têm sido utilizados no melhoramento de milho-pipoca, a fim de aumentar o valor das características de interesse comercial (Miranda et al., 2003). No Brasil, tem-se utilizado o cruzamento entre cultivares locais (Lira, 1983; Linares, 1987; Andrade, 1995), ou as gerações avançadas de híbridos americanos (Zanette, 1989; Coimbra, 2002). Em países de clima temperado, têm-se utilizado cruzamentos do milho-pipoca com o milho duro, com seleção realizada exclusivamente para a capacidade de expansão. Naquelas regiões, também são realizados retrocruzamentos sucessivos do milho-pipoca com linhagens elite de milho comum (Miranda et al., 2003).

A maioria dos métodos de melhoramento aplicáveis ao milho comum pode ser utilizada para o milho-pipoca (Zinsly e Machado, 1987). Segundo Vilarinho et al. (2003), 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. No primeiro caso, a utilização adequada de métodos de seleção possibilita o aumento gradativo da frequência de alelos favoráveis na população melhorada, que passa a superar a original. No segundo caso, a estratégia de melhoramento visa à obtenção de linhagens endogâmicas que, quando em combinações adequadas, produzirão híbridos superiores às populações de origem daquelas linhagens (Paterniani e Miranda Filho, 1978). Logo, o sucesso na obtenção de híbridos está intimamente ligado à identificação da população mais promissora para a extração de linhagens (Lima et al., 2000).

Nos Estados Unidos, a metodologia de exploração prática da heterose, com o uso de híbridos comerciais, utilizados desde a década de 1930, foi responsável pelo grande progresso obtido em milho-pipoca, seja para rendimento de grãos, seja

para a qualidade da pipoca (Ziegler e Ashman, 1994). No Brasil, o emprego de híbridos no melhoramento do milho-pipoca é recente, embora o primeiro programa de milho híbrido tenha iniciado em 1932, no Instituto Agronômico de Campinas (Krug et al., 1943).

### **2.3. Diversidade genética, heterose, e grupos heteróticos**

Muitos programas de melhoramento em milho são baseados no desenvolvimento e seleção de linhagens com o objetivo de produzir híbridos superiores (Shieh e Thseng, 2002), dada a importância comercial dos híbridos de linhagens (Hallauer et al., 1988).

Os conceitos para o desenvolvimento do milho híbrido foram definidos por volta de 1909 por Shull e por East, que chegaram a conclusões semelhantes em estudos independentes. O método do milho híbrido vem sendo utilizado desde o início do século. Isso tem sido feito a partir dos procedimentos de autofecundações sucessivas para obtenção das linhagens, seguidos pela avaliação das linhagens quanto à capacidade de combinação e, finalmente, pelos cruzamentos voltados à obtenção dos híbridos. A autofecundação contínua de indivíduos por 7 a 10 gerações resulta em linhas puras (linhagens). A fixação dos alelos nessas linhas puras causa redução de vigor e de rendimento de grãos. Entretanto, o vigor híbrido restaurado pelo cruzamento de linhagens endogâmicas provoca significativos aumentos na produtividade (Guimarães, 2007).

Segundo Ziegler e Ashman (1994), a escolha do tipo de híbrido de milho pode depender do desempenho agrônomo de suas linhagens parentais, sobretudo na produção de sementes. Essa dependência é ainda maior no milho-pipoca, pois a debilidade das linhagens de pipoca tende a ser maior do que a observada em linhagens de milho comum. Assim, o melhoramento das linhagens de milho-pipoca tende a favorecer a possibilidade de comercialização de híbridos. Na medida em que a eficiência da seleção se torna muito importante na obtenção de linhagens, as chances de desenvolver cultivares superiores aumentam quando ocorre um planejamento cuidadoso na escolha dos genitores e dos cruzamentos, o qual maximiza a utilização de alelos desejáveis (Borém e Miranda, 2013).

Dentro do presente contexto, a obtenção de informações relacionadas à diversidade genética permite quantificar a variabilidade genética da população e

identificar genótipos geneticamente distantes, que podem proporcionar uma ampliação da base genética, com maior oportunidade de obtenção de segregantes superiores (Cruz e Carneiro, 2006) e, conseqüentemente, o ganho genético em ciclos sucessivos de seleção.

A seleção dos parentais potencialmente promissores a partir da avaliação da divergência genética diminui os custos e o período de tempo requeridos para a realização de combinações híbridas, pela redução na frequência de cruzamentos menos promissores. Logo, os esforços são concentrados nas combinações entre os materiais mais divergentes (Fuzatto et al., 2002; Rinaldi et al., 2007).

O emprego de linhagens em programas de melhoramento de milho está associado à busca do vigor de híbrido, ou heterose, fenômeno que proporciona grande produtividade em híbridos provenientes do cruzamento de parentais que exibem alta divergência entre si. Dentro de um contexto acadêmico, o híbrido expressa heterose quando é superior aos seus genitores. Dentro do contexto comercial, o híbrido expressa heterose quando é superior ao melhor genitor (Borém e Miranda, 2013).

Estudando o fenômeno da heterose para o rendimento de grãos em híbridos de milho, Hallauer e Miranda Filho (1988) verificaram a importância de genes com grau variável de dominância no controle de tal característica. Os autores mostraram que a expressão da heterose para o rendimento depende também do nível de divergência entre os parentais, ou seja, das diferenças nas frequências alélicas, que são necessárias para a expressão da heterose. Em outras palavras, é necessário haver efeitos gênicos não aditivos para que ocorra uma associação positiva entre divergência genética e heterose. A expressão desses efeitos de dominância e epistasia tende a ser maior caso os parentais tenham diferentes frequências alélicas nos locos que controlam o caráter em estudo. Tal diferença deve aumentar com a divergência dos parentais, permitindo que seja incrementada a expressão do fenômeno heterótico (Gadheri et al., 1984).

Os primeiros experimentos para a produção de milho híbrido, conduzidos nos Estados Unidos nas décadas de 1940 e 1950, indicaram que os cruzamentos entre linhagens aparentadas levavam à obtenção de híbridos de menor desempenho (Vieira et al., 2004). Analogamente, cruzamentos entre linhagens menos aparentadas levaram à obtenção de híbridos mais produtivos (Pinto, 2009). Com

base nesses estudos (Vienne, 2002), foi estabelecido o conceito de grupos heteróticos.

Lee (1995) definiu grupo heterótico como uma coleção de germoplasma que, quando cruzada com germoplasmas externos, geralmente de outro grupo heterótico, tende a exibir maior grau de heterose do que seria esperado nos cruzamentos entre plantas do mesmo grupo. Assim, os grupos heteróticos são formados quando são estabelecidas as melhores combinações híbridas (Retuci, 2003).

No Brasil, as cultivares de milho-pipoca não são distribuídas em grupos heteróticos complementares para a obtenção de híbridos, como ocorre com o milho comum (Miranda et al., 2003). Em trabalho realizado nos EUA, Larish e Brewbaker (1999) identificaram três grupos heteróticos no início do programa de melhoramento de milho-pipoca. As populações com potencial de utilização como genitoras em programas de melhoramento intrapopulacional devem possuir desempenho superior e ampla variabilidade genética para as características de interesse (Hallauer e Miranda Filho, 1988).

A análise da diversidade a partir de caracteres morfológicos é muito limitada. Tal limitação se deve principalmente à grande influência ambiental que afeta a expressão fenotípica de tais caracteres, impedindo uma perfeita tradução das relações genéticas (Smith e Smith, 1989). Além disso, sua utilização é restrita ao número geralmente reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis e somente adequado se houver ausência de ligação dos marcadores morfológicos com caracteres de importância econômica, bem como uma influência desprezível dos efeitos deletérios das mutações (Guimarães e Moreira, 2005).

Em estudos anteriores, Coe et al. (1988) mostraram as limitações do uso da morfologia do endosperma quando o objetivo era o estabelecimento de grupos heteróticos entre linhagens de milho. Foi demonstrado que as diferenças entre alguns tipos de endosperma podem ser atribuídas ao efeito de um único gene.

Entre os vários métodos de estudo da diversidade, os dados obtidos por meio de técnicas moleculares superam a grande maioria das limitações existentes nas demais formas de análise (Laborda et al., 2001). Com a utilização dos marcadores, é possível a detecção da variabilidade existente diretamente no DNA (Caixeta et al., 2013).

As estimativas de diversidade genética em uma amostra populacional baseiam-se em dois níveis de variação: no número de alelos dos locos analisados e na frequência desses alelos na população. Com base nessas estimativas, diferentes parâmetros podem ser estimados, possibilitando uma maior compreensão da diversidade de uma população ou populações (Ferreira, 1996).

#### **2.4. Marcadores moleculares na avaliação da diversidade genética**

Os programas de melhoramento de plantas têm obtidos ganhos adicionais na eficiência por meio de aplicação de tecnologias moleculares. Entre as diferentes tecnologias moleculares, o estudo do polimorfismo do DNA tornou-se uma área de pesquisa ativa nas principais espécies agronômicas e plantas-modelo. Os marcadores moleculares tem-se mostrado úteis tanto para auxiliar no melhoramento de plantas quanto para aumentar o entendimento da domesticação das culturas, evolução das espécies e conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos nas características de interesse agrônômico (Caixeta et al., 2013).

De acordo com Agarwal et al. (2008), um marcador molecular pode ser definido como sendo um segmento particular de DNA que pode ser usado para comparar e representar diferenças em nível genômico. Os 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. Os marcadores são estáveis e detectados em todos os tecidos, independentemente do estágio fisiológico do organismo (crescimento, diferenciação, desenvolvimento) ou de estádios de defesa da célula. Portanto, não são confundidos com efeitos ambientais, pleiotrópicos ou epistáticos.

Os marcadores moleculares podem contribuir com o melhoramento genético de plantas, por meio do fornecimento de uma medida confiável da diversidade genética, que pode ser utilizada para a determinação do grau de parentesco entre as linhagens e variedades, para a proteção dos direitos da propriedade intelectual. Pode auxiliar, também, por meio de seu ligamento com alelos de interesse, na avaliação de características de difícil mensuração, proporcionando o primeiro passo para o entendimento da biologia e da estrutura de muitas características, especialmente as quantitativas (Borém e Miranda, 2013). O sucesso dos

marcadores moleculares é devido a um amplo acesso ao genoma do organismo estudado, de maneira rápida e eficiente (Kumar, 1999).

A Genética Quantitativa postula que, em qualquer grau de dominância superior a zero, a heterose é decorrente das frequências alélicas divergentes entre os genitores, existindo uma correlação positiva entre a divergência genética e a heterose (Falconer e Mackay, 1996). Por este motivo, estimativas de divergência genética entre linhagens, por meio de marcadores moleculares, contribuem para poupar esforços em polinizações manuais, possibilitando a identificação de grupos heteróticos e direcionando os cruzamentos na tentativa de sintetizar híbridos produtivos e vigorosos (Laborda et al., 2005).

