

JACINTO VAGNER RUPP

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE MILHO DOCE UTILIZANDO
MARCADORES SSR**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JULHO – 2008

JACINTO VAGNER RUPP

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE MILHO DOCE UTILIZANDO
MARCADORES SSR**

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

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
JULHO – 2008

Aos meus pais, Geraldo José Rupp e Helena Clara de Almeida Rupp.

Às minhas irmãs, Lucia e Aline.

À minha namorada e companheira, Ariane.

Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e colocar inúmeras pessoas especiais na minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá e à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, professora doutora Maria Celeste Gonçalves Vidigal, pela oportunidade da realização deste curso.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por tudo o que me ensinaram.

À minha orientadora, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela competente orientação, profissionalismo e amizade.

À minha co-orientadora, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, por sua valiosa atenção, sabedoria e paciência.

A todos os professores e alunos do Departamento de Agronomia (DAG), pelo convívio amigo e prestativo.

Aos técnicos de laboratório, Leila e Sérgio, pela valiosa amizade e importante contribuição com sugestões para a condução dos experimentos.

A todos os companheiros do Curso e estagiários do Laboratório de Eletroforese de Cultura de Tecidos de Vegetais e Laboratório de Genética Animal, pelo companheirismo de todas as horas.

Ao secretário do PGM e amigo José Francisco da Cruz, pela atenção e competência em todos os momentos.

Ao meu amigo Valério Balani, pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos amigos Freddy Luis Mora Poblete e Cristiane Zocatelli pelo apoio durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os professores e amigos do Colégio Franciscano Nossa Senhora de Fátima e Colégio Cenicista Nadir Maggi, pelo apoio e incentivo.

Finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Jacinto Vagner Rupp, filho de Geraldo José Rupp e Helena Clara de Almeida Rupp, nasceu em Joaçaba, Estado de Santa Catarina, aos vinte e cinco dias do mês de dezembro de 1979.

Concluiu, em 1994, o Ensino Fundamental no Colégio Estadual Monteiro Lobato, Umuarama, Paraná.

No Curso e Colégio Alfa de Umuarama, Estado do Paraná, Concluiu, em 1997, o Ensino Médio.

Graduou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Paranaense, Campus de Umuarama, em dezembro de 2002,

Em março de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Análise Genética Vegetal.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Origem do milho doce	4
2.2. Classificação botânica e características do milho doce	4
2.3. A cultura do milho doce no Brasil	5
2.4. Alelos mutantes e o melhoramento genético do milho doce	6
2.5. Marcadores moleculares	8
2.5.1. Seqüências Simples Repetidas (SSR) no DNA ou microssátelites	10
2.5.2. Características genéticas dos <i>loci</i> SSR	11
2.5.3. Uso de marcadores SSR ou microssatélite no melhoramento genético..	11
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Extração e quantificação do DNA das plantas de milho doce	13
3.2. Amplificação do DNA	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

RUPP, Jacinto Vagner. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, julho de 2008. **Diversidade genética em progênies de milho doce utilizando marcadores SSR.** Professora Orientadora: Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Professores Conselheiros: Dra. Claudete Aparecida Mangolin e Dr. Carlos Alberto Scapim.

A proposta do presente estudo é utilizar os *primers* de SSR (Seqüências Simples Repetidas de DNA), conhecidos também como microssátelites, previamente isolados de milho comum para selecionar aqueles mais adequados para amplificar seqüências de microssátelites no DNA das progênies do cultivar de milho doce *sugary-1 (su1)*. Os produtos das amplificações devem informar sobre a diversidade genética do material em estudo, sobre a estrutura genética das populações de linhagens que estão sendo formadas, e sobre a distância e/ou similaridade entre as linhagens avaliadas. Dentre 100 *primers* testados, 13% foram polimórficos. Os 13 *primers* polimórficos (*umc1071*, *umc1636*, *umc1736*, *umc1506*, *umc1582*, *umc1383*, *umc2080*, *umc1446*, *umc1590*, *umc1241*, *umc2343*, *umc1169*, e *umc2116*) foram usados para investigar a diversidade genética em 15 progênies de milho doce (W-06, W-07, W-10, W-12, W-16, W-17.1, W-22, W-26, W-28, W-30, W-36, W-37, W-17.2, W-46, e W-49), por determinar bandas bem definidas no gel e por apresentar alelos diferentes. Os *primers umc2116* e *umc1383* evidenciaram 2 e 3 alelos em 73,33% e 66,66%, respectivamente, das progênies, e o *primer umc1582* foi o menos polimórfico. Um excesso de genótipos heterozigotos no *locus Umc2116* pode ser constatado nas progênies W-12, W-28, W-26, W-46, W-30, e W-17.2. As freqüências de alelos distribuídas de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram verificadas em 21,53% dos testes feitos nas 15 progênies. A progênie W-26 apresentou o maior número de *loci* polimórficos (92,31%) e o maior número de alelos por *locus* polimórfico. A progênie W-06 não apresentou polimorfismo, e as progênies W-12, W-17.1, e W-10, foram as que apresentaram a menor proporção de *loci* SSR polimórficos (23,08%). A progênie W-46 apresentou a maior proporção de genótipos heterozigotos observada ($H_o = 0,3385$), e a progênie W-28 apresentou a maior proporção de genótipos heterozigotos esperada ($H_e =$

0,3368). A ausência de polimorfismo nos 13 *loci* SSR da progênie W-06 e os valores altos e baixos para a proporção de *loci* polimórficos e heterozigosidades observada e esperada nas diferentes progênies, determinam uma diferenciação genética muito alta entre as 15 progênie *su1* na geração S₅ ($F_{ST} = 0,6515$). Desta forma, é possível concluir que o processo de seleção para a formação destas 15 progênies *su1* de milho doce tem conduzido à formação de progênies altamente diferenciadas para os 13 *loci* SSR analisados. O valor positivo para o coeficiente F_{IS} indica um excesso de 4,36% de genótipos homozigotos na geração S₄. O nível de divergência genética mostra a formação de três agrupamentos principais onde as progênies estão distribuídas num intervalo de similaridades ou identidades (I) genéticas de 0,2085 a 0,8716. As progênies W-17.1 e W-26 são as mais similares (I = 0,8716) e as progênies W-37 e W-49 são as mais divergentes geneticamente (I = 0,2085). Os valores estimados para a identidade genética entre as progênies podem ser úteis para direcionar cruzamentos promissores, para selecionar a característica de interesse mantendo, ou ampliando a diversidade genética em *loci*, que em princípio, são considerados neutros, como os *loci* SSR.

Palavras-chave: milho doce, microsatélites, diversidade genética.

ABSTRACT

RUPP, Jacinto Vagner. M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, July 2008. **Microsatellites for the characterization of genetic diversity in sweet maize.** Adviser Professor: Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Members: Dra. Claudete Aparecida Mangolin and Dr. Carlos Alberto Scapim.

DNA Simple Sequences Repeated (SSR) primers, also known as microsatellites, previously isolated from common maize, were employed to select the most adequate one for the amplification of microsatellite sequences in the DNA of sweet maize, cultivars *sugary-1 (su1)*. Amplification products inform the genetic diversity of the material under analysis, the genetic structure of developing progenies, populations and the distance and/or similarity between evaluated progenies. In the context of 100 primers, 13% were polymorphic (*umc1071*, *umc1636*, *umc1736*, *umc1506*, *umc1582*, *umc1383*, *umc2080*, *umc1446*, *umc1590*, *umc1241*, *umc2343*, *umc1169*, and *umc2116*) and used to investigate the genetic diversity in 15 strains of sweet maize (W-06, W-07, W-10, W-12, W-16, W-17.1, W-22, W-26, W-28, W-30, W-36, W-37, W-17.2, W-46, and W-49) through the determination of well-defined bands in gel and through the existence of different alleles. Primers *umc2116* and *umc1383* showed 2 and 3 alleles, respectively in 73.33% and 66.66% of strains; primer *umc1582* was the least polymorphic. Excess of heterozygous genotypes in *locus umc2116* has been pinpointed in strains W-12, W-28, W-26, W-46, W-30, and W-17.2. Frequency of alleles distributed according to Hardy-Weinberg equilibrium has been verified in 21.53% of tests in 15 progenies. W-26 had the highest number of polymorphic *loci* (92.31%) and the greatest number of alleles per polymorphic *locus*. Strain W-06 failed to present any polymorphism, whereas strains W-12, W-17.1 and W-10 had the least proportion of polymorphic *loci* SSR (23.08%). Strain W-46 had the highest proportion of heterozygous genotypes ($H_o = 0.3385$), while strain W-28 showed the highest proportion of expected heterozygous genotypes ($H_e = 0.3368$). Absence of polymorphism in 13 SSR *loci* of strain W-06 and high and low rates for the proportion of polymorphic *loci* and heterozygosity found and expected in the different strains determined a high genetic differentiation among the 15 *su1* progenies in generation S_5 ($F_{ST} = 0.6515$). It may be concluded that the selection

process for the formation of the 15 *su1* strains of sweet maize has led towards the formation of highly differentiated strains for the analyzed 13 SSR *loci*. Positiveness for coefficient F_{IS} indicates an excess of 4.36% of homozygous genotypes in S_5 generation. Genetic divergence level shows the formation of three main groupings in which progenies are distributed in intervals of genetic similarities or identities (I) from 0.2085 to 0.8716. W-17.1 and W-26 are the most alike (I = 0.8716), whereas W-37 and W-49 are genetically the most divergent (I = 0.2085). Estimated rates for genetic identity among progenies may be useful for promising crossings, for the selection of interest characterization while keeping or amplifying the genetic diversity in the *loci*, as a rule neutral, such as SSR *loci* SSR.