Os vários tipos de marcadores moleculares atualmente disponíveis diferenciam-se pela tecnologia usada para demonstrar a variabilidade no DNA por meio do polimorfismo molecular, expressão genética, distribuição no genoma, custo e operação do trabalho (Griffiths et al., 2000). Os marcadores podem ser diferenciados segundo o método de análise: marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que consiste na amplificação de fragmentos de DNA *in vitro* pela ação de uma enzima de restrição; marcadores expressos via hibridação, quando os fragmentos de DNA analisados são detectados por hibridização com uma sonda de DNA de sequência conhecida e marcada; e marcadores associados a processos de sequenciamento, que consistem na determinação da ordem das bases dos nucleotídeos (Caixeta et al., 2013).

Numerosos trabalhos experimentais demonstraram que, ao ser utilizado um número suficientemente grande de marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), torna-se possível observar a relação entre os acessos, caracterizando grupos heteróticos, relacionando linhagens de procedência desconhecida com os grupos heteróticos e monitorando a diversidade genética entre cultivares melhoradas e coleções de germoplasma (Melchinger, 1999).

A avaliação de genótipos por meio dos marcadores moleculares pode revelar a presença de bandas comuns, sugerindo a ocorrência de semelhanças genéticas entre tais genótipos. Por outro lado, a presença de bandas não comuns aos materiais analisados é um indício de diferenças genéticas. Os resultados são codificados de forma a gerar uma matriz de (dis)similaridade, que pode ser

graficamente interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada (Guimarães e Moreira, 2005).

## 2.5. Marcadores microssatélites ou SSR

Os microssatélites, também chamados de SSR (*simple sequence repeat*) e STR (*short tandem repeats*) são sequências repetidas em *tandem* que variam de 1 a 6 pares de bases e classificados de diferentes maneiras, dependendo do seu tamanho, tipo de unidade de repetição e sua localização no genoma (Litt e Luty, 1989; Toth et al., 2000; Caixeta et al., 2013). As sequências mais comumente repetidas em plantas são:  $(AT)_n$ ,  $(GT)_n$  e  $(AG)_n$ . Em animais, é mais comum a repetição  $(AC)_n$  (Ramalho et al., 2012).

Os microssatélites apresentam distribuição aleatória no genoma, embora existam regiões com maior abundância dessas sequências, como as regiões próximas do centrômero e dos telômeros. Há uma tendência de esses marcadores serem mais polimórficos, provavelmente porque as regiões genômicas que não codificam são menos afetadas pela seleção natural (Ramalho et al., 2012). Entretanto, atualmente vários microssatélites vêm sendo identificados dentro de genes.

As regiões microssatélites são originadas durante a replicação do DNA, em razão do pareamento desalinhado de sequências repetidas. Consequentemente, ocorre um reparo associado a uma taxa de mutação muito elevada, cerca de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por geração (Trojanowska e Bolibok, 2004). Tal pareamento desalinhado leva à produção de números variados das unidades repetidas, de forma que cada fragmento de microssatélite assume comprimentos diferenciados (Ramalho et al., 2012).

Os microssatélites podem ser perfeitos, isto é, serem arranjos de modo simples com várias repetições, como por exemplo,  $(CA)_n$ . Podem também ser imperfeitos, com unidades diferentes ocorrendo juntas e repetidas, como  $(CA)_n(GT)_n$ . Podem ainda ocorrer regiões espaçadoras entre as unidades repetidas, como  $(CA)_n(N)_n(GT)_n$  (Ramalho et al., 2012).

O grande polimorfismo das regiões repetitivas resultantes dos eventos mutagênicos, aliado ao fato de as sequências de DNA que os flanqueiam



normalmente serem conservadas entre os indivíduos de mesma espécie, permitem o uso dos microssatélites como marcadores moleculares (Caixeta et al., 2013).

As sequências adjacentes ao microssatélite polimórfico permitem o desenho de *primers* específicos (20 a 30pb), de modo que, por meio de uma reação de PCR, seja possível amplificar esse loco. Deste modo, os produtos de amplificação apresentam polimorfismo no tamanho do fragmento, possibilitando a diferenciação de genótipos (Schlotterer, 2000). Como cada um desses fragmentos de um dado loco é equivalente a um alelo de um gene, os microssatélites são marcadores com alta variabilidade alélica (Ramalho et al., 2012).

A herança apresentada pelos microssatélites é considerada codominante. Isso significa que um indivíduo pode ser homocigoto para um loco microssatélite caso tenha o mesmo alelo em ambos os cromossomos homólogos, e pode ser heterocigoto se possuir alelos diferentes (Borém e Caixeta, 2006).

Para detectar o polimorfismo baseado em marcadores microssatélites, é necessário o uso de metodologias que separem os fragmentos amplificados de acordo com o seu tamanho molecular. Em geral, utilizam-se a eletroforese em gel e técnicas de eletroforese capilar por sistemas automatizados. Em ambos os casos, cada loco microssatélite é analisado individualmente e os fragmentos amplificados representam alelos diferentes do mesmo loco (Caixeta et al., 2013).

A técnica de microssatélites é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, sendo ainda facilmente automatizada. Esses marcadores destacam-se por sua natureza altamente polimórfica e, conseqüentemente, seu elevado número de alelos por locos. A sua natureza codominante, multialélica e os altos valores de heterocigosidade revela um elevado conteúdo de informação genética por loco. Outra vantagem desses marcadores 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 marcadores microssatélites são utilizados em diversos estudos experimentais. Por isso, a adaptação e a incorporação de tecnologias de marcadores microssatélites às atividades de programa de melhoramento constituem uma estratégia precisa e eficiente (Padilha et al., 2003). Esses marcadores são os mais indicados para o monitoramento da pureza genética, devido às suas

características de multialelismo e codominância, permitindo que sejam detectadas as diferentes contribuições parentais nas progênies.

Os marcadores microssatélites podem ainda ser utilizados na construção de mapas genéticos, como demonstrado por Sibov et al. (2003). Mapeando o genoma de milho tropical com os dados obtidos por SSR, estes pesquisadores identificaram um total de 213 marcas polimórficas que foram empregadas para o mapeamento dos genótipos em estudo. Os 117 locos mapeados cobriam 83% do genoma do milho tropical, contendo 1634 cM de comprimento com intervalo médio de 14 cM entre os marcadores adjacentes.

Frequentes e distribuídos ao acaso pelo genoma, os SSRs combinam a informatividade com a ampla cobertura do genoma, a robustez e a reprodutibilidade, razão pela qual são marcadores muito utilizados em estudos de melhoramento de plantas, sobretudo em análises de diversidade, mapeamento e seleção assistida (Caixeta et al., 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Foram utilizados 15 genótipos de milho-pipoca em estágios avançados de autofecundação, constituindo as famílias endogâmicas (linhagens) listadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Linhagens de milho-pipoca avaliadas

Linhagens	Origem	Caracterização genética
1	Colombiana	Desconhecida
2	Zélia	Híbrido triplo
3	IAC-125	Híbrido topcross
4	Zélia	Híbrido triplo
5	CMS-43	Composto Branco
6	IAC-125	Híbrido topcross
7	Zélia	Híbrido triplo
8	IAC-112	Híbrido simples modificado
9	UEM-M2	Variedade de polinização aberta
10	Zaeli	Híbrido americano
11	Catedral	Desconhecida
12	IAC-112	Híbrido simples modificado
13	IAC-112	Híbrido simples modificado
14	IAC-112	Híbrido simples modificado
15	Zaeli	Híbrido americano

As linhagens 8, 12, 13 e 14 têm como origem IAC-112, um híbrido simples modificado, desenvolvido pelo Instituto Agronômico de Campinas, oriundo da combinação de linhagens da variedade SAM com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani e Viçosa Amarelo.

As linhagens 3 e 6 são procedentes de IAC-125, um híbrido topcross, derivado do cruzamento entre um híbrido simples e uma variedade de polinização livre, também proveniente do Instituto Agronômico de Campinas.

As linhagens 2, 4 e 7 derivaram de Zélia, um híbrido triplo desenvolvido pela empresa DuPont do Brasil S.A. – Divisão Pioneer Sementes, a partir de mesclas entre germoplasma temperado e germoplasma tropical.

A linhagem 5 foi originada de CMS-43, um composto de grãos brancos, redondos, formado a partir de quatro ciclos de recombinação de 33 materiais (28 predominantemente brancos e cinco amarelos), do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo, selecionados para tolerância a *Helminthosporium tursicum* e *Puccinia* spp., em 1979.

A linhagem 9 foi procedente de UEM-M2, uma variedade de polinização aberta obtida junto aos produtores, tendo, portanto, genealogia desconhecida.

As linhagens 10 e 15 provieram de Zaeli, um híbrido americano comercializado no Brasil pela empresa Zaeli, com genealogia desconhecida.

A linhagem 1 derivou do híbrido Colombiana e a linhagem 11 teve origem do híbrido Catedral, ambas com genealogia desconhecida.

### **3.2. Extração de DNA**

Para a extração de DNA das amostras, foram coletadas 0,300 g de folhas de sete plantas de cada linhagem, somando 105 amostras. As plantas tinham cerca de 20 dias após a semeadura. As folhas foram acondicionadas individualmente em envelopes de alumínio, mantidas no gelo e, em seguida, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80°C.

O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações.

A extração foi realizada em tubos *ependorf* (2,0 mL) com 0,150 g de folhas previamente maceradas em nitrogênio líquido e misturadas com 700 µL 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). Os tubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria a 65°C durante 1h, com agitações suaves a cada 5 minutos. Após o banho e em temperatura ambiente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1, com inversão suave por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10000 r.p.m. sob temperatura ambiente. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos de 1,5 mL. Foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com agitação suave por 5 minutos. Após uma nova centrifugação com 10000 r.p.m. por 10 minutos sob temperatura ambiente, o sobrenadante foi coletado e transferido para um *ependorf* limpo, sendo adicionados 60% do volume recuperado de

isopropanol gelado, misturando-se levemente por inversão por 1 minuto. As amostras foram mantidas *overnight* em - 20°C. Após esta etapa, uma nova centrifugação com 10000 r.p.m. por 10 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 800 µL de etanol 70% gelado, com leve agitação por 1 minuto e novamente centrifugação nas mesmas condições anteriores. Descartado o sobrenadante e feita a secagem do *pellet* de DNA, foram adicionados 400 µL de TE (1M Tris/HCl e 0,5M EDTA) e 4 µL de RNase a 10ng/µl e mantido o material *overnight* em 4°C.

Na etapa seguinte, foram adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitados suavemente por 5 minutos. Após serem centrifugados com 10000 r.p.m. por 5 minutos, a fase aquosa superior foi transferida para um *ependorf* novo com 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturados por inversão por 5 minutos. Novamente centrifugados, a fase aquosa superior foi transferida para tubos novos e adicionados 60% do volume recuperado de isopropanol gelado e 25 µL de NaCl 5M, que foram agitados por 1 minuto e mantidos *overnight* em -20°C.

Após o descanso, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos com 10000 r.p.m., o sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 1 mL de etanol 70% com suaves inversões. O etanol foi descartado cuidadosamente e o *pellet* seco foi ressuspenso em 100 µL de TE. O DNA foi então estocado em - 20°C.

### **3.3. Quantificação do DNA**

O DNA foi quantificado utilizando o aparelho Picodrop (espectrofotômetro UV-Visível), a partir de um volume de 2 µL de solução de DNA estoque. As concentrações de cada amostra foram exibidas pelo *software* Picodrop e exportadas para uma planilha do Microsoft Excel.

A partir desses valores, foram selecionadas as repetições com maiores concentrações e menores índices de contaminação, para serem diluídas numa concentração padrão de 10 ng/µL.

### 3.4. Amplificação do DNA

Para a seleção dos marcadores polimórficos, foram avaliados 150 *primers* de microssatélite, já mapeados para o genoma de milho comum, em quatro amostras de DNA de diferentes linhagens. Eles foram cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Universidade Estadual de Maringá. As características dos *primers*, incluindo sua localização no genoma, foram obtidas no *site* MaizeGDB (*Maize Genetics and Genomics Database*) em <http://www.maizegdb.org>.

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi preparada em microtubos de 0,2 mL no termociclador Techne TC-512. Tanto na seleção dos *primers* como na amplificação do DNA foram utilizados: DNA de cada amostra, tampão de reação, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Taq-DNA Polimerase e os pares de *primers* para um volume final de 20 µL. A concentração e o volume de cada reagente estão no Quadro 2.

Quadro 2 – Volume e concentrações dos reagentes estoques e da reação

Reagentes	Concentração estoque	Concentração final/reação	Volume
H2O	-	-	11,7
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,0 mM	1,6
dNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (R)	10 µM	0,2 µM	0,6
<i>Primer</i> (F)	10 µM	0,2 µM	0,6
Taq-DNA Polimerase	5 U/µL	1 U	0,2
DNA		25 ng	2,5
Total			20 µL

Para a amplificação de todos os microssatélites, foi utilizado o programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991) (Quadro 3). Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 4% (1 agarose comum: 1 agarose Metaphor), e tampão TBE 0,5 X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA), por 4 horas com 60 Volts. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução com brometo de etídio contendo 0,5 µg/mL. A imagem foi capturada com o equipamento *Ultraviolet Transilluminador High Performance* – Edas 290, programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de 100 pares de bases.

Quadro 3 – Sequência do programa *Touchdown* PCR para amplificação do DNA

Passo	Etapa	Temperatura (°C)	<i>Touchdown</i> (min.)
1	Desnaturação inicial	94	1
2	Desnaturação	94	1
3	Anelamento	65 (-1°C/ciclo)	1
4	Extensão	72	2
5	Desnaturação	94	1
6	Anelamento	65 (-1°C/ciclo)	1
7	Extensão	72	2
8	Volta ao passo 2 (9 vezes)	-	-
9	Desnaturação	94	1
10	Anelamento	55	1
11	Extensão	72	2
12	Volta ao passo 9 (17 vezes)	-	-
13	Extensão final	72	2
14	Imersão	4	-

### 3.5. Medidas de distância genética

A diversidade genética pode ser avaliada de forma simultânea em relação às várias características. Para isso, recomenda-se a utilização de medidas de dissimilaridade (Cruz e Carneiro, 2006). Deste modo, os dados obtidos pela avaliação visual das bandas foram utilizados para a elaboração de uma matriz de dados que codifica numericamente os alelos relacionados nos diferentes *primers*, com o auxílio do software Microsoft Excel. A partir desses dados foi possível obter a matriz de dissimilaridade.

A distância genética entre as linhagens foi estimada pela distância modificada de Rogers (1972). Considerando  $p_i$  e  $q_i$  as frequências do alelo  $i$  no loco  $j$ , nas respectivas linhagens P e Q, e tomando  $m$  como o número de locos contendo os alelos estudados, a distância entre as linhagens P e Q ( $d_{PQ}$ ) foi estimada por:

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

A seguir, os valores da matriz de dissimilaridade, construída a partir dos coeficientes de distância genética de Rogers, foram submetidos às diferentes análises, como descrito abaixo.

### 3.6. Método de agrupamento

No processo de agrupamento é desejável ter informações relativas a cada par de genitores. Por isso, o número de estimativas de medidas de dissimilaridade é relativamente grande, o que torna impraticável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual daquelas estimativas (Cruz et al., 2006). Portanto, as linhagens analisadas neste trabalho foram agrupadas em função das distâncias estimadas por diferentes métodos de agrupamento, de modo a ser maximizada a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos.

No presente trabalho foram utilizados os métodos de agrupamento mais empregados cotidianamente no melhoramento de plantas, ou seja, os modelos hierárquicos aglomerativos e os de otimização. Dentro dos aglomerativos foram aplicado o método do vizinho mais próximo, o método do vizinho mais distante e o método das médias das distâncias (UPGMA - *unweighted pair-group method using an arithmetic average*). Dias (2006) expõe detalhes sobre os cálculos necessários à utilização desses métodos.

Paralelamente aos modelos hierárquicos aglomerativos, foi empregado o método de otimização proposto por Tocher, citado por Rao (1952). No Brasil, este método vem sendo amplamente empregado no estudo da divergência genética entre acessos (Marchioro et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Karasawa et al., 2005; Souza et al., 2005).

Com base nas distâncias genéticas de Rogers e no agrupamento dos genitores pelos métodos hierárquicos aglomerativos, foi possível construir um dendrograma ou diagrama de árvores, cujas ramificações se dispõem de tal forma, que o número de acessos em um grupo aumenta gradativamente em função dos níveis ou pontos de referência obtidos a partir dos diferentes métodos estabelecidos. Como regra geral, a construção do dendrograma é estabelecida pelo genótipo de maior similaridade (Cruz et al., 2013).

Para avaliar a contribuição dos métodos de agrupamento utilizados na análise e interpretação dos dados, foi considerado o coeficiente de correlação cofenética (Rohlf e Sokal, 1981), que estima o grau de concordância entre as medidas originais de dissimilaridade e as medidas geradas graficamente a partir dos dendrogramas.



O agrupamento das linhagens também foi analisado pela dispersão gráfica, utilizando o espaço bi e tridimensional.

A adequação da representação gráfica foi avaliada pelo valor do coeficiente de estresse, introduzida por Kruskal (1964), que mede o grau de ajustamento das distâncias obtidas da matriz de coordenadas de baixa dimensão em relação à matriz de distâncias originais, entre todos os pares de itens ij. A estatística de estresse foi calculada por:

$$\text{estresse} = \sqrt{\frac{\sum (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum d_{ij}^2}}$$

O coeficiente de estresse varia de 0 a 1. Na interpretação dos resultados, adotou-se o critério de Kruskal (1964), que sugeriu a escala de ajustamento descrita no Quadro 4.

Quadro 4 – Ajustamento do coeficiente de estresse

Estresse	Ajustamento
0,40	Ruim
0,20	Moderado
0,10	Bom
0,05	Excelente
0,00	Perfeito

Todos os procedimentos analíticos acima mencionados foram efetuados com o auxílio do aplicativo Genes versão 4.1 (Cruz, 2006 a,b,c).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção de *primers*

Neste trabalho, o método para a extração de DNA descrito por Hoisington et al. (1994) sofreu algumas modificações, mostrando-se adequado para extrair o DNA genômico de folhas jovens das 105 plantas de milho-pipoca selecionadas para o estudo. As alterações consistiram em: adicionar menor volume de tampão de extração CTAB e de solução clorofórmio: álcool isoamílico (de 1mL para 800µL), devido a um menor volume de sobrenadante recuperado; substituição de octanol por álcool isoamílico na purificação com clorofórmio; acréscimo de duas purificações com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), ao invés de uma só; acréscimo de duas precipitações de DNA com isopropanol (uma sem sal, após a primeira etapa de purificação e a outra com sal, após a segunda etapa de purificação); adição de menor volume de RNase (de 10µL para 2µL), devido ao menor volume de sobrenadante recuperado; acréscimo de uma purificação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1); e acréscimo de duas lavagens com etanol 70% em vez de uma.

Da mesma forma, a utilização do equipamento Picodrop na quantificação do DNA genômico das folhas e o emprego do programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991) para a genotipagem das linhagens, considerando todos os *primers* selecionados, constituíram metodologias eficientes e apropriadas às finalidades do trabalho.

A seleção dos microssatélites foi realizada para verificar a complementaridade, reprodutibilidade e polimorfismo dos mesmos. A primeira avaliação levou ao descarte daqueles géis cujo polimorfismo foi muito pequeno, ou seja, os *primers* que não variavam as bandas entre os indivíduos não foram utilizados. Posteriormente, foram selecionados pelo menos dois microssatélites por cromossomo, conforme a distribuição no genoma. Dos 150 pares de *primers* testados, 66% foram monomórficos e 34% polimórficos. Entre os polimórficos, 40 *primers* foram selecionados para investigar a variabilidade genética entre as 15 linhagens de milho-pipoca. O nome dos *primers* selecionados, suas sequências,

repetições flanqueadas, localização nos cromossomos e número de alelos de cada um estão listados no Quadro 5.

Quadro 5 – Sequência dos *primers* de microssatélite selecionados, repetição da sequência microssatélite, localização no cromossomo e número de alelos detectados por cada *primer* usado na estimativa da diversidade genética de 15 linhagens de milho-pipoca

Primers	Sequência	Repetição	Bin	Nº de alelos
Bnlgl1083	F - ACAGTCTGTTGGGGAACAGG R - CAACGCTGGTTTGTCTGTTTA	AG <sub>(29)</sub>	1.02	4
Bnlgl2295	F - CGGAGGAGTGGTTCTTGAAA R - GGTTAGTGAAAGGGTTGCCA	AG <sub>(30)</sub>	1.04	3
Umc1397	F - GTTACACTGCAGACAAACAACCG R - GTCATGTGATCCGGGAGTAAATCT	(ATGCA) <sub>4</sub>	1.03	3
Umc1737	F - ATGCTTCTCTTCAGAAGCCATCC R - TAGCTAGGTAGTGATGTGCGTGCT	(AGA) <sub>7</sub>	1.10 – 1.11	2
Umc2047	F - GACAGACATTCCTCGCTACCTGAT R - CTGCTAGCTACCAAACATTCCGAT	(GACT) <sub>4</sub>	1.09	2
Bnlgl1297	F - TCTCGATCGCTCCGATCTAT R - GACTCAACTCCAAAAGGCCA	AG <sub>(32)</sub>	2.02	2
Bnlgl1338	F - GTGCAGAATGCAGGCAATAG R - GCAAATGTTTTACACACACG	AG <sub>(30)</sub>	2.01	3
Umc1003	F - AATAGATTGAATAAGACGTTGCC R - TGTTCCAATGCTTTTGTACCTCTA	(TAAA) <sub>9</sub>	2.05	4
Umc2245	F - CGTCGTCTTCGACATGTACTTCAC R - GCCCTGTTATTGGAACAGTTTACG	(CAA) <sub>7</sub>	2.01	3
Umc2254	F - GCACAAAGCATCGTACTTGGATAG R - CCTTTGTCCTCGATCTCTCAGTTC	(AGAG) <sub>4</sub>	2.06	2
Umc1300	F - TCTGAACGCACTGGGAACATAGTA R - AGAATAATGGACGGTTCCTCTGG	(CAATC) <sub>5</sub>	3.05	2
Umc1399	F - GCTCTATGTTATTCTTCAATCGGGC R - GGTCGGTCGGTACTCTGCTCTA	(CTAG) <sub>5</sub>	3.07	4
Bnlgl1063	F - GGAGACAACCCCGACGAC R - GGTACCAGAGCCACAGATCC	AG <sub>(42)</sub>	3.06	4
Umc1639	F - CTAGCCAGCCCCATTCTTC R - GCAAGGAGTAGGGAGGACGTG	(TGTCC) <sub>4</sub>	3.09-310	4
Umc2071	F - ATACACGCAGTTACCCGAAGGTT R - ACTGATGGTGTCTTGGGTGTTTT	(ATGT) <sub>5</sub>	3.01	3
Bnlgl1927	F - TTTTTTGTAAAGCGATCCGG R - GATGAATCTGCGTCCGTCTT	AG <sub>(41)</sub>	4.07 – 4.08	5
Umc1117	F - AATTCTAGTCCTGGGTCGGAATC R - CGTGGCCGTGGAGTCTACTACT	(TCGCA) <sub>4</sub>	4.04	2
Umc1232	F - GGAATTACCACAACAACTAACTTGG R - AGGCTCTAGCTACCTGGCTACGTT	(ACAG) <sub>4</sub>	4.00	2
Umc1738	F - CCAGACATTCCCAAACCCTA R - CGTCGGTGTCGTAAGGTTG	(CGCT) <sub>5</sub>	4.10	2
Umc1153	F - CAGCATCTATAGCTTGCTTGCATT R - TGGGTTTTGTTTGTGTTTGTGTTG	(TCA) <sub>4</sub>	5.09	3
Umc1496	F - GATTACAACCCACCGGAGTTACAG R - GCTCTTCTAGGTGCAGACAAAGA	(GCA) <sub>8</sub>	5.00	2
Umc1524	F - TACAAGTAAACACGCGCAGGAGTA R - TGTTTGAGCGACTTACTTGACCTG	(GGAAGT) <sub>8</sub>	5.06	4