Key words: sweet maize, microsatellites, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os registros de Gleason e Cronquist (1991), o milho é uma planta da família Poaceae, divisão Liliopsida originária da América Central, que apresenta grande capacidade de adaptação a diversos climas, sendo plantado em praticamente todas as regiões do mundo, nos hemisférios norte e sul, em climas úmidos e regiões secas. Os mesmos autores (Gleason e Cronquist, 1991) registram também que pouco se sabe a respeito da evolução do milho doce e que duas teorias foram formuladas na tentativa de elucidar esta incógnita. Uma das hipóteses considera o milho doce como uma espécie distinta, usada como fonte de alimento pelos índios norte-americanos. A outra identifica o milho doce como o produto de uma mutação de origem relativamente recente, provinda do milho comum. A primeira hipótese não é bem aceita, uma vez que apenas uma única espiga foi encontrada em uma ruína asteca, no Novo México (Huelsen, 1954).

Alguns autores destacam que parece pouco provável que o milho doce tenha aparecido na natureza como uma raça selvagem, similarmente aos outros tipos de milho (Machado, 1980). Este tipo de milho pode ser considerado como um produto de mutação seguida de domesticação, pois uma nova fonte de açúcar certamente não seria ignorada pelas tribos indígenas americanas.

Segundo Souza et al. (1990), o milho doce é caracterizado por apresentar grãos com alto teor de açúcares e muito pouco amido no endosperma, o que torna os grãos enrugados e translúcidos quando secos. Este material apresenta uma versatilidade de uso muito grande, podendo ser utilizado no consumo humano, tanto *in natura* como também na forma de produto industrializado.

No Brasil, a produção de milho doce é voltada, em sua grande maioria, para a indústria de conservas, garantida por meio de contratos realizados diretamente entre as indústrias e os produtores. A exploração da cultura é realizada durante todo o ano, utilizando-se irrigação, e o escoamento da produção permite um fluxo constante do produto para a comercialização. Apesar do potencial, o cultivo do milho doce é pouco difundido no Brasil e isso se deve, principalmente, à inexistência de programas de melhoramento que visam ao desenvolvimento de variedades bem adaptadas e com caracteres agrônômicos desejáveis. Programas de melhoramento do milho doce foram iniciados em

1979/80 por diversos Centros Nacionais de Pesquisa e por Agroindústrias. (Teixeira et al., 2001)

As sementes de milho doce, devido a elevados teores de açúcares solúveis no endosperma, rugosidade característica no tegumento e pericarpo delicado, são mais susceptíveis à deterioração e ao ataque de pragas durante a maturação. Além disso, o padrão de germinação das sementes de milho doce é 20% inferior ao milho comum (Netto et al., 2007). Wilson Junior e Trawatha (1991) apontaram a maturidade incompleta das sementes como um dos fatores causadores de um efeito prejudicial na sua qualidade e, segundo Araújo et al. (2002), o pericarpo delgado torna as sementes mais susceptíveis às danificações mecânicas.

No melhoramento do milho doce, Teixeira et al. (2001) destacam que se deve levar em consideração, além da produtividade e caracteres de interesse agrônômicos, os aspectos relacionados à qualidade dos mesmos. Além disso, consideram que o melhoramento do milho doce deve atender às necessidades do agricultor e do consumidor. Ao agricultor interessa produtividade elevada e os demais atributos de uma boa variedade de milho normal. No sentido de atender aos pré-requisitos, tanto da qualidade como da produtividade, em 2005, na Universidade Estadual de Maringá-PR, foi iniciado um programa de melhoramento genético para milho doce.

Conforme a exposição de alguns autores (Ferreira e Grattapaglia, 1998), em um programa de melhoramento genético, é importante a caracterização molecular da diversidade genética do germoplasma em estudo, caracterização esta que pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na seleção dos progenitores de populações básicas para as próximas gerações. Os marcadores moleculares vêm sendo usados para estimar a diversidade genética entre genitores de uma população, geralmente por meio da similaridade ou dissimilaridade (distância) genética. A análise da diversidade genética se destina à identificação de genitores adequados para obtenção de híbridos com maior efeito heterótico e que proporcionem maior segregação em recombinações, resultando em bons híbridos (Destro e Mantalván, 1999).

As estimativas da diversidade genética do milho doce parecem ainda um assunto pouco explorado, pois poucos são os registros na literatura especializada descrevendo este parâmetro. Alguns autores têm abordado a análise da

diversidade genética em milho doce usando os próprios genes que conferem característica doce para a variedade (Jones et al., 1995). Vários alelos têm sido registrados para o gene *su1*, por exemplo (Dinges et al., 2001). No gene *su1*, têm sido descritos, inclusive, alelos nulos e mutações que causam clivagens alternativas, (splicing) do mRNA produto do gene *su1*. A respeito das mutações descritas para os genes responsáveis pela característica doce do milho, as observações de Whitt et al. (2002) são de que *loci* alvos da seleção natural têm relativamente um nível de variação genética baixa.

Estudos preliminares têm apontado a análise de seqüências simples repetidas de DNA (SSR: Simple Sequence Repeated) ou microssatélite como um dos marcadores moleculares mais adequados para estimar a variabilidade genética em milho doce (Barbosa-Neto et al., 2005). Os *loci* SSR, em principio, não são alvo da seleção artificial e o uso de marcadores SSR tem sido recomendado para a análise da origem e evolução do milho cultivado (Natsuaka et al., 2002)

O presente estudo utiliza os primers de SSR previamente isolados de milho comum para selecionar aqueles mais adequados para amplificar seqüências de microssatélites no DNA das progênies *su1* do cultivar de milho doce *sugary-1* (*su1*). Os produtos das ampliações serão analisados usando programas específicos e os resultados obtidos deverão informar sobre a diversidade genética do material em estudo, sobre a estrutura genética das populações de progênies que estão sendo formadas e sobre a distância e/ou similaridade entre as progênies avaliadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem do milho doce

Desde os primórdios da civilização, o milho (*Zea mays L.*) tem sido no Ocidente uma cultura de grande importância (Tracy, 2001). Originário da América, provavelmente da região onde se situa o México, foi domesticado no período entre 7000-10000 anos atrás (Aragão, 2002).

Seu desenvolvimento nesta região esteve intimamente relacionado à evolução agrícola dos povos que viviam naquela época. Segundo Tracy (2001), o milho doce (*Zea mays L.*), contendo o alelo *sugary (su)*, existiu na América Central e do Sul no período pré-colombiano.

Acredita-se que o milho doce tenha ocorrido na natureza como produto de uma mutação seguido de uma domesticação. Provavelmente, ele foi identificado por estas civilizações como uma nova fonte de carboidrato, sendo então domesticado e utilizado como alimento (Machado, 1980). Uma das hipóteses para explicar esta teoria diz respeito à característica do alelo *sugary* para a viabilidade das sementes. Este fator resultaria em baixa capacidade evolutiva comparativamente ao milho sem a mutação (Tracy, 2001).

2.2. Classificação botânica e características do milho doce

O milho doce (*Zea mays L. grupo saccharata*) pertence à família das *Poaceas*, tribo *Maydeae*, do gênero *Zea*, e da espécie *Zea mays L.* ($2n=20$). O homem herdou aproximadamente 300 raças de milho, caracterizadas pelas mais diferentes adaptações, tanto para condições climáticas como para usos do cereal. Aragão (2002) descreve que a botânica e a reprodução do milho doce são idênticas às do milho comum. A cultura do milho doce, normalmente, é anual e a propagação é realizada por sementes, enquanto o plantio é feito diretamente no campo (Kurozawa, 2007).

O milho doce apresenta características próprias, diferenciando-se do milho comum. Ele é um tipo de milho mutante que difere do selvagem ou dentado por uma mutação no *locus sugary (su)*. Esta diferenciação se encontra apenas na semente que, após a maturação, seca vagarosamente e, uma vez seca, torna-se

vítrea e enrugada; vítrea devido à cristalização dos açúcares que se encontram em maior concentração e enrugada devido à baixa proporção de amido no endosperma (Stork e Lovato, 1991). A semente é provida de sabor adocicado, pericarpo fino e endosperma com textura delicada, sendo, também, possuidora de um elevado valor nutricional. Assim ocorre um acúmulo de cerca de duas vezes mais açúcar no endosperma do que no milho selvagem. Atualmente, existem muitas variedades disponíveis e vários novos mutantes têm sido usados para melhorar o sabor do milho doce, particularmente os genes *brittle (bt)* e *shrunk-2 (sh₂)* (Barbosa-Neto et al., 2005). Essa mutação promove o bloqueio da conversão de açúcar em amido, para a formação do amilopectina no endosperma, o qual confere um caráter mais doce ao grão de milho (Barbieri et al., 2005).

A planta de milho doce possui em média de 1,30 a 2,50 m de altura, caule ereto, cilíndrico, fibroso, separado em porções por gomos, e, geralmente, recoberto por uma parte da folha denominada bainha. As folhas são de tamanho médio a grande, cor verde-escura a verde-clara, flexíveis e apresentam uma nervura central branca, lisa e bem visível. A planta produz flor masculina (flecha ou pendão) na sua parte mais alta, onde produz os grãos de pólen e a flor feminina (espiga) à meia altura. Cada fio (cabelo) que sai da espiga é responsável pela produção de um grão, depois de fecundada. O milho doce produz bem em épocas do ano com média a alta temperatura e boa disponibilidade de água no solo durante todo o ciclo da planta. A colheita de espigas é feita quando os grãos estão em estado leitoso. Os grãos maduros e secos ficam totalmente enrugados devido ao baixo teor de amido na sua composição (Paiva et al., 1992; Kurozawa, 2007).

2.3. A cultura do milho doce no Brasil

O milho doce é uma das hortaliças mais comuns nos EUA e Canadá. Atualmente, a área mundial cultivada é de 900 mil hectares. No Brasil, cultivam-se apenas 38 mil hectares e praticamente 100% da produção é destinada ao processamento industrial, movimentando em torno de 550 milhões de reais por ano (Syngenta, 2008). A área cultivada no Brasil ainda é muito pequena quando comparada à mundial e, segundo Gama et al. (1992), dentre os fatores que dificultam uma rápida difusão do consumo do milho doce entre os consumidores

brasileiros está a inexistência de cultivares adaptadas às nossas condições ambientais.

A produção concentra-se nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e Pernambuco (Parentoni et al., 1990). Na região Nordeste, este produto, principalmente na forma de espiga, possui muita importância econômica devido ao expressivo consumo regional e a sua utilização como matéria prima de muitos pratos da culinária local (Pedrotti et al., 2003).

A exploração da cultura é realizada durante todo o ano utilizando-se irrigação e o escalonamento da produção, permitindo um fluxo constante do produto para a comercialização (Teixeira et al., 2001). Este seguimento tem crescido nos últimos anos e a tendência é a manutenção deste crescimento, visando principalmente o mercado para exportação (Barbieri et al., 2005). Assim, o Brasil, como um grande produtor de milho comum, apresenta grande potencial para a produção de milho doce. Entretanto, em virtude do pouco conhecimento por parte dos consumidores e da pequena disponibilidade de sementes, seu cultivo tem sido restrito (Teixeira et al., 2001). Araujo et al. (2006) registram uma expectativa de que, em pouco tempo, o milho doce se tornará uma importante cultura no Brasil, podendo ser uma alternativa agrônômica altamente rentável. No Brasil, com a expansão do mercado de milho doce para a indústria de enlatados de milho verde e maior preocupação com sua qualidade (Aragão et al., 2003), algumas empresas governamentais e privadas vêm desenvolvendo programas de melhoramento para produção de cultivares de milho doce adaptadas ao clima de cada região (Scapim et al., 1995), que apresentem endosperma com conversão reduzida de açúcar em amido (Gama et al., 1983; Fornasieri Filho, 1992).

2.4. Alelos mutantes e o melhoramento genético do milho doce

Diversos alelos foram identificados no milho doce e estes são utilizados comercialmente. Todos eles são caracterizados por apresentarem alterações na composição dos carboidratos no endosperma, mas diferenciam-se quando à proporção de amido e açúcar no grão; também são diferenciados quanto à posição que estes alelos ocupam no cromossomo (Tracy, 2001).

Quadro 1 - Alelos mutantes de endosperma utilizados em híbridos de milho doce

Alelos	Símbolo	Enzima	Fenótipo
<i>Amylose-extender1</i>	<i>ae1</i>	Starch branching enzyme lib	Doce
<i>Brittle1</i>	<i>bt1</i>	Starch granule bound phospho-oligosacharide synthase	Superdoce
<i>Brittle2</i>	<i>bt2</i>	ADH-glucose pyrophosphorylase	Superdoce
<i>Dull1</i>	<i>du1</i>	Soluble starch synthase	Doce
<i>Shrunken2</i>	<i>sh2</i>	ADH-glicose fosforilase	Superdoce
<i>Sugary</i>	<i>su1</i>	Starch debranching isoamylase	Doce
<i>Sugary enhancer1</i>	<i>se1</i>	Desconhecido	Superdoce

FONTE: Adaptado de Tracy (2001).

Boyer e Shannon (1984) afirmaram que os alelos mutantes, que promovem a biosíntese de amido, podem ser divididos em duas classes conforme o efeito na composição do endosperma. Na primeira classe, alelo *brittle1* (*bt1*), *brittle2* (*bt2*) e *shrunken2* (*sh2*) acumulam grande quantidade de açúcares, entre 18 e 40% em detrimento ao amido. Segundo Tracy (2001), no momento da colheita, o grão contém de quatro a oito vezes a quantidade de açúcar de um grão de milho comum (3 a 5%) e por isso é classificado como do tipo superdoce.

Na segunda classe, os alelos *amilose extender1* (*ae1*), *dull1* (*du1*), *sugary1* (*su1*) e *waxy1* (*wx1*) alteram o tipo e quantidade de polissacarídeos produzidos. Os alelos *ae1*, *du1* e *wx1* resultam em menor quantidade de amido quando comparado ao milho convencional. Entretanto, não são utilizados como milho doce, a não ser se combinado com outros alelos, o que pode resultar em menos teores de açúcar encontrado na primeira classe.

O alelo *su1* aumenta a concentração de polissacarídeos solúveis em água, aumentando, por conseguinte, de 5 a 9% o teor de açúcar, sendo, então,

utilizado na forma simples ou em conjunto com outros mutantes. Por esta razão, é classificado como do tipo doce. Os híbridos deste grupo, normalmente, apresentam melhor vigor e germinação das sementes quando comparados com os do grupo superdoce. Contudo, possuem menor período de colheita, devido a uma conversão de açúcar em amido que ocorre após a colheita (Tracy, 2001).

Finalmente, o alelo *sugary enhancer 1 (se1)* não se enquadra em nenhuma das duas classes propostas anteriormente, além de não ser conhecido o seu modo de ação bioquímico. Quando combinado em homozigose com o alelo *su1*, também resulta em teores de açúcares próximos da primeira classe e níveis de polissacarídeos solúveis em água similares ao fenótipo *su1* não modificado (Tracy, 2001).

Atualmente, devido ao interesse de mercado, algumas empresas do setor sementeiro mantêm programas de melhoramento genético, buscando o desenvolvimento de um maior número de híbridos comerciais que sejam adaptados às nossas condições ambientais. Desta maneira, torna-se fundamental estudar práticas de manejo mais adequadas ao desenvolvimento destes híbridos (Barbieri et al., 2005).

Segundo Sawazaki et al. (1990), a espessura do pericarpo afeta a maciez do grão e, quanto mais fina, melhor a qualidade do milho que vem sendo produzido no Brasil. Algumas empresas governamentais e privadas vêm desenvolvendo programas de melhoramento para produção de cultivares de milho doce que apresentam endosperma com conversão reduzida de açúcar em amido, melhorando o déficit germinativo. Porém, a aceitação pelo consumidor é necessária e indispensável quando se quer colocar um novo produto no mercado, sendo que a preferência do consumidor é uma importante ferramenta no processo dos programas de melhoramento.

2.5. Marcadores moleculares

Inicialmente, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos determinados por mutações simples em um gene particular, gerando alterações fenotípicas de fácil identificação no organismo. Mesmo com essas limitações, os marcadores morfológicos contribuíram

significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica. No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações restringiram sua utilização (Guimarães e Moreira, 1999).

A seleção de genitores e o planejamento dos cruzamentos são de fundamental importância para o sucesso de um programa de melhoramento (Borém, 1997). Nestas etapas podem ser empregados os marcadores moleculares, que fornecem aos melhoristas informações genéticas adicionais e mais detalhadas dos genótipos, aumentando a probabilidade de obtenção de cultivares superiores. A identificação e seleção de genitores superiores são tarefas críticas em espécies perenes como fruteiras e essências florestais, uma vez que o tempo para a obtenção de uma cultivar melhorada é bastante longo.

Os autores Ferreira e Grattapaglia (1996) destacam que o desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular tornou possível a manipulação do DNA, culminando no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares. Um marcador molecular foi definido como todo e qualquer fenótipo decorrente da expressão de um gene, como no caso de proteínas, caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA (corresponde a regiões expressas ou não no genoma), cuja seqüência e função podem ou não ser conhecidas (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Segundo Guimarães e Moreira (1999), os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e também por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse.

O avanço das técnicas moleculares tem sido acompanhado pelo grande desenvolvimento nas áreas da bioinformática e da genética quantitativa, as quais igualmente têm contribuído para o atual nível de conhecimentos sobre a estrutura genética de várias espécies cultivadas e silvestres. Atualmente, estão disponíveis mapas genéticos saturados para a maioria das espécies vegetais, além do desenvolvimento de metodologias cada vez mais precisas voltadas à análise de *loci* gênicos associados a caracteres quantitativos (QTLs). A aplicação dessas

metodologias para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem resultado em grandes avanços no desenvolvimento de variedades.

2.5.1. Seqüências Simples Repetidas (SSR) no DNA ou microssátelites

Hedrich (2001) ressalta que os marcadores genéticos tradicionais geralmente apresentam baixa informação estatística para estimar diferenças genéticas, mas a descoberta de *loci* altamente variáveis como, os *loci* SSR ou microssátelites é promissora para determinar as diferenças entre grupos de espécies de risco.

Os microssátelites, também conhecido pela repetição simples de seqüência (SSR) ou repetições curtas em tandem (STR), são as regiões repetidas do DNA composta de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, em seqüências que são difundidas em genomas eucariotos (Field e Wills, 1998; Toth et al., 2000). Usados amplamente como marcadores genéticos, os microssátelites têm um atributo particular, pois sofrem elevadas taxas de mutação no genoma (Jame e Lagoda, 1996). O microssatélite é classificado, de acordo com o tipo de seqüência de repetição, em imperfeito, interrompido ou composto. Em um microssatélite perfeito a seqüência de repetição não é interrompida por nenhuma base que não pertença a esta repetição (TATATATATATATA). Por outro lado, se houver um par de bases diferente entre as repetições, este é um microssatélite imperfeito (TATATATACTATATA). No exemplo de um microssatélite interrompido há uma seqüência pequena dentro de outra seqüência repetida, diferente da seqüência original (TATATACGTGTATATATATA). No microssatélite composto, a seqüência contém duas seqüências repetidas distintas (TATATATATAGTGTGTGT GT).

De acordo com Heywood e Iriondo (2003), os marcadores de microssatélite fornecem a informação relevante, identificando unidades de conservação e investigando os processos genéticos que ocorrem nas populações, tais como testes padrões de fluxo de gene, de gerações geneticamente vizinhas, e da incidência da tração genética. Atualmente, os marcadores de microssátelites são empregados geralmente para a análise da estrutura genética da população de planta de ambas as espécies (Zucchu et al., 2002) e espécies selvagens (Pinto et al., 2003a, b). Devido à sua natureza co-dominante e multialélicos, os microssátelites fornecem um elevado nível de informação genética por *locus*.