Quadro 5, Cont...

Umc1614	F - GAGCTACTCAGCCAAGACGAAAAG R - TCACTTGCATGAGCAACTTCAGTA	(CTG) <sub>6</sub>	6.04	4
Umc1887	F - CTTGCCATTTTAATTTGGACGTTT R - CGAAGTTGCCCAAATAGCTACAGT	(CGA) <sub>4</sub>	6.03 – 6.04	3
Umc1015	F - CAGACACAAGCAGCAAAGCAAG R - TCCGACTCCAAGAAGAGAGAA	(GA) <sub>45</sub>	7.03	7
Umc1066	F - ATGGAGCACGTCATCTCAATGG R - AGCAGCAGCAACGTCTATGACACT	(GCCAGA) <sub>5</sub>	7.01	2
Umc1241	F - TGAAGCAAGTCACTGGTAAGAGCA R - TGACACACCCATACTTCCAACAAG	(GTCTTTG) <sub>4</sub>	7.00	2
Umc2090	F - CAGAAGGAACTTTTCAGAGAGGCAG R - CATCATGAAGGAAGAAGACGATGA	(GCA) <sub>6</sub>	7.00	2
Bnlgl1194	F - GCGTTATTAAGGCAAGCTGC R - ACGTGAAGCAGAGGATCCAT	AG <sub>(33)</sub>	8.01 – 8.02	2
Mmc0181	F - CTAATCACCAACCACCAACAC R - AGTCCGTCCTCTGTCCTCGTC	(CA) <sub>2</sub> (GA) <sub>26</sub>	8.06 – 8.07	4
Umc2075	F - CCTGGTATCTTGATGAGCTGGATT R - AGAAACATGTCCGGTTCTTCAGAC	(AGCCAG) <sub>4</sub>	8.03 – 8.04	2
Umc2367	F - AACCGTTGTCGTTGTCTCTGTTC R - ATGAACTTGGTCACGCTCATCTC	(CCG) <sub>6</sub>	8.04 – 8.05	3
Umc1137	F - ATCAGTCACTCTTCTGCCTCCACT R - GGCTGGATAATGTTGTAGCTGGTC	(CT) <sub>15</sub>	9.07 – 9.08	4
Umc1636	F - GTACTGGTACAGGTCGTGCTCTT R - CATATCAGTCGTTTCGTCCAGCTAA	(ACTGC) <sub>4</sub>	9.02	3
Umc2121	F - AAAAGTGGGCGCTAGTACAAGATG R - GTGGTGTTCCTTTTGATACGCT	(AGCG) <sub>4</sub>	9.04	4
Umc2343	F - TCATCTTCCCCACAAATTTTCATT R - GACTGACAACCTCAGATTTACCCA	(TGTGTGTG) <sub>4</sub>	9.05 – 9.06	5
Bnlgl1250	F - CCATATATTGCCGTGGAAGG R - TTCTTCATGCACACAGTTGC	AG <sub>(30)</sub>	10.05	5
Dupssr8	F - AAATAGTCCAGAAAAAATAGTGG R - ACCTCTTGTTTTCCACAGTTC	(TA) <sub>3</sub> (CA) <sub>17</sub>	10.00	4
Umc1077	F - CAGCCACAGTGAGGCACATC R - CAGAGACTCTCCATTATCCCTCCA	(CA) <sub>15</sub> (CGCA) <sub>12</sub>	10.04	5
Umc1272	F - CTCTGACAGACCTGCAGATAGGGT R - ATCGAGGGGCTAATCAGCAAG	(CTAGC) <sub>4</sub>	10.04	2

Na caracterização molecular das 15 linhagens de milho-pipoca com 40 *primers* microssatélite (SSR), foram obtidos 128 alelos polimórficos, variando de 2 a 7 (Umc1015), com média de 3,2 alelos por loco (Quadro 5). O nível de polimorfismo foi maior do que o encontrado por Li et al. (2004), que detectaram 2,7 alelos por loco, analisando 113 locos microssatélites em 56 linhagens de milho-pipoca. Wu et al. (2004), ao analisarem 61 locos microssatélites em raças de pipoca, detectaram uma média de 5,4 alelos por loco.

Em milho comum, o número de alelos por loco microssatélite tem sido relativamente maior do que o encontrado em milho-pipoca. Qi-Lun et al. (2008) detectaram uma média de 6,4 alelos por loco, em 124 cultivares de milho comum,

analisando 45 locos SSR. Menkir et al. (2004), Adeyemo et al. (2011) e Terra et al. (2011) encontraram médias que variaram de 3,7 a 5,7 alelos por loco. Esses autores atribuem o alto polimorfismo obtido ao grau de divergência dos genótipos avaliados e relatam que a pré-seleção dos *primers*, levando-se em conta o número e a qualidade dos produtos de amplificação, pode contribuir para aumentar o polimorfismo.

Os valores de PIC (Conteúdo de Informação do Polimorfismo) para os 40 locos microssatélites analisados variaram de zero (Bnlg1297 e Umc2075) a 0,2061 (Mmc0181), com um PIC médio de 0,0869 (Quadro 6). O grau de polimorfismo detectado por um determinado par de *primers* está relacionado à variabilidade da região do cromossomo e aos genótipos estudados. Um reduzido valor de PIC pode indicar que a região é conservada para o grupo de genótipos em estudo. (Terra et al., 2011). Este conhecimento é importante, pois permite otimizar o número de marcadores a serem utilizados e priorizados nos mais diversos estudos moleculares (Liu, 1997).

Quadro 6 – Conteúdo de polimorfismo (PIC) para os 40 primers microssatélites analisados

Primers	PIC	Primers	PIC
Umc2047	0,0886	Bnlg1063	0,1448
Umc1737	0,0966	Umc1614	0,1967
Bnlg1297	0,0000	Umc1887	0,1262
Umc1397	0,0606	Bnlg1083	0,1098
Bnlg1338	0,1017	Umc1015	0,1275
Umc1003	0,1076	Umc1066	0,0187
Umc2245	0,0503	Umc2090	0,1256
Umc2254	0,0576	Umc1241	0,0919
Umc1300	0,0143	Bnlg1194	0,0493
Umc1399	0,1139	Umc2075	0,0000
Umc1639	0,1558	Mmc0181	0,2061
Umc2071	0,0143	Umc2367	0,0217
Bnlg1927	0,1806	Umc1636	0,0606
Umc1117	0,0750	Umc1137	0,1444
Umc1232	0,0187	Umc2121	0,1099
Umc1738	0,0318	Umc2343	0,0551
Bnlg2295	0,0433	Bnlg1250	0,1106
Umc1153	0,0925	Umc1272	0,0986
Umc1496	0,0379	Dupssr8	0,1084
Umc1524	0,1622	Umc1077	0,0661
Média			0,0869

A heterozigosidade média, conforme pode ser visto no Quadro 7, variou de 0,0176 (linhagem 5) a 0,2561 (linhagem 4), evidenciando a baixa quantidade de heterozigose presente nas linhagens. Tal ocorrência já era esperada devido à natureza endogâmica dos genótipos estudados.

Quadro 7 – Heterozigosidade médio das 15 linhagens de milho-pipoca

Linhasgens	H. médio
1	0,1462
2	0,1227
3	0,0923
4	0,2561
5	0,0176
6	0,2028
7	0,0268
8	0,0651
9	0,0513
10	0,1339
11	0,1515
12	0,1119
13	0,0638
14	0,0472
15	0,1227

Neste estudo, a linhagem 4 foi polimórfica em 25 locos analisados. Por outro lado, a linhagem 5 apresentou o menor número de locos polimórficos (2). Para ilustrar o polimorfismo observado, a Figura 1 apresenta a imagem do gel de amplificação das linhagens 4 e 5, avaliadas pelo *primer* Umc1737.

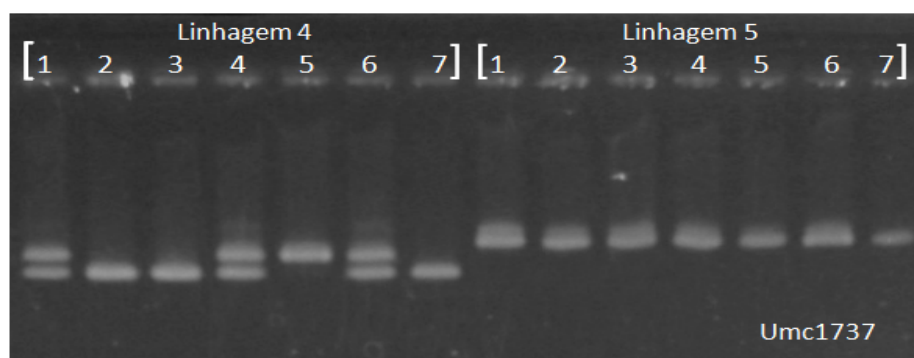


Figura 1 – Gel de amplificação das 7 amostras das linhagens 4 e 5 com o *primer* Umc1737.