2.5.2. Características genéticas dos *loci* SSR

Um *locus* homozigoto de microsatélite tem o mesmo número de repetições em ambos os cromossomos homólogos, visto que um *locus* heterozigoto de microsatélite tem um número diferente de repetições para cada alelo, por exemplo, um alelo pode conter 9 repetições e outros 10. Entretanto, no mesmo *locus* a população ao todo contém geralmente diversos alelos, cada um com um número diferente de repetições. Isso significa que os marcadores de microsatélites são muito úteis para discriminar indivíduos diferentes.

Diversos mecanismos foram sugeridos para explicar a elevada taxa de mutação dos microsatélites, podendo ocorrer durante a recombinação (*crossing-over*), desiguais e resvalamento da polimerase durante a replicação ou o reparo do DNA (Strand *et al.*, 1993). Os microsatélites não são distribuídos regularmente dentro de um único genoma, devido às diferenças em suas freqüências dentro do códon e das seqüências do anticódon (Arcot *et al.*, 1995, Wilder e Hollocher, 2001) e os papéis funcionais diferentes das possíveis repetições. Nas plantas, a freqüência estimada é 0.85% em *Arabidopsis* e 0.37% em *Zea mays*; nos peixes, é de 3.21%; em *Tetraodon nigroviridis* é de 2.12%; em *Fugu rubripes* (Crollius *et al.*, 2002) e, no cromossomo 22 dos *Homo sapiens*, a freqüência de microsatélites é de 1.07%; no genoma inteiro dos *Caenorhabditis elegans*, é de somente 0.21% (Tóth *et al.*, 2000).

2.5.3. Uso de marcadores SSR ou microsatélite no melhoramento genético

Ferreira e Grattapaglia (1998) relataram que o melhoramento genético de plantas tem sido praticado com sucesso desde os primórdios da civilização e que, tradicionalmente, o progresso no melhoramento tem se baseado exclusivamente na análise de fenótipos. Esta forma de análise limita a eficiência de estudos relacionados com caracteres que apresentam heranças poligênicas, dominâncias parciais ou completas. Segundo os referidos autores, as complicações das análises fenotípicas podem ser evitadas por meio da identificação direta de genótipos, sugerindo que um diagnóstico diretamente em nível de DNA, baseados em marcadores moleculares que segregam com os genes de interesse, podem ser utilizados para esta finalidade. Estes marcadores apresentam potencial de

facilitar o monitoramento de materiais como linhagens e cultivares, utilizadas em programas de melhoramento com o objetivo de ampliação da base genética.

Devido à expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR, têm sido considerados como os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC). Os marcadores SSR são muito freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Estes marcadores são ideais para o mapeamento genético e físico de genomas e são úteis para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia; 1998). Além disso, os marcadores SSR são úteis para detectar heterozigosidade de um *locus* específico, o que é importante para o acompanhamento da pureza genética e para a observação do nível de endogamia dos materiais elites utilizados em programas de melhoramento genético (Padilha, 2002).

Estudos realizados por Amorim et al. (2003), para verificar a variabilidade genética em milho doce utilizando marcadores moleculares (*RAPD* e *SSR*), detectou que o conteúdo de informação de polimorfismo variou de 0,50 a 0,89 e a similaridade genética de 0,79, para *RAPD*, e 0,49, para *SSR*. Barbosa-Neto et al. (2005) empregaram também marcadores *RAPD* e *SSR* para estudar a variabilidade genética em milho doce, constatando maior similaridade entre as populações do que dentro das populações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extração e quantificação do DNA das plantas de milho doce

Para a extração de DNA das amostras, foram utilizadas 10 plantas de cada progênie da geração S4, extraídas da cultivar de milho doce BRS 401 Embrapa. Para a extração de DNA das amostras, foram coletadas folhas de 10 plantas de cada progênie, com cerca de 20 dias de crescimento, totalizando 150 indivíduos. O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994) com pequenas modificações.

A extração foi realizada usando tubos para microcentrifuga (2 mL), contendo 300 mg de tecido vegetal previamente pulverizado com nitrogênio líquido e 800 µL de tampão de extração CTAB (Tris-HCl 100mM pH 7,5; NaCl 700mM; EDTA 50mM pH 8,0; CTAB 1% e 140 mM de β-mercaptoetanol), previamente preparado. Os tubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria, a 65°C, durante 1 hora, realizando-se agitações suaves a cada 5 minutos. Após serem removidos do banho, quando atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio: álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1, com inversão suave durante 5 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos com 13.000 r.p.m na temperatura ambiente. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para microtubos limpos de 1,5 mL e novamente foram adicionados 800µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), com agitação suave durante 5 minutos, sendo novamente centrifugados com 13000 r.p.m. por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante coletado foi transferido para microtubo limpo e para precipitar o DNA foram adicionados 300 µL de isopropanol gelado e misturados levemente por inversão, por 1 minuto. As amostras foram mantidas *over-night* em -20°C para uma melhor precipitação.

Após esta etapa, foi efetuada uma centrifugação com 13000 r.p.m. por 5 minutos, na temperatura ambiente. Após ter sido descartado o sobrenadante, 800 µL de etanol 70% gelado foram adicionados e misturando levemente por inversão por 1 minuto e realizada outra centrifugação a 13.000 r.p.m. por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após descartado o sobrenadante e sido feita a secagem

do *pellet* de DNA, foram adicionados 400 μL de TE (1M TRIS/HCl e 0,5M EDTA) e mantido *over-night* em 4°C.

Após este período, foram adicionados 2 μL de RNase (10ng. μL^{-1}) à mistura e deixada na temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 200 μL de fenol mais 200 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), procedendo uma agitação durante 5 minutos e centrifugando com 13.000 r.p.m. por 5 minutos na temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para microtubos limpos, adicionando 400 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), procedendo à agitação durante 5 minutos e centrifugando com 13.000 r.p.m. por 5 minutos na temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para microtubos limpos, adicionando 250 μL de isopropanol e 25 μL de NaCl 5M, misturados por inversões suaves por 1 minuto. A mistura foi mantida *over-night* em -20°C .

Após este tempo, foi realizada uma centrifugação com 13.000 r.p.m. por 5 minutos na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 700 μL de etanol 70% gelado, misturando por inversão por 1 minuto. Após efetuar uma nova centrifugação com 13.000 r.p.m. por 5 minutos na temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco e ressuspenso em 50 μL de TEO. O DNA foi estocado a 4°C.

A quantificação do DNA extraído foi feita por análise em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X - Tris, acetato de sódio, EDTA, pH 8,0 - (Hoisington et al., 1994), usando soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas. O gel foi corado em solução de brometo de etídio, contendo 0,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290, utilizando o programa Kodak 1D 3.5

3.2. Amplificação do DNA

Para a escolha dos marcadores polimórficos entre as progênies a serem avaliadas, foram testados 100 pares de *primers* microssatélites já mapeados para milho comum. Todos os microssatélites que foram utilizados foram obtidos a partir do *site Maize BD* at <http://www.maizegdb.org>.

A PCR (Polimerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, usando um termociclador Techne TC-512. Para a padronização da reação foram testados: 50, 30 e 25 ng de DNA de duas

amostras de DNA, com 2,0 μL de tampão de reação 10X, com 2,5 mM de MgCl_2 , com 0,8 μM de cada dNTP, com 0,2 U de Taq-DNA Polimerase, e 0,4 μM de *primer F* e *R* específico em um volume final de 20 μL .

Para a amplificação dos microssátelites (Quadro 2), inicialmente, foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991). Para a amplificação dos *primers umc1169* e *umc2116*, que não foram amplificados com o programa *Touchdown PCR*, foi utilizado um programa específico: 94°C 5 minutos, 35 X 94°C 30 seg; 52°C 30 seg; 72°C 1 min; e extensão final 72°C por 5 min.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose MS-8 4%, usando tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA) e o gel foi preparado com 50% agarose MS-8 e 50% agarose normal. A eletroforese foi realizada com 60 Volts por 4 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio, contendo 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290, utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular 100Pb *DNA Ladder* (Invitrogen).

Quadro 2 - Seqüência do programa utilizado para amplificação do DNA de *Zea mays* L.

PASSO	Etapa	Temperatura	Douchdown
1	Desnaturação inicial	94°C	1 min.
2	Desnaturação	94°C	1 min.
3	Anelamento	65°C (-1° C/Ciclo)	1 min.
4	Extensão	72 °C	2 min.
5	Desnaturação	94 °C	1 min.
6	Anelamento	65°C (-1° C/Ciclo)	1 min.
7	Extensão	72 °C	2 min
8	Volta ao passo 2-9 vezes		
9	Desnaturação	94 °C	1 min.
10	Anelamento	55 °C	1 min.
11	Extensão	72 °C	2 min.
12	Volta ao passo 9-17 vezes		
13	Extensão Final	72°C	2 min.
14	Imersão	100 °C	

Os *loci* polimórficos foram identificados e o número médio de alelos por *locus* polimórfico, a heterozigosidade observada (H_o) e a esperada (H_e) foram estimadas para as 15 progênies estudadas. O desvio em relação ao equilíbrio de

Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus* e para cada progênie. O coeficiente de endogamia (F_{is}), o déficit de heterozigotos (F_{it}) e a proporção da diversidade genética entre as populações (F_{st}) foram estimados empregando-se o programa POPGENE 1.32 (YEH, et al., 1999).

A identidade genética de Nei e as distâncias entre todas as progênies também foram estimadas. Usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetc Average*), foi gerada uma matriz de similaridade e os agrupamentos em um dendrograma. Para essa análise, foi utilizado o programa POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999) e o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei, 1972).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação visual da intensidade das bandas de DNA, em gel de agarose das folhas jovens das 15 progênies *su1* de milho doce, com amostras de DNA do fago λ , indicou que a quantidade de DNA genômico extraído das folhas variou de 10 a 70 ng. μL^{-1} (Figura 1).

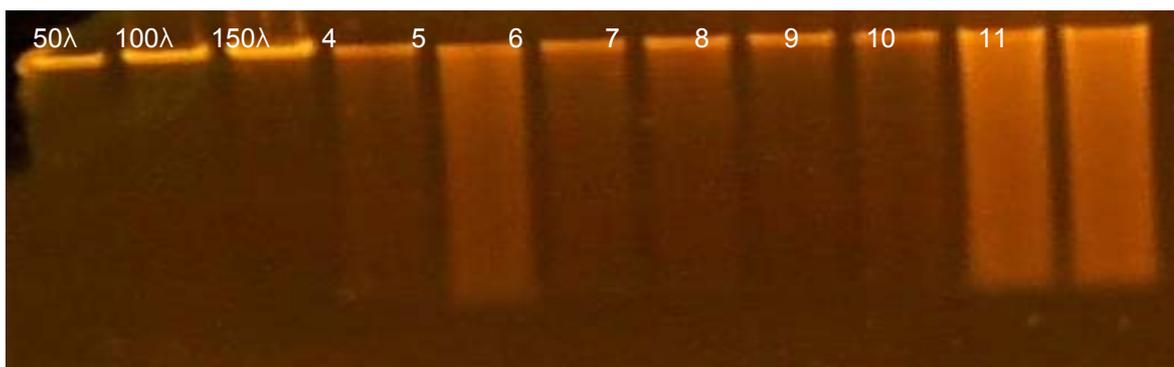


Figura 1 - Gel de agarose utilizado para quantificar o DNA extraído das diferentes progênies de milho doce. Amostras de 4 a 11 são DNAs extraídos das diferentes linhagens. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de fago λ de 50, 100 e 150 ng.

Para a otimização das condições de amplificação, foi adotado como concentração adequada 25 ng de DNA/20 μL de reação de amplificação, uma vez que o perfil das bandas gerado foi o mesmo de 25 a 70 ng. As concentrações dos reagentes que produziram um padrão de bandas reproduzíveis estão indicadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes/reação	nL/20 μL de Reação
H ₂ O			12,1
Tampão	10 X	1X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5mM	1,6
DNTPs	2,5mM/cada	0,1mM/cada	0,8
Primer (F)	10 μM	0,3 μM	0,4
Primer (R)	10 μM	0,3 μM	0,4
Taq-DNA	5 U/ μL	1 U	0,2
Polimerase			
DNA	10 ng/ μL	25ng	2,5
Total			20 μL

A seleção dos microssatélites foi realizada utilizando-se apenas duas amostras de DNA das progênies, escolhidas aleatoriamente e analisadas em gel de agarose MS8 para verificar a complementariedade e reprodutibilidade dos *primers*. Dentre os 100 *primers* testados, 13% foram polimórficos, determinando bandas bem definidas no gel e alelos diferentes (Quadro 4).

As plantas que apresentaram apenas uma banda no gel definiram o fenótipo homozigoto. As amostras como duas bandas definiram o fenótipo heterozigoto (Figura 2), verificado nas amostras das progênies su1 de milho doce.

Em amostras do DNA das progênies W-12 e W-07, nos *loci umc1446*, *umc1590*, e *ums1169*, foi observado um padrão formado por três bandas, o que contraria a expectativa padrão de duas bandas para os organismos diplóides, a exemplo do milho ($2n = 20$).

Quadro 4 – Sequências dos *primers* de microssatélites, número de alelos detectados por cada *primer* localização destes nos cromossomos, usados na estimativa da diversidade genética nas 15 progênies de milho doce

<i>Locus</i>		Sequência de Nucleotídeos	Cromossomo
<i>umc1071</i>	Forward	AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG	
<i>umc1071</i>	Reverse	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTCGTATT	1
<i>umc1636</i>	Forward	GTA CTGGTACAGGTCGCTCTT	
<i>umc1636</i>	Reverse	CATATCAGTCGTTCTGTCAGCTAA	9
<i>umc1736</i>	Forward	CCATCCACCACTAGAAAGAGAGGA	
<i>umc1736</i>	Reverse	TTAATACGATCGAGAGGTGCTTTTC	2
<i>umc1506</i>	Forward	AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG	
<i>umc1506</i>	Reverse	ATAAAGGTTGGCAAACGTAGCCT	10
<i>umc1582</i>	Forward	AGATTACGTAGCCACGCTTATTCG	
<i>umc1582</i>	Reverse	GTGCGTGTGAGAGTGATATCGAG	10
<i>umc1383</i>	Forward	CACACACATCGATCATGAGCATA C	
<i>umc1383</i>	Reverse	GTGTACTACCATCAGACCCATCCA	1
<i>umc2080</i>	Forward	GCCAAGGTGGGTCTGGCTAT	
<i>umc2080</i>	Reverse	ACCACCTTGTCCGTATCCTTCCAC	1
<i>umc1446</i>	Forward	GCGCTGCTGCTTCTTAAATTATCT	
<i>umc1446</i>	Reverse	GATGAGACCACCTACAAGTTCGCT	1
<i>umc1590</i>	Forward	CAGAGTCTGATAGTCCGAACCCAG	
<i>umc1590</i>	Reverse	GTAAAGCTCACAGCTTCCGACAG	1
<i>umc1241</i>	Forward	TGAAGCAAGTCACTGGTAAGAGCA	
<i>umc1241</i>	Reverse	TGAACACCCATACTTCCAACAAG	7
<i>umc2343</i>	Reverse	CTCTGTTTTTGAAGAAGCTTTTGG	
<i>umc2343</i>	Forward	CGTCGTCTTCGACATGTA CTTCAC	9
<i>umc1169</i>	Forward	TAGCCAACAGTCCAACATTTTTCA	
<i>umc1169</i>	Reverse	CAGGCTAGAATAACATCCCGAAGA	1
<i>umc2116</i>	Forward	CGGTCGATATAATCTTGCTGATT	
<i>umc2116</i>	Reverse	GGCGCAGAGATCATTTGTTTAAT	1

Este fenótipo de três bandas não pode ser elucidado na presente investigação, mas deve ser registrado como um aspecto promissor para futuras investigações.

Quadro 5 – Frequências dos alelos nos *loci umc* das 15 progênies *su1* de milho doce (W-06, W-07, W-12, W-16, W-17.1, W-22, W-28, W-26, W-37, W-46, W-38, W-49, W-30, W-10, e W-17.2) desenvolvidas a partir da combinação de híbridos comerciais

<i>Locus</i>	Alelos	W-06	W-07	W-12	W-16	W-17.1	W-22	W-28	W-26	W-37	W-46	W-38	W-49	W-30	W-10	W-17.2
<i>Umc1071</i>	A	1,0000	0,1000		1,0000		0,2000	0,8000	0,2000	0,5000		0,7500		1,0000		1,0000
	B		0,5000	1,0000		1,0000	0,7000	0,2000	0,8000	0,5000	0,5000		0,1000			
	C		0,4000				0,1000				0,5000	0,2500	0,9000		1,0000	
<i>Umc1636</i>	A	1,0000	1,0000		1,0000	0,6000	1,0000	0,8000	0,7000	1,0000	0,6000	0,1250		1,0000		0,2500
	B			1,0000		0,4000		0,2000	0,3000		0,4000	0,8750	1,0000		1,0000	0,7500
<i>Umc1736</i>	A	1,0000	0,8000	1,0000	0,5000	1,0000	1,0000	0,5000	0,5000	1,0000	0,6000	0,8750	0,5000	1,0000	0,5000	0,5000
	B		0,2000		0,5000			0,5000	0,5000		0,4000	0,1250	0,5000		0,5000	0,5000
<i>Umc1506</i>	A	1,0000	1,0000				0,4000	0,4000		1,0000	1,0000	0,2500		1,0000		
	B			1,0000		1,0000	0,4000	0,6000	0,6000							
	C				1,0000		0,2000		0,4000			0,7500	1,0000		1,0000	1,0000
<i>Umc1582</i>	A	1,0000	0,6000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000		1,0000
	B		0,4000					0,4000					1,0000		1,0000	
<i>Umc1383</i>	A	1,0000	0,2000	0,2000	0,2000	0,4000		0,2000			1,0000		0,4000			
	B		0,4000	0,4000	0,4000		1,0000	0,5000	0,1000	0,5000		0,5000	0,6000	0,4000	1,0000	1,0000
	C		0,4000	0,4000	0,4000	0,6000		0,3000	0,9000	0,5000		0,5000		0,6000		
<i>Umc2080</i>	A				0,4000				0,1000	0,4000	0,1000			0,4000		1,0000
	B		1,0000	1,0000		1,0000	1,0000		0,8000	0,6000	0,6000	0,7500	0,8000	0,6000		
	C	1,0000			0,6000			1,0000	0,1000		0,3000	0,2500	0,2000		1,0000	
<i>Umc1446</i>	A	1,0000	1,0000	0,4000	0,6000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9000	1,0000	0,8000	0,2500		0,8000		1,0000
	B			0,6000							0,1000	0,7500	1,0000	0,2000	1,0000	
	C				0,4000				0,1000		0,1000					
<i>Umc1590</i>	A		0,9000				0,4000									
	B	1,0000	0,1000	1,0000	1,0000			1,0000	0,2000				1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
	C					1,0000	0,6000		0,8000	1,0000	1,0000	1,0000				
<i>Umc1241</i>	A	1,0000	0,8000		0,4000	1,0000	1,0000	0,8000	0,8000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	0,5000
	B		0,2000	1,0000	0,6000			0,2000	0,2000				1,0000			0,5000
<i>Umc2343</i>	A		1,0000			1,0000	0,6000	0,4000	0,8000	1,0000	0,5000	0,6250		1,0000		
	B	1,0000		1,0000	1,0000		0,4000	0,6000	0,2000		0,5000	0,3750	1,0000		1,0000	1,0000
<i>Umc1169</i>	A		0,4000	1,0000			1,0000		0,8000		0,3000	0,1250		0,3000	0,2000	
	B	1,0000	0,4000		1,0000	1,0000		1,0000	0,2000	1,0000	0,7000	0,8750	1,0000	0,7000	0,8000	1,0000
	C		0,2000													
<i>Umc2116</i>	A		0,6000	0,4000		0,4000	1,0000	0,7000		0,5000		0,7500		0,9000	0,2000	
	B		0,4000	0,6000		0,6000		0,3000	0,9000		0,4000		1,0000		0,8000	0,7500
	C	1,0000			1,0000				0,1000	0,5000	0,6000	0,2500		0,1000		0,2500