Os *primers* de microssatélites utilizados neste trabalho foram selecionados a partir da biblioteca genômica do milho comum. O fato dos *primers* terem sido construídos a partir do genoma da espécie pode ser considerado um dos fatores que contribuíram para a reduzida variabilidade genética observada nos locos analisados. Alguns autores têm registrado que os microssatélites são mais variáveis na espécie original (a partir da qual eles foram construídos) do que nas espécies intimamente relacionadas (Matsuoka et al., 2002). Na presente situação, embora o milho-pipoca pertença à mesma espécie que o milho comum, vale ressaltar que, 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 especiais, tais como o milho-pipoca e o milho doce, o milho-pipoca tem apresentado menor número de alelos por loco e menores valores de heterozigotidade média do que os verificados para o milho comum (Liu et al., 2003).

#### **4.2. Dissimilaridade e distâncias genéticas**

A comparação dos distintos padrões eletroforéticos, obtidos por meio dos marcadores microssatélites, permitiu a obtenção das distâncias genéticas pelo método modificado de Rogers (1972). A metodologia tem como base a distância euclidiana a partir de estimativas de frequências alélicas. Sua aplicabilidade é mais fácil que a distância euclidiana, pois os valores da distância de Rogers variam de 0 a 1, ao contrário da distância euclidiana, onde os valores constituem uma medida métrica de difícil interpretação, por estarem compreendidos entre 0 e  $\sqrt{2}$ .

A possibilidade de comparação entre duas ou mais medidas de distância é outra vantagem da metodologia de Rogers, uma vez que o número de locos envolvidos é levado em consideração no cálculo da distância.

Conforme pode ser observado no Quadro 8 e considerando os locos analisados, é possível verificar que as linhagens 3 e 5 foram as mais dissimilares geneticamente, possuindo a maior distância (0,675) e integrando, possivelmente, grupos distintos. Entre as linhagens 10 e 11, houve a menor magnitude (0,235), sendo, portanto, as linhagens mais assemelhadas e, provavelmente, integrantes de um mesmo *cluster*.

Quadro 8 – Matriz de dissimilaridade construída a partir dos coeficientes de distância genética modificada de Rogers (1972) das 15 linhagens de milho-pipoca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0,000	0,543	0,551	0,555	0,605	0,505	0,472	0,404	0,484	0,529	0,529	0,471	0,460	0,487	0,452
2		0,000	0,529	0,535	0,511	0,478	0,315	0,517	0,500	0,498	0,469	0,503	0,459	0,507	0,347
3			0,000	0,586	0,675	0,409	0,614	0,395	0,435	0,582	0,549	0,502	0,383	0,504	0,490
4				0,000	0,570	0,473	0,509	0,516	0,612	0,539	0,48	0,507	0,557	0,529	0,515
5					0,000	0,471	0,479	0,549	0,588	0,273	0,384	0,521	0,621	0,521	0,489
6						0,000	0,490	0,393	0,361	0,424	0,402	0,514	0,415	0,472	0,415
7							0,000	0,495	0,626	0,521	0,452	0,529	0,535	0,449	0,317
8								0,000	0,405	0,415	0,372	0,434	0,345	0,423	0,428
9									0,000	0,469	0,512	0,488	0,314	0,458	0,467
10										0,000	0,235	0,461	0,439	0,453	0,444
11											0,000	0,504	0,436	0,474	0,432
12												0,000	0,502	0,279	0,430
13													0,000	0,433	0,397
14														0,000	0,370
15															0,000

#### 4.3. Métodos de agrupamento

A utilização de métodos que agrupem os genótipos constitui uma das melhores alternativas para a análise e interpretação dos dados contidos em uma matriz de distâncias genéticas (Cruz e Carneiro, 2006), representando uma etapa importante da avaliação de germoplasma (Vasconcelos et al., 2007).

A análise de grupos implica avaliar a capacidade de alocação ou de discriminação de indivíduos, nos seus respectivos centros de referência (populações), com base nas variáveis avaliadas (Cruz et al., 2013).

Os métodos de agrupamento se distinguem pelo tipo de resultado fornecido, em consequência das diferentes formas de definir a proximidade entre indivíduos e grupos ou entre dois grupos quaisquer. O agrupamento dos genótipos avaliados em função das distâncias estimadas exige a utilização de metodologias que maximizem a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre os grupos.

É importante ressaltar que não existe um único método hierárquico plenamente aplicável a todos os tipos de dados, isto é, capaz de gerar resultados superiores aos demais (Everitt, 1993). Bussab et al. (1990) recomendam que sejam aplicadas diferentes técnicas de agrupamento ao mesmo conjunto de dados e que a



estrutura resultante da maioria deles seja aceita como a mais adequada. Assim, é importante verificar quais os métodos aglomerativos apresentam os agrupamentos que se repetem na maioria das análises.

Os três métodos hierárquicos aglomerativos utilizados neste trabalho (UPGMA, vizinho mais próximo e vizinho mais distante) impõem uma estrutura de dados que obedece ao princípio intuitivo de agrupamento natural. Segundo este princípio, uma região de alta densidade de pontos é delimitada por regiões de baixa densidade. Nos métodos hierárquicos, cada elemento constitui inicialmente um grupo isolado, ao qual novos grupos vão se unindo, paulatinamente, formando um único grupo no final.

O critério utilizado para identificar o número de grupos formados no dendrograma de cada método foi uma inspeção gráfica visual, estabelecida em pontos de alta mudança de nível dos dendrogramas.

O dendrograma decorrente da aplicação do método UPGMA à matriz de distâncias encontra-se na Figura 2. Os dados sugerem a presença de um grupo inicial formado pelas linhagens 2, 5, 7, 10, 11, 12, 14, e 15, um segundo grupo formado pelas linhagens 1, 3, 6, 8, 9, e 13 e o último grupo constituído somente pela linhagem 4.

Os dois primeiros grupos podem ser divididos em pequenos subgrupos. Neste caso, o primeiro grupo foi subdividido em três partes, a primeira constituída pelas linhagens 5, 10 e 11, em seguida as linhagens 12 e 14 e, por último, um *cluster* com as linhagens 2, 7 e 15. O segundo grupo foi dividido em 2 subgrupos, o primeiro *cluster* pelas linhagens 3, 6, 8, 9 e 13 e, o mais distante, pela linhagem 1.

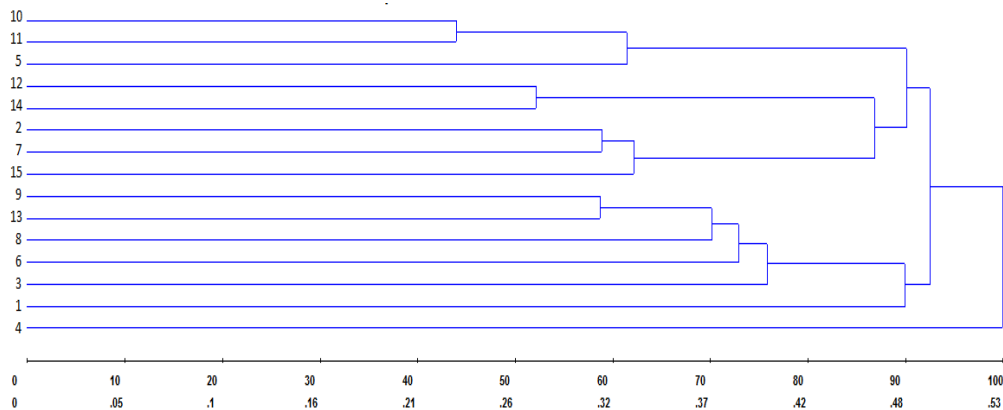


Figura 2 – Agrupamentos obtidos a partir do método UPGMA para as 15 linhagens de milho-pipoca.

O dendrograma obtido pelo método do vizinho mais distante (Figura 3) também sugere a presença de três grupos. O primeiro grupo está formado pelas linhagens 2, 5, 7, 10, 11 e 15. O próximo nível de fusão formou o segundo grupo pelo acréscimo de uma única linhagem (4). Em seguida, o terceiro grupo foi estabelecido pelas linhagens 1, 3, 6, 8, 9, 12, 13 e 14.

Da mesma forma que no caso anterior, o primeiro e o terceiro grupo podem ser separados em subgrupos. Neste caso, as linhagens 5, 10 e 11 permanecem juntas; em seguida, agrupam-se as linhagens 2, 7 e 15. O terceiro grupo é subdividido em 3 partes, a primeira formada pelo *cluster* com as linhagens 3, 6, 8, 9 e 13, a segunda pelas linhagens 12 e 14 e por último a linhagem 1, que está mais distante do que as outras. A linhagem 4 continua formando o seu próprio grupo, pois, como pode ser observado, sua distância na ligação dos pontos é maior em relação às demais.

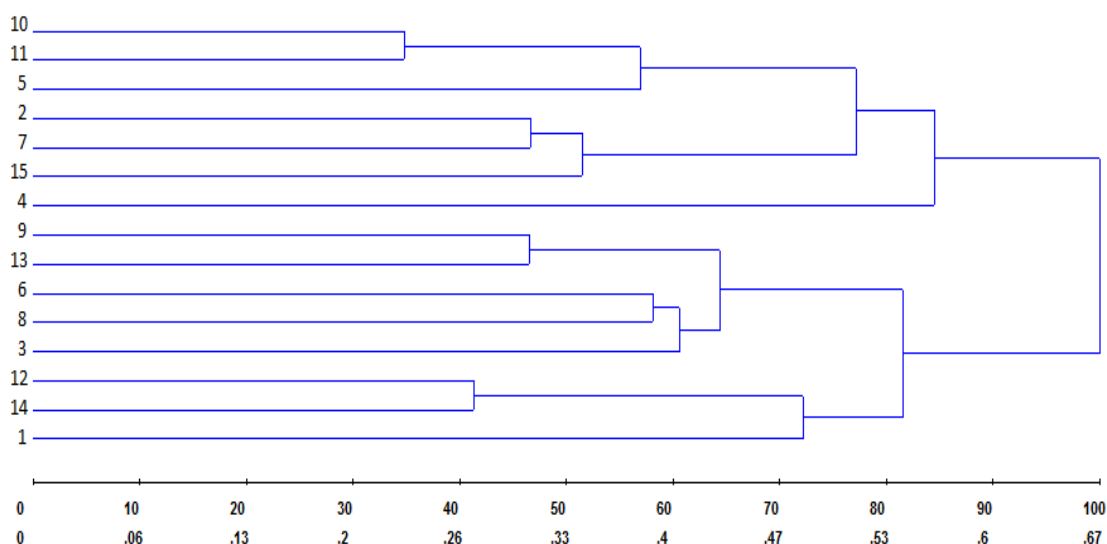


Figura 3 - Agrupamentos obtidos a partir do método vizinho mais distante para as 15 linhagens de milho-pipoca.

No dendrograma decorrente da aplicação do método do vizinho mais próximo, os dados sugerem a formação de quatro grupos (Figura 4). O primeiro grupo foi formado pelas linhagens 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 13; o segundo *cluster*, pelas linhagens 2, 7, 12, 14, e 15. Por último, as linhagens 1 e 4 formaram o terceiro e quarto grupos, respectivamente.

O primeiro e o segundo grupo também foram divididos em grupos menores. Desta forma, o primeiro *cluster* compôs 2 subgrupos, as linhagens 5, 10 e 11 e as

linhagens 3, 6, 8, 9 e 13. Em seguida, as linhagens 12 e 14 formam um *cluster* e, por fim, as linhagens 2, 7 e 15.