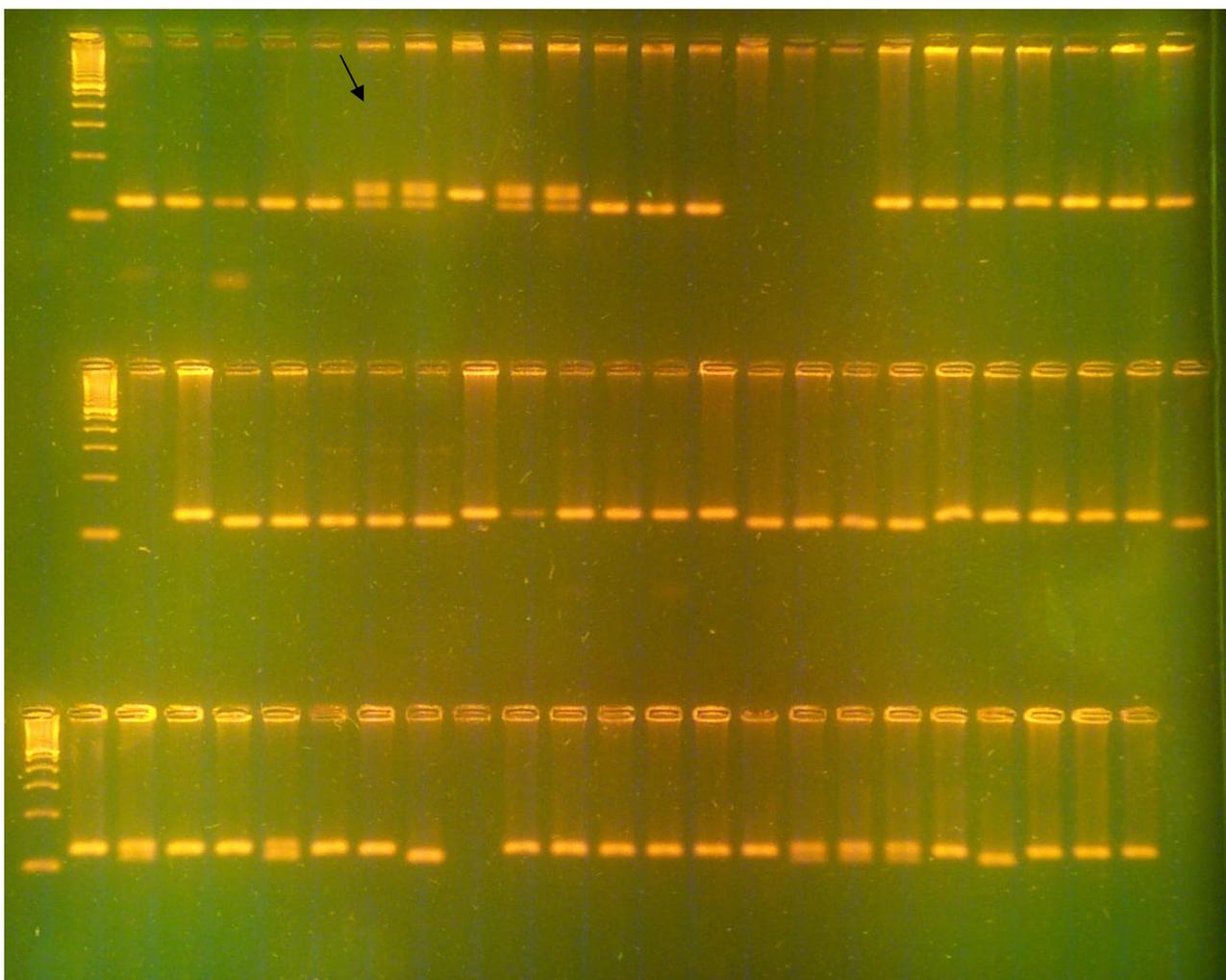


Figura 2 – Amplificação usando o *primer umc1169* do DNA genômico de 14 progênies de milho doce, indicando *locus* triploide para a linhagem W-07 (*Laeder* 100 pb).

A despeito do número reduzido de *primers* realmente efetivos para a análise de polimorfismo em genótipos de milho doce, este é um resultado promissor porque, embora não seja possível garantir que os *primers umc1071, umc1636, umc1736, umc1506, umc1582, umc1383, umc2080, umc1446, umc1590, umc1241, umc2343, umc1169, e umc2116* possam ser utilizados para a estimativa de diversidade genética em outras linhagens de milho doce, estes *primers* podem, em princípio, ser recomendados para futuras investigações em genótipos *su1* de milho doce. Os *primers umc2116 e umc1383*, por exemplo, evidenciaram 2 ou 3 alelos em 73,33% e 66,66%, respectivamente, das progênies *su1* de milho doce, na geração S₄. O *primer umc1582* foi o menos polimórfico porque diferentes alelos para este *locus* foram evidentes somente nas progênies W-07 e W-28 de *su1*.

Outros 6 *primers* para *loci* de seqüências simples repetidas, (SSR) de *DNA*, *umc1620*, *umc1023*, *umc1097*, *umc1034*, *umc1331*, e *umc1648*, mostraram maior número de alelos (de 2 até 6 alelos) em populações de *su1* melhorada da Embrapa, obtidas por polinização aberta (Barbosa-Neto et al., 2005).

Vários autores têm analisado as mutações em *loci* SSR de milho e apresentado evidências de diferentes taxas e tipos de mutações nos *loci* SSR, assim também como nas regiões “flanqueadoras” dos *loci* (Vigouroux et al., 2002, 2003; Lia et al., 2007). Vigouroux et al. (2003), por exemplo, verificaram e descreveram a ocorrência de evolução direcional no tamanho dos *loci* SSR em milho originados do México, da América do Norte e da América do Sul, indicando uma correlação negativa entre o tamanho do alelo e a altitude dos três grupos de plantas e sugerindo que a taxa de mutação seja dependente do tempo e local de cultivo. Os diferentes mecanismos, simples e complexos, que determinam as alterações nos *loci* SSR podem justificar a ineficiência dos *primers* SSR (somente 13%) desenvolvidos para os genótipos de milho de clima temperado, para detectar polimorfismo em *loci* SSR de cultivares adaptadas ao clima tropical.

O Quadro 5 apresenta o número de alelos e suas respectivas freqüências em cada um dos *locus* de microssatélites analisados para cada progênie de milho doce. O número de alelos por *locus* nas progênies variou de 1 a 3, com um total de 34 alelos.

O significado funcional das seqüências simples repetidas no genoma das progênies *su1* de milho doce é desconhecido, mas parece interessante destacar que as freqüências dos alelos que formam as seqüências do *locus umc2116*, por exemplo, estão distribuídas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em oito (W-07, W-12, W-17.1, W-28, W-26, W-46, W-30, e W-17.2) das 15 progênies, a despeito destas progênies estarem na geração S₄ (Quadro 6). Um excesso de genótipos heterozigotos no *locus umc2116* (valores negativos de F_{IS}) pode ser constatado nas progênies W-12, W-28, W-26, W-46, W-30, e W-17.2. As freqüências de alelos distribuídas de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificadas em 21.53% dos testes feitos nas 15 progênies. A progênie W-46 foi a que apresentou o maior número de *loci* SSR (7 *loci*) cujas freqüências dos alelos atendem à expectativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg na geração S₅.

Quadro 6 - Valores dos qui-quadrados e dos índices de fixação (*F*) de Wright (1975), que informam o déficit ou excesso de heterozigotos nos 13 *loci* microssátelites para as progênies W-06, W-07, W-12, W-16, W-17.1, W-22 e W-28 *su1* de milho doce

Locus	W-06		W-07		W-12		W-16		W-17.1		W-22		W-28	
	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F
<i>Umc1071</i>	-	-	2,8 ^{NS}	0,3103	-	-	-	-	-	-	4,0 ^{**}	0,13	9,14 ^{**}	1,000
<i>Umc1636</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4 ^{**}	1,000	-	-	0,14 ^{NS}	-0,25
<i>Umc1736</i>	-	-	0,1428 ^{NS}	-0,25	-	-	4,00 ^{**}	1,000	-	-	-	-	4,0 ^{**}	-1,000
<i>Umc1506</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,25 ^{NS}	-0,25	0,4 ^{NS}	0,1667
<i>Umc1582</i>	-	-	1,6 ^{NS}	-0,6667	-	-	-	-	-	-	-	-	6,4 ^{**}	1,000
<i>Umc1383</i>	-	-	13,0 ^{**}	-0,25	13,0 ^{NS}	-0,25	13,0 ^{**}	-0,25	6,4 ^{**}	1,000	-	-	10,3 ^{**}	0,032
<i>Umc2080</i>	-	-	-	-	-	-	1,6 ^{NS}	-0,6667	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1446</i>	-	-	-	-	1,6 ^{NS}	-0,6667	1,6 ^{NS}	-0,6667	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1590</i>	-	-	0,00 ^{NS}	-0,111	-	-	-	-	-	-	1,6 ^{NS}	-0,6667	-	-
<i>Umc1241</i>	-	-	9,14 ^{**}	1,000	-	-	6,4 ^{**}	1,000	-	-	-	-	9,14 ^{**}	1,000
<i>Umc2343</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6 ^{NS}	-0,6667	0,4 ^{NS}	0,1664
<i>Umc1169</i>	-	-	13,0 ^{**}	-0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Umc2116</i>	-	-	0,4 ^{NS}	0,1667	1,6 ^{NS}	-0,6667	-	-	1,6 ^{NS}	1,000	-	-	0,57 ^{NS}	-0,4286

Quadro 6, cont...