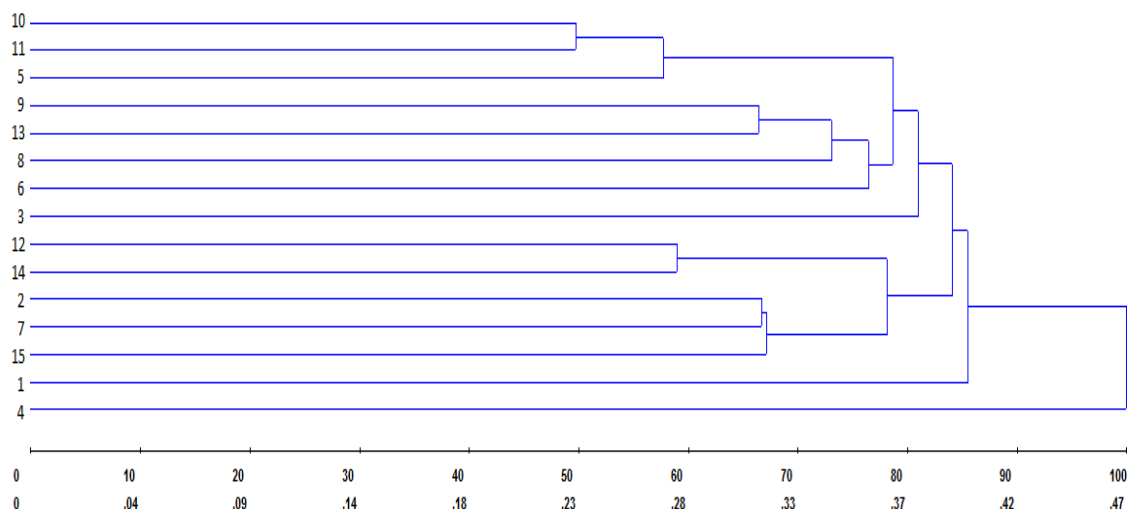


Figura 4 - Agrupamento obtido a partir do método vizinho mais próximo para as 15 linhagens de milho-pipoca.

Outro método de agrupamento realizado neste trabalho foi o método de otimização de Tocher, detalhado por Cruz e Carneiro (2006). O método de Tocher constitui um sistema de agrupamento simultâneo que realiza de uma só vez a separação dos genótipos em grupos. Adota-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos. O método tem ligação direta com a matriz das distâncias genéticas, dispensando o retorno à matriz de dados originais. O método de Tocher modificado (sequencial), proposto por Vasconcelos et. al. (2007), difere do método original de Tocher porque adota um critério diferenciado para a inclusão de indivíduos em cada grupo, de tal modo que o processo de agrupamento deixa de ser simultâneo e passa a ser sequencial.

No presente trabalho, o agrupamento pelos métodos de Tocher e de Tocher modificado evidenciam um grande grupo formado pelas mesmas linhagens (5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15), como mostrado nos Quadros 9 e 10.

O método de Tocher separou as linhagens em 5 grupos. As linhagens 1, 3 e 4 formaram cada uma delas um grupo único, sendo o grupo 2 constituído por apenas duas linhagens (2 e 7). Por outro lado, no método de Tocher modificado,

quatro grupos foram formados. A linhagem 1, que antes formava um grupo próprio, passa a integrar o grupo 2, juntamente com as linhagens 2 e 7.

Quadro 9 – Formação dos grupos pela aplicação do método de Tocher para as 15 linhagens de milho-pipoca

Grupo	Linhagens									
1	10	11	5	6	8	15	13	9	14	12
2	2	7								
3	1									
4	4									
5	3									

Quadro 10 – Formação dos grupos pela aplicação do método de Tocher modificado para as 15 linhagens de milho-pipoca

Grupo	Linhagens									
1	10	11	5	6	8	15	13	9	14	12
2	2	7	1							
3	3									
4	4									

O cálculo da distância média entre grupos (Quadro 11) indica que os grupos 4 e 5 foram os mais distantes entre si (0,5865), sugerindo a possibilidade de níveis heteróticos em cruzamentos envolvendo as linhagens 3 e 4.

Quadro 11 - Distância média entre grupos pela aplicação do método de Tocher

Grupos	Distâncias
1 x 2	0,4842
1 x 3	0,4927
1 x 4	0,5301
1 x 5	0,4924
2 x 3	0,5076
2 x 4	0,5225
2 x 5	0,5713
3 x 4	0,5551
3 x 5	0,5507
4 x 5	0,5865

Os resultados obtidos pela aplicação do método de Tocher foram bastante rígidos quanto à formação de grupos, pois a quantidade de grupos formados foi

pequena, de modo que muitos materiais constituíram um mesmo agrupamento. Tal resultado é indesejável, pois, caso a interpretação dos resultados deste estudo dependesse apenas da informação gerada pela aplicação da metodologia de Tocher, seria plausível concluir que a maioria das linhagens guarda uma similaridade genética relativamente grande entre si, dada a inclusão de tantos genótipos no mesmo grupo, o que não é necessariamente verdadeiro. Assim, a progressiva formação de grupos observados pelos métodos hierárquicos aglomerativos produziu resultados que não coincidem com os obtidos pelo método de Tocher, na medida em que a formação simultânea dos agrupamentos levou a um menor número de grupos.

Como alternativa para a análise, o método de Tocher foi aplicado somente aos genótipos integrantes do grupo 1, listados no Quadro 10. A decomposição de tal grupo resultou nos agrupamentos apresentados no Quadro 12.

Quadro 12 – Formação dos grupos pela aplicação do método de Tocher no grupo 1 do Quadro 10, para as 15 linhagens de milho-pipoca

Grupo	Acessos		
1	10	11	5
2	12	14	
3	9	13	
4	8		
5	6		
6	15		

No Quadro 12, verifica-se que as linhagens 5, 10 e 11 integram o primeiro grupo; 12 e 14 fazem parte do segundo; 9 e 13 constituem o terceiro e as demais formaram grupos próprios.

#### 4.4. Ajuste entre o dendrograma e a matriz de distâncias

Para fins de avaliação dos métodos de agrupamento, é usual a verificação do grau de concordância entre os resultados expressos nos dendrogramas e a matriz de distâncias, por meio de um valor conhecido como coeficiente de correlação cofenética (Rohlf e Sokal, 1981). Esse coeficiente tem sido utilizado também para comparar diferentes classificações produzidas a partir do mesmo conjunto de dados

(Dias, 2006). Valores próximos à unidade indicam melhor representação (Cruz e Carneiro, 2006).

Considerando os três métodos de agrupamento utilizados a partir das distâncias de Rogers, foram calculados os valores do coeficiente de correlação cofenética para cada metodologia (Quadro 13).

Quadro 13 – Estatísticas úteis na comparação de metodologias de agrupamento

Estatística	UPGMA	VMD	VMP
Correlação cofenética	0,7515	0,6587	0,6505
Graus de liberdade	103	103	103
Valor de t	11,5603	8,8842	8,6916
Probabilidade	0	0	0
Distorção (%)	1,1577	-55,019	32,1078
Estresse (%)	10,7595	29,4678	20,9016

No presente trabalho, o método mais apropriado para a caracterização dos agrupamentos foi o UPGMA, pois seu valor de correlação cofenética (75,15%) superou os valores verificados nos métodos do vizinho mais próximo (VMP) e do vizinho mais distante (VMD). A superioridade do método UPGMA também foi comprovada pelas baixas porcentagens de distorção e de estresse, indicando que o método UPGMA foi eficiente ao discriminar o posicionamento das linhagens no dendrograma.

#### 4.5. Projeção das distâncias no plano e no espaço

A observação da forma como as distâncias entre as linhagens se reflete na dispersão dos pontos que elas representam em duas dimensões constitui uma etapa adicional na análise dos resultados de divergência genética. A estatística denominada estresse (Kruskall, 1964) quantifica a validade da representação gráfica. Assim, o estresse mede o grau de ajustamento das distâncias obtidas a partir da matriz de coordenadas de baixa dimensão em relação à matriz de distâncias originais, entre todos os pares de itens (Dias, 2006).

Neste trabalho, a representação gráfica da projeção das distâncias no plano e no espaço foi realizada segundo a metodologia desenvolvida por Cruz e Viana (1994).

A correlação entre os dados originais e os dados estimados pela projeção bidimensional, de acordo com o Quadro 14, foi relativamente baixa (0,62). Segundo Rohlf e Sokal (1981), valores acima de 0,80 indicam um bom ajuste entre as duas matrizes.

A percentagem de distorção e de estresse foi alta (Quadro 14). Em princípio, tais resultados podem comprometer a utilização dessa projeção bidimensional na interpretação dos níveis de agrupamento.

Quadro 14 – Projeção de distância bidimensional sem transformação

Total das Distâncias Originais (do)	49,6767
Total das Distâncias Estimadas (de)	25,4259
Distorção (%)	48,8171
Correlação entre distâncias originais e estimadas	0,6234
Estresse (%)	54,0327

A transformação dos dados, elevando os valores à segunda potência ( $x \rightarrow x^2$ ), permitiu uma grande redução dos valores de distorção e estresse, com razoável aumento da correlação entre as distâncias originais e estimadas (Quadro 15). De acordo com a escala de Kruskal (1964), a percentagem de estresse observado (36,97) é classificada como moderada. Desse modo, a transformação tornou mais adequada a observação da disposição bidimensional dos pontos.

Quadro 15 – Projeção de distância bidimensional com transformação de dados ( $x \rightarrow x^2$ )

Total das Distâncias Originais (do)	24,1448
Total das Distâncias Estimadas (de)	18,2868
Distorção (%)	24,2618
Correlação entre distâncias originais e estimadas	0,6829
Estresse (%)	36,9773

A observação da disposição dos pontos permite inferir que as linhagens 12 e 14 estão bem próximas, da mesma forma as linhagens 2 e 15. Por outro lado, as linhagens 3, 4 e 5 encontram-se muito distantes entre si (Figura 5).

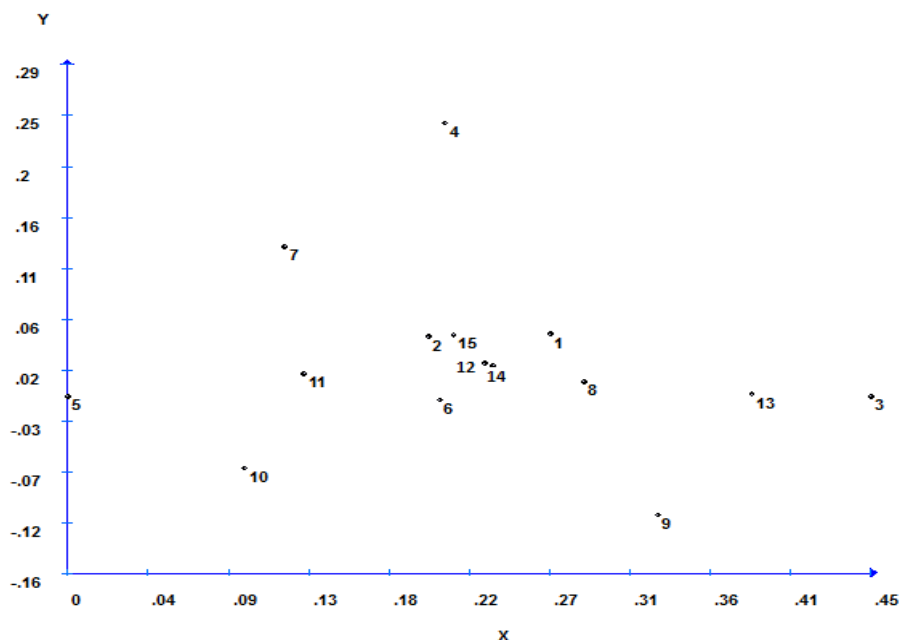


Figura 5 – Análise bidimensional com a transformação de dados ( $x \rightarrow x^2$ ) para as 15 linhagens de milho-pipoca.

Neste trabalho, por problemas de escala, a representação gráfica da projeção das distâncias no espaço foi pouco conclusiva. Assim, o acréscimo de uma dimensão à projeção bidimensional não contribuiu para a interpretação da disposição dos pontos que representam as linhagens avaliadas.

#### 4.6. Relação entre os agrupamentos e a genealogia das linhagens

A correspondência entre os dados moleculares e a genealogia dos materiais em estudo pode revelar o grau de consistência inerente à constituição dos grupos de genótipos avaliados.

As linhagens 3 e 5 foram as mais distantes entre si, dados os valores obtidos pela metodologia de Rogers (Quadro 8). Estas linhagens provieram de IAC-125 e CMS-43, respectivamente. A grande distância entre ambas decorre provavelmente da baixa similaridade genética entre os materiais. O híbrido topcross IAC-125 foi obtido a partir de cruzamentos envolvendo algumas pipocas amarelas de origem americana (germoplasma temperado), ao contrário do composto CMS-43, oriundo de 33 populações de pipoca branca, resistentes à ferrugem e à helmintosporiose.

Por outro lado, o par de linhagens mais próximas entre si foi constituído pelos genótipos 10 e 11, que têm como origem Zaeli e Catedral, respectivamente



(Quadro 8). O desconhecimento de maiores detalhes sobre a genealogia de Cathedral dificulta a justificativa da similaridade com a linhagem 10 proveniente de Zaeli.

No método de Tocher, as linhagens 3 (IAC-125) e 4 (Zélia) formaram seus próprios grupos e apresentaram maiores distâncias entre si (Quadro 11). A distância de Rogers entre elas também foi relativamente alta (Quadro 8).

Pode ser observado no dendrograma que, pelo método UPGMA, a linhagem 15, originada de Zaeli, permaneceu no mesmo grupo que as linhagens 2 e 7, ambas provenientes de Zélia (Figura 2). No entanto, quando o método de Tocher foi aplicado somente aos genótipos integrantes do grupo 1 (Quadro 12), a linhagem 15 formou um grupo próprio. É interessante observar que, tanto na aplicação do método de Tocher quanto na aplicação do UPGMA, as linhagens 10 e 15 não se posicionaram no mesmo grupo, embora tenham a mesma origem (Zaeli). É possível que a distância relativamente grande entre 10 e 15 seja decorrente de uma fixação diferenciada de alelos distintos, durante a síntese das famílias endogâmicas.

A linhagem 4, originada de Zélia, permaneceu isolada de todas as outras. Isso foi observado no dendrograma obtido pela aplicação do método UPGMA (Figura 2). Esse posicionamento foi observado também na constituição dos grupos, indicada pela aplicação do método de Tocher modificado (Quadro 10), da mesma forma que na projeção gráfica bidimensional (Figura 5). As linhagens 2 e 7, também procedentes de Zélia, sempre compartilharam o mesmo *cluster*. A inclusão das linhagens 2 e 7 no mesmo grupo é facilmente explicada por sua origem comum.

A exemplo do verificado com a linhagem 4, a família 1, originária de colombiana, também permaneceu isolada em seu próprio grupo. O isolamento da linhagem 1 deve decorrer da inexistência de genótipos de mesma origem.

As duas linhagens procedentes de IAC-125 (3 e 6) permaneceram no mesmo grupo no dendrograma UPGMA (Figura 2), juntamente com as originadas de IAC-112 e UEM-M2. O compartilhamento das mesmas famílias no mesmo grupo é justificado pela origem similar de IAC-112 e IAC-125. Por outro lado, porém, a linhagem 3 ficou isolada das demais ao ser aplicado o método de Tocher modificado (Quadro 10). Essa posição de afastamento pode ainda ser observada na Figura 5, ao verificarmos que a linhagem 3 está plotada na extremidade direita do gráfico. Tal resultado pode ser decorrente da fixação diferenciada de determinados alelos em homozigose, durante a evolução da endogamia que resultou na linhagem 3.

A linhagem 9, procedente de UEM-M2, sempre esteve agrupada com pelo menos um material originado de IAC-112 (Figura 2, Quadro 10 e 12). A população UEM-M2 é uma população local mantida por pequenos agricultores, com genealogia desconhecida e doada à UEM em 1996. O desconhecimento de maiores detalhes sobre sua genealogia não permite uma análise mais aprofundada do relacionamento genético entre a linhagem 9 com as linhagens procedentes do IAC. Embora uma parte da constituição genética de IAC-112 seja proveniente de pipocas sul-americanas bem adaptadas (Guarani e Viçosa), não há indícios de parentesco entre tais populações e UEM-M2.

#### **4.7. Agrupamento e utilização do germoplasma**

A utilização de marcadores moleculares pode auxiliar o processo de identificação de grupos heteróticos, tendo sido sugerida para tal fim por diversos pesquisadores (Melchinger, 1999; Oliveira, 2004; Silva, 2009). No entanto, a correlação entre os graus de divergência genética e o comportamento dos híbridos ainda é discutida. Alguns trabalhos mostram que análises de divergência genética nem sempre são úteis para predizer o desempenho dos híbridos obtidos (Barbosa et al., 2003; Guimarães et al, 2007). Por outro lado, Cruz (1990), em milho, verificou uma relação positiva entre a diversidade nos progenitores e a heterose nos híbridos. Assim, a vantagem de utilização dos marcadores parece maior quando houver um direcionamento voltado aos cruzamentos entre genótipos mais afastados, integrantes de grupos distintos. Tais cruzamentos, sintetizados a campo, produziram hibridações com maior probabilidade de heterozigose e, portanto, maior expressão fenotípica de dominância e epistasia.

No presente estudo, de acordo com o dendrograma UPGMA, os agrupamentos mais divergentes envolveram as linhagens 5, 10 e 11 quando confrontadas com as linhagens 1 e 4, particularmente esta última (Figura 2). Por outro lado, os dados do Quadro 11 (método de Tocher) apontam para o distanciamento entre as linhagens 3 e 4, oriundas de IAC-125 e Zélia (distância = 0,5865), chamando a atenção para o cruzamento.

Segundo a projeção dos genótipos no plano bidimensional, a Figura 5 permite observar que as linhagens 3 e 5 se mostraram relativamente afastadas entre si. No entanto, a recomendação de tal cruzamento pode ser questionada devido ao

valor relativamente alto do estresse associado (36,98; Quadro 15) e à distância relativamente pequena (0,4924; Quadro 11) entre os grupos 1 e 5, aos quais elas pertencem.

Independentemente do critério adotado na recomendação dos cruzamentos mais promissores, a linhagem 4, procedente de Zélia, em todos os casos, mostrou-se afastada dos demais genótipos. Essa constatação leva à inclusão da linhagem 4 como parental comum a vários cruzamentos dignos de atenção. No entanto, é importante ressaltar que a linhagem 4 apresentou maior heterozigosidade (Quadro 7), razão pela qual as progênies de seus cruzamentos podem apresentar alguma segregação nos locos estudados.

A análise dos resultados indicou que, em termos gerais, os agrupamentos observados a partir do emprego de diferentes metodologias coincidiram com a genealogia dos materiais. O número relativamente baixo de grupos mostrou uma tendência de concentrar, em cada *cluster*, genótipos de mesma procedência. As exceções foram justificadas pela possibilidade de fixação alélica divergente de linhagens de mesma origem, dada a natureza heterozigota dos ancestrais de cada família endogâmica.

## 5. CONCLUSÕES

a) A extração do DNA genômico dos indivíduos de cada linhagem permitiu a identificação de baixa heterozigosidade, confirmando a alta homozigose esperada em famílias endogâmicas.

b) O dendrograma produzido pelo método UPGMA se ajustou melhor à matriz das distâncias genéticas entre as linhagens do que aos dendrogramas derivados dos demais métodos hierárquicos aglomerativos.

c) O número de grupos indicado pelo método UPGMA foi superior ao obtido sob a metodologia de Tocher, evidenciando sua vantagem no agrupamento das linhagens.

d) A projeção gráfica bidimensional apresentou semelhança na discriminação das linhagens com o método UPGMA. No entanto, sua utilização pode ser questionada devido ao alto valor do estresse associado.

e) Apesar de algumas discrepâncias, grande parte dos grupos formados, a partir da análise molecular, reuniu genótipos de mesma origem.

f) As linhagens 1 e 4, de origem do híbrido Colombiana, e Zélia manifestaram grande dissimilaridade genética em relação às demais.

g) As linhagens 3 e 4, oriundas de IAC-125, e Zélia, respectivamente, manifestaram grande dissimilaridade genética nos locos analisados, podendo ser alternativas promissoras para a obtenção de heterozigose, voltada à seleção e exploração de heterose.

## 6. REFERÊNCIAS

ADEYEMO, O.; MENKIR, A.; MELAKU, G.; OMIDIJI, O. Genetic diversity assessment and relationship among tropical-yellow endosperm maize inbred lines using SSR markers. **Maydica**, 56:1703-1709, 2011.

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

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. Consultoria & Comércio; M&S Mendes & Scotini. São Paulo: FNP. Editora: Argos, 2013. 521p.

ANDRADE, R.A. **Cruzamentos dialélicos entre seis cultivares de milho-pipoca**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; BENCHIMOL, L.L.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, C. L.; SOUZA, A.P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, 130:87-99, 2003.

BORDALLO, P.N.; PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GABRIEL, A.P.C. Análise dialélica de genótipos de milho doce e comum para caracteres agronômicos e proteína total. **Horticultura Brasileira**, 23:123-127, 2005.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2013. 523p.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamento**. São Paulo: IME, USP, 1990.105p.

CAIXETA, E.T.; FERRÃO, L.F.V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.

COE, E.H.; NEUFFER, M.G.; HOISINGTON, D.A. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G.F. AND DUDLEY, J.W. (ed.) **Corn and corn improvement**. 3ed. Madison: Agronomy Monograph, 1988. cap. 18, p. 81-258.

COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S. Correlações entre caracteres na população de milho-pipoca DFT-1 Ribeirão. **Revista Ceres**, 48:427-435, 2001.