Locus	W-26		W-37		W-46		W-38		W-49		W-30		W-10		W-17..2	
	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F	χ^2	F
<i>Umc1071</i>	9,14**	1,000	2,5 ^{NS}	0,60	2,56 ^{NS}	0,60	7,2**	1,000	0,00 ^{NS}	-0,1111	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1636</i>	0,57 ^{NS}	-0,42	-	-	1,6 ^{NS}	-0,667	0,00 ^{NS}	-0,1429	-	-	-	-	-	-	0,00 ^{NS}	-0,33
<i>Umc1736</i>	4,0**	-1,000	-	-	1,6 ^{NS}	-0,667	0,00 ^{NS}	-0,1429	4,0**	-1,000	-	-	4,0**	-1,000	1,00 ^{NS}	-1,000
<i>Umc1506</i>	6,4**	1,000	-	-	-	-	7,2**	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1582</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1383</i>	0,00	-0,1111	4,0**	-1,000	-	-	5,33**	1,000	6,4**	1,000	0,4 ^{NS}	0,1667	-	-	-	-
<i>Umc2080</i>	9,14**	0,41	1,6 ^{NS}	-0,6667	1,6 ^{NS}	-0,48	7,2**	1,000	9,14**	1,000	0,4 ^{NS}	0,1667	-	-	-	-
<i>Umc1446</i>	0,00	1,000	-	-	9,14**	0,41	7,2**	1,000	-	-	9,14**	0,1667	-	-	-	-
<i>Umc1590</i>	9,14**	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1241</i>	9,14**	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0**	1,000
<i>Umc2343</i>	9,14**	1,000	-	-	0,04 ^{NS}	-0,20	1,6 ^{NS}	0,4667	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Umc1169</i>	9,14**	1,000	-	-	2,28 ^{NS}	0,53	0,00 ^{NS}	-0,1424	-	-	0,57 ^{NS}	-0,4286	9,14**	1,000	-	-
<i>Umc2116</i>	0,00	-0,1111	4,0**	-1,000	1,6	-0,667	7,2**	1,000	-	-	0,00 ^{NS}	-0,1111	9,14**	1,000	0,00 ^{NS}	-0,33

^{NS} – não significativo

** - significativo

A análise do polimorfismo nos *loci* SSR das progênies *su1* na geração S₄ mostrou que a progênie W-26 apresentou o maior número de *loci* polimórficos (92,31%) e o maior número de alelos por *locus* polimórfico (Quadro 7). A progênie W-06 não apresentou polimorfismo nos 13 *loci* SSR analisados, uma evidência sugestiva de que os alelos destes *loci* na referida progênie já estão todos em homozigose e as progênies W-12, W-17.1, e W-10 foram as que apresentaram a menor proporção de *loci* SSR polimórficos (23,08%). Os valores para a proporção de *loci* SSR polimórficos distribuídos no intervalo entre zero e 92,31%, assim como os valores para as estimativas da proporção de heterozigotos observada (H_o) e esperada (H_e) para cada uma das progênies *su1* de milho doce analisada no presente estudo estão relacionados na Quadro 7. A progênies W-46 apresentou a maior proporção de genótipos heterozigotos observada (H_o = 0,3385) e a progênie W-28 apresentou a maior proporção de genótipos heterozigotos esperada (H_e = 0,3368).

Quadro 7 - Número de plantas analisadas (N), número de alelos por *locus* polimórfico (N_a), proporção de *loci* polimórficos (%P), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) nas 15 progênies W-06, W-07, W-12, W-16, W-17.1, W-22, W-28, W-26, W-37, W-46, W-38, W-49, W-30, W-10, e W-17.2 de milho doce

Linhasgens	N	N _(a)	%P	H _o	He
W-06	5	1,0	00,0	00,0	00,0
W-07	5	1,84	61,54	0,2923	0,3111
W-12	5	1,3	23,08	0,1846	0,1368
W-16	5	1,46	38,46	0,2615	0,2205
W-17.1	5	1,23	23,08	0,0615	0,1231
W-22	5	1,46	30,77	0,2154	0,1761
W-28	5	1,76	69,23	0,2615	0,3368
W-26	5	2,00	92,31	0,1846	0,3316
W-37	5	1,3	30,77	0,2308	0,1692
W-46	5	1,76	61,54	0,3385	0,3197
W-38	4	1,76	76,92	0,0769	0,3077
W-49	5	1,30	30,77	0,0923	0,1265
W-30	5	1,38	38,46	0,1231	0,1607
W-10	5	1,23	23,08	0,0769	0,0974
W-17.2	2	1,307	30,77	0,1538	0,1795
TOTAL	71	2,61	100,0	0,1723	0,5124

A ausência de polimorfismo nos 13 *loci* SSR da progênie W-06 e os valores altos e baixos para a proporção de *loci* polimórficos e heterozigoidades, observada e esperada nas diferentes progênies, determinam uma diferenciação genética muito alta entre as 15 progênies *su1* na geração S₄ ($F_{ST} = 0,6515$ - Quadro 8). De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} superiores a 0,25 indicam uma divergência interpopulacional muito alta. Desta forma, é possível concluir que o processo de seleção para a formação destas 15 progênies *su1* de milho doce tem conduzido à formação de progênies altamente diferenciadas para os 13 *loci* SSR analisados.

O déficit de genótipos heterozigotos nas 15 progênies *su1* está indicado pelo valor positivo do coeficiente $F_{IS} = 0,0436$. O valor positivo para F_{IS} indica um excesso de apenas 4,36% de genótipos homozigotos na geração S₄ das progênies *su1* de milho doce. O valor positivo e alto para o coeficiente F_{IT} ($F_{IT} = 0,6667$) indicado na Quadro 08, que reflete a endogamia global determinada por cruzamentos não causais presente nas populações (Wright, 1975), deve ser resultado do processo de seleção (auto-polinização), que tem conduzido à formação das 15 progênies *su1* de milho doce por 4 gerações.

O nível de divergência genética entre as 15 progênies *su1* para os 13 *loci* SSR está indicado pelos valores de identidade entre as mesmas (Nei, 1978) no dendrograma da Figura 3. O dendrograma está formado por três agrupamentos principais, nos quais as progênies estão distribuídas num intervalo de similaridades ou identidades (I) genéticas de 0,2085 a 0,8716. As progênies W-17.1 e W-26 são as mais similares (I = 0,8716), enquanto as progênies W-37 e W-49 são as mais divergentes geneticamente (I = 0,2085) para os 13 *loci* SSR. As progênies W-06, W-28, W-16, e W-17.2 compõem o grupo I, apresentando maior similaridade genética, enquanto as progênies W-12, W-49 e W-10 formam o grupo III com menor similaridade genética e, portanto, maior diversidade genética entre as referidas progênies. As progênies W-07, W-22, W-37, W-30, W-17.1, W-26, W-46, e W-38 formam um grupo II, intermediário, nos quais estão organizadas as progênies com identidade genética alta e moderada.

Quadro 8 - Coeficientes de fixação F ($F_{(IS)}$, $F_{(IT)}$, $F_{(ST)}$; Wright, 1965) e valores do fluxo gênico (Nm) nas 15 progênies W-06, W-07, W-12, W-16, W-17.1, W-22, W-28, W-26, W-37, W-46, W-38, W-49, W-30, W-10, e W-17.2) de milho doce

<i>Locus</i>	$F_{(IS)}$	$F_{(IT)}$	$F_{(ST)}$	Nm
<i>Umc1071</i>	0,5672	0,8543	0,6632	0,1269
<i>Umc1636</i>	-0,1117	0,6443	0,6801	0,1176
<i>Umc1736</i>	-0,8538	-0,3304	0,2824	0,6354
<i>Umc1506</i>	0,3924	0,8774	0,7982	0,0632
<i>Umc1582</i>	0,1667	0,8244	0,7892	0,0668
<i>Umc1383</i>	0,1085	0,5230	0,4649	0,2878
<i>Umc2080</i>	0,0050	0,9917	0,6600	0,1288
<i>Umc1446</i>	0,0805	0,6867	0,6593	0,1292
<i>Umc1590</i>	-0,0204	0,8802	0,8826	0,0332
<i>Umc1241</i>	1,0000	1,0000	0,6520	0,1334
<i>Umc2343</i>	0,0884	0,7251	0,6984	0,1080
<i>Umc1169</i>	0,2090	0,7048	0,6268	0,1489
<i>Umc2116</i>	-0,2412	0,4621	0,5666	0,1912
Média	0,0436	0,6667	0,6515	0,1337

Os valores estimados para a identidade genética entre as progênies podem ser úteis para direcionar cruzamentos promissores, no sentido de selecionar a característica de interesse, mantendo ou ampliando a diversidade genética em *loci*, que, em princípio, são considerados neutros, como os *loci* SSR. A heterozigosidade alta para os *loci* SSR nas progênies W-28 e W-46, por exemplo, pode ser um aspecto interessante, porque uma heterozigosidade alta em populações de plantas pode prevenir uma resposta uniforme e conferir variação genética adaptativa para escapar de efeitos contrários que comprometem o seu desenvolvimento e manutenção (Allendorf and Luikart, 2007). Evidências de que a domesticação e a seleção artificial para características morfológicas e agrônômicas importantes em milho têm um efeito menor na diversidade genética nos *loci* SSR foram apresentadas por alguns autores (Vigouroux et al., 2005). Assim, é possível que os *loci* SSR possam ser apontados como marcadores moleculares promissores e adequados para acompanhar e direcionar a seleção de características desejáveis em genótipos de milho doce *su1*.

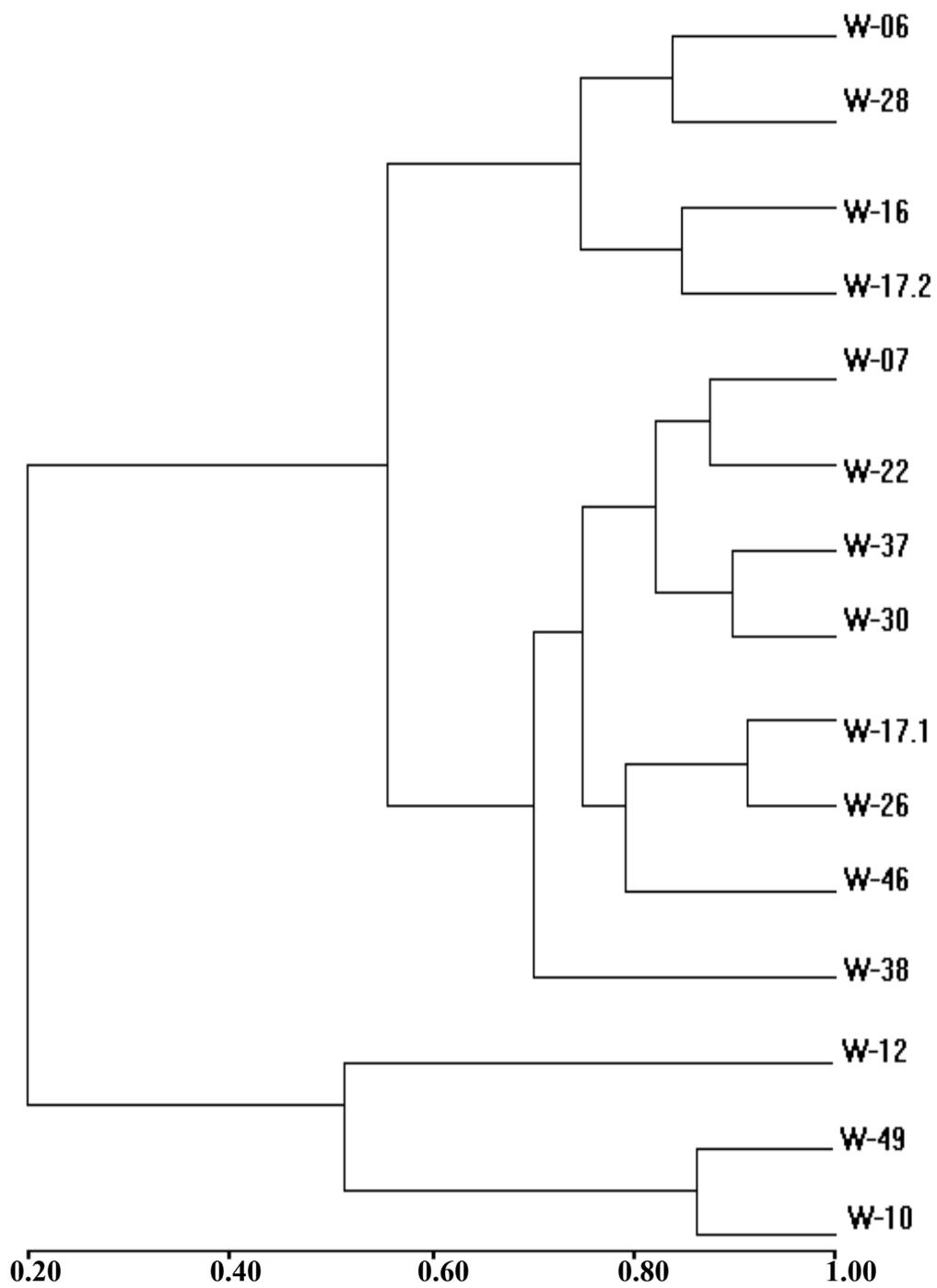


Figura 3 - Agrupamento realizado por meio do método de UPGMA para as 15 progênies de milho doce.

Quadro 9 - Matriz de similaridade construída a partir dos coeficientes de identidade ou distância genética de Nei (1972) das 15 progênies de milho doce

	W-06	W-07	W-12	W-16	W-17.1	W-22	W-28	W-26	W-37	W-46	W-38	W-49	W-30	W-10	W-17.1
W-06	****	0,5496	0,3793	0,8043	0,4911	0,5056	0,8110	0,4551	0,6716	0,7462	0,5467	0,3362	0,7185	0,4279	0,6272
W-07	0,5986	****	0,4752	0,4222	0,7309	0,8399	0,6527	0,7278	0,8197	0,7317	0,6021	0,3446	0,8098	0,3307	0,4132
W-12	0,9695	0,7441	****	0,4357	0,5825	0,6052	0,5116	0,6670	0,3689	0,4661	0,5127	0,6081	0,4567	0,4552	0,5378
W-16	0,2178	0,8622	0,8308	****	0,4067	0,4453	0,7651	0,5242	0,5720	0,5428	0,5864	0,5107	0,6331	0,5174	0,8368
W-17,1	0,7112	0,3135	0,5405	0,8997	****	0,7442	0,6328	0,8716	0,8217	0,7704	0,7173	0,3106	0,6595	0,2800	0,4360
W-22	0,6819	0,1745	0,5022	0,8090	0,2955	****	0,6209	0,7693	0,7955	0,6863	0,6912	0,2389	0,7505	0,3184	0,4626
W-28	0,2095	0,4267	0,6703	0,2678	0,4577	0,4766	****	0,6202	0,6867	0,6230	0,6238	0,4769	0,7907	0,6047	0,7173
W-26	0,7872	0,3178	0,4049	0,6458	0,1374	0,2623	0,4777	****	0,7369	0,7331	0,6739	0,3663	0,6466	0,3549	0,5453
W-37	0,3981	0,1989	0,9972	0,5587	0,1964	0,2288	0,3759	0,3053	****	0,8194	0,7780	0,2085	0,8680	0,2555	0,5273
W-46	0,2927	0,3124	0,7634	0,6111	0,2608	0,3764	0,4733	0,3105	0,1992	****	0,7065	0,3967	0,6404	0,4100	0,5008
W-38	0,6039	0,5073	0,6681	0,5337	0,3322	0,3693	0,4719	0,3947	0,2510	0,3474	****	0,5147	0,7199	0,5857	0,6190
W-49	1,0901	1,0652	0,4973	0,6720	1,1694	1,4316	0,7404	1,0042	1,5679	0,9245	0,6642	****	0,2778	0,8434	0,6329
W-30	0,3306	0,2110	0,7838	0,4571	0,4162	0,2870	0,2349	0,4360	0,1416	0,4457	0,3287	1,2807	****	0,3420	0,5972
W-10	0,8488	1,1065	0,7870	0,6589	1,2728	1,1443	0,5031	1,0360	1,3644	0,8916	0,5349	0,1703	1,0730	****	0,6276
W-17,2	0,4665	0,8837	0,6203	0,1782	0,8302	0,7708	0,3327	0,6065	0,6405	0,6916	0,4796	0,4575	0,5156	0,4659	****

5. CONCLUSÕES

- a) O processo de seleção para a formação de progênies *su1* de milho doce a partir de uma população de híbridos comerciais, tem conduzido à formação de linhagens altamente diferenciadas ($F_{ST} = 0,6515$) para os 13 *loci* SSR polimórficos *umc1071*, *umc1636*, *umc1736*, *umc1506*, *umc1582*, *umc1383*, *umc2080*, *umc1446*, *umc1590*, *umc1241*, *umc2343*, *umc1169*, e *umc2116* analisados, na geração S_4 .
- b) Dentre as plantas das progênies *su1* de milho doce, as plantas da progênie W-38, com maior proporção de *loci* polimórficos, e W-46 com maior nível de heterozigosidade observada, podem ser recomendadas para cruzamentos com plantas que apresentem características agrônômicas desejáveis no sentido de ampliar a base genética.
- c) A geração S_4 das progênies *su1* de milho doce contém uma progênie, a W-06, essencialmente homozigotas (100% dos *loci*) para 13 *loci* microssatélites. Também populações constituídas por progênies com vários *loci* polimórficos, algumas delas (W-07, W-12, W-17.1, W-28, W-26, W-46, W-30, e W-17.2) com alelos que estão segregando, atendem ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e mantêm, assim, um estoque de variação genética que poderá ser explorado para realizar novas combinações desejadas e/ou para permitir o prosseguimento dos ciclos de seleção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJMONE MARSAN, P.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, F.; KUIPER, M.; MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP marker. **Theoretical Applied Genetics**, 96:219-227, 1998.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento das plantas**. São Paulo: Blucher, 1971. 381p.

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

AMORIM, E.P.; ALMEIDA, C.C.D.; SEVERO, M.J.C.M.; NETO, J.F.B. Genetic variability in sweet corn using molecular markers. **Maydica**, 48:177-181, 2003.

ARAGÃO, C.A. **Avaliação de híbridos simples braquíticos de milho super doce (*Zea mays L.*) portadores do gene *shrunk* (*sh2sh2*) utilizando esquema dialélico parcial**. Botucatu: UNESP, 2002. 112p. Tese (Doutorado em Agricultura).

ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; ALVES, E.; CATANEO, A.C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho superdoce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, 25:43-48, 2003.

ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; SOFIATTI, V.; SILVA, R.F. Maturação de sementes de milho doce – grupo superdoce. **Revista Brasileira de Sementes**, 28:69-76, 2006a.

ARAUJO, E.F.; ARAUJO, R.F.; SOFIATTI, V.; SILVA, R.F. Qualidade fisiológica de sementes de milho doce colhidas em diferentes épocas. **Bragantia**, 65:687-692, 2006b.

ARCOT, S.S.; WANG, Z.; WEBER, J.L.; DEINING, P.L.; BATZER M.A. Alu repeats