COIMBRA, R.R.; MIRANDA, G.V.; VIANA, J.M.S.; CRUZ, C.D.; MURAKAMI, D.M.; SOUZA, L.V.; FIDELIS, R.R. Estimation of genetic parameters and prediction of gains for DFT1- Ribeirão popcorn population. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:33-38, 2002.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Preços mínimos em vigor**. Disponível em: <<http://consultaweb.conab.gov.br/consultas>>. Acesso em: 30, setembro, 2011.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 585p.

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

CRUZ, C.D. **Programa genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 2006a. 175p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: UFV, 2006b. 382p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa: UFV. 2006c. 285p.

CRUZ, C.D.; SALGADO, C.C.; BHERING, L.L. Biometria aplicada à análise molecular em diversidade genética. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68.

CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S. A methodology of genetic divergence analysis based on sample unit projection on two-dimensional space. **Genetics and Molecular Biology**, 17:69-73, 1994.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. **Cultivares de milho disponíveis no mercado de sementes do Brasil**. Disponível em:<<http://www.cnpms.embrapa.br>>. Acesso em: 02, fevereiro, 2008.

DAROS, M.; AMARAL Jr., A.T.; GABRIEL, A.P.C.; SCAPIM, C.A.; FREITAS Jr., S.P.; SILVÉRIO, L. Recurrent selection in inbred popcorn families. **Scientia Agricola**, 61:609-614, 2004.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 2006. p. 405-475.

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, 1991.

EAST, E.M. The distinction between development and heredity in breeding. **American Naturalist**, 43:173-181, 1909.

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

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Edinburgh: Longman, 1996. 462p.

FERREIRA, M. E. Caracterização da biodiversidade e oportunidades tecnológicas. In: WORKSHOP BIODIVERSIDADE: PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES TECNOLÓGICAS, Campinas, SP, **Resumos...**, Brasília: Embrapa – Cenargem. 1996. p. 12.

FREITAS JUNIOR, S.P.; AMARAL Jr, A.T.; PEREIRA, M.G.; CRUZ, C.D.; SCAPIM, C.A. Capacidade combinatória em milho pipoca por meio de dialelo circulante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:1599-1607, 2006.

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.

GADHERI, A.; ADAMS, M.W.; NASSIB, A.M. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in dry Edible Bean and Faba Bean. **Crop Science**, 24:37-42, 1984.

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

GRANATE, M.J.; CRUZ, C.D.; PACHECO, C.A.P. Número mínimo de famílias meios-irmãos apara representar uma população de milho-pipoca. **Revista Ceres**, 48:209-221, 2001.

GRANER, E.A.; GODOY JUNIOR, E.C. **Culturas da fazenda brasileira**. São Paulo: Edições melhoramento, 1959. 461p.

GRIFFITHS, A.J.F; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W. M. **An Introduction to genetic analysis**. New York: W.H. Freeman, 2000. 860p.

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.

GUIMARÃES, P.S. **Desempenho de híbrido simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. 2007. 111p. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas. Dissertação (Mestrado Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia).

GUIMARÃES, P.S.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; LÜDERS, R.R.; SOUZA, A.P.; LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M. Correlação da heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 6:811-816, 2007.

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



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

KARASAWA, M.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; SILVA, M.P.; RIVA, E.M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da divergência genética entre acessos de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, 23:1000-1005, 2005.

KERR, W.E. **Melhoramento e genética**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1969. 301p.

KRUG, C.A.; VIÉGAS, G.P.; PAOLIERI, L. Híbridos comerciais de milho. **Bragantia**, Campinas, 3:367-551, 1943.

KRUSKALL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, 29:1-27, 1964.

KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, 17:143-182, 1999.

LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M.; GARCIA, A.A.F.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; SOUZA, A.P. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical and Applied Genetics**, 111:1288-1299, 2005.

LABORDA, P.R.; OLIVEIRA, K.M.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; SOUZA, A.P. Análise da diversidade genética entre linhagens de milho do banco de germoplasma do IAC utilizando marcadores microssatélites In: 1 CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1.. Goiânia, 2001. **Resumos....** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2001. 32p.

LARISH, L.B.; BREWBAKER, J.L. Diallel analyses of temperate and tropical popcorn. **Maydica**, 44:279-284, 1999.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advanced Agronomy**, 55:266-333, 1995.

LI, Y.L.; LV, D.B.; 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.

LINARES, E. **Seleção recorrente recíproca em famílias de meio-irmãos em milho-pipoca (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 1987. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

LIRA, M.A. **Seleção entre e dentro de famílias de meio-irmãos para produção e capacidade de expansão e correlações entre alguns caracteres em milho-pipoca (*Zea mays* L.)**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1983. 63p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).

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

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1997. 611p.

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.

LUZ, M.L.S.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; BRACCIN, A.L.B.; ROYER, 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.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAICA, E. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2002. 22p. (Circular Técnica).

MARCHIORO, V.S.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; CRUZ, P.J.; LORENCETTI, C.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G.; SCHMIDT, D. A. M. Dissimilaridade genética entre genótipos de aveia. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:285-294, 2003.

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. Eficiências relativas dos processos de seleção entre e dentro de famílias de meios-irmãos em população de milho-pipoca. **Ciência e Agrotecnologia**, 27:548-556, 2003.

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.

MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (eds.). The genetics and exploitation of heterosis in crops. Madison: **Crop Science Society of America**, 54:99-118, 1999.

MENKIR, A.; MELAKE-BERHAN, A.; THE, C.; INGELBRECHT, I.; ADEPOJU, A. Grouping of tropical mid-altitude maize inbred lines on the basis of yield data and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:1582-1590, 2004.

MIRANDA, D.S.; SILVA, R.R.; TANAMATI, A.A.C.; CESTARI, L.A.; MADRONA, G. S.; SCAPIM, M.R. Avaliação da qualidade do milho-pipoca. **Revista Tecnológica**, Maringá, Edição Especial V Simpósio de Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, p.13-20, 2011.

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.

OLIVEIRA, A.C.B.; SEDIYAMA, M.A.N.; PEDROSA, M.W.; GARCIA, N.C.P.; GARCIA, S.L.R. Divergência genética e descarte de variáveis em alface cultivada sob sistema hidropônico. **Acta Scientiarum-Agronomy**, 26:211-217, 2004.

OLIVEIRA, K.M.; LABORDA, P.R.; GARCIA, A.A.F.; ZAGATTO-PATERNIANI, M.E. A.G.; SOUZA, A.P. Evaluating genetic relationships between tropical maize inbred lines by means of AFLP profiling. **Hereditas**, 140:24-33, 2004.

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

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

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J.B. Melhoramento de populações. In: PATERNIANI, E. (ed.). **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: ESALQ, 1978. p. 202-246.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Eduem, 2009. 351p.

PÍPOLO, C.V.; TAKAHASHI, H.W.; ENDO, R.M.; PETEK, M.R.; SEIFERT, A.L. Correlações entre caracteres quantitativos em milho pipoca. **Horticultura Brasileira**, 20:551-554, 2002.

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.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUSA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C. **Genética na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. 565p.

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**, 6:1020-1030, 2008.

RANGEL, R.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; VIANA, A.P. FREITAS JÚNIOR, S.P. Prediction of popcorn hybrid and composite means. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 7:287-295, 2007.

RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometrical research**. New York: John Willey and Sons, 1952. 390p.

RETUCI, V.S. **Distância genética entre linhagens de milho (*Zea mays* L.) estimadas por RAPD e correlação com a heterose dos híbridos simples.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 34p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

RIBEIRO, R.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GONÇALVES, L.S.A.; CANDIDO, L.S.; SILVA, T.R.; PENA, G.F. Genetic progress in the UNB-2U population of popcorn under recurrent selection in Rio de Janeiro. **Genetics and Molecular Research**, 11:1417-1423, 2012.

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**, 6:1013-1018, 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.

ROCHA, D. **Cultivo comercial do milho-pipoca ainda é limitado no Brasil.** Disponível em: <<http://brasilatual.com.br/sistema>>. Acesso em: 29, fevereiro, 2009.

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

ROHLF, F.J.; SOKAL, R. R. Comparing numerical taxonomic studies. **Systematic Zoology**, 30:459-490, 1981.

RUFFATO, S.; CORREA, P.C.; MARTINS, J.H.; MANTOVANI, B.H.M.; SILVA, J.N. Influência do processo de secagem sobre a massa específica aparente, massa específica unitária e porosidade de milho-pipoca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 3:45-48, 1999.

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.

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

SAWAZAKI, E. **Parâmetros genéticos em milho-pipoca (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: Escola Superior Agricultura Luiz de Queiroz, 1996. 157p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

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

SAWAZAKI, E.; DUARTE, A.P. **Milho pipoca**. Boletim 200 - Informações agrícolas para as principais culturas econômicas. Campinas: Instituto Agronômico, 2014. 452p.

SAWAZAKI, E.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; CASTRO, J.L.; GALLO, P.B.; GALVÃO, J.C.C.; SAES, L.A. Potencial de linhagens locais de milho-pipoca para síntese de híbridos. **Bragantia**, 59:143-151, 2000.

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 dialélica e heterose de populações de milho-pipoca. **Bragantia**, 61:219-230, 2002.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, 109:65-71, 2000.

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.

SHULL, G.H. A pure line method of corn breeding. **Report "Americam Breeders Association"**, 5:51-59, 1909.

SIBOV, S.T.; SOUZA, C.L.; GARCIA, A.A.F.; GARCIA, A.F.; SILVA, A.R.; MANGOLIN, C.A.; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P. Molecular mapping in tropical

maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. **Hereditas**, 139:96-106, 2003.

SILVA, T.A.; PINTO, R.J.B.; 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.

SIMON, G.A.; SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; PINTO, R.J.B.; BRACCINI, A.L.; TONET, A. Depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, 63:55-62, 2004.

SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. The description and assessment of distances between inbred lines of maize: I. The use of morphological traits as descriptors. **Maydica**, 34:141-150, 1989.

SOUZA, F.F.; QUEIRÓZ, M.A.; DIAS, R.S.C. Divergência genética em linhagens de melancia. **Horticultura Brasileira**, 23:179-183, 2005.

TERRA, T.F.; WIETHOLTER, P.; ALMEIDA, C.C. ANJOS E SILVA, S.D.; BERED, F.; SERENO, M.J.C.M.; BARBOSA NETO, J.F. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. **Ciência Rural**, 41:205-211, 2011.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, 10:967-981, 2000.

TROJANOWSKA, M.R.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 9: 221-238, 2004.

VASCONCELOS, E.S.; CRUZ, C.D.; BHERING, L.L.; RESENDE JÚNIOR, M.F.R. Método alternativo para análise de agrupamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1421-1428, 2007.

VIEIRA, M.L.C.; VELLO, N.A.; SILVA FILHO, M.C. Genética e melhoramento vegetal. In: MIR, L. (ed.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 679-703.

VIENNE, D. **Molecular markers in plant genetics and biotechnology**. Enfield: Science Publishers. 2002. 200p.

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.

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.

ZANETTE, V.A. Análise da variabilidade genética em populações de milho-pipoca (*Zea mays* L.): heterose da capacidade de expansão do grão. **Agronomia Sulriograndense**, 25:173-181, 1989.

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. **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Piracicaba: Esalq, 1978. p. 339-348.

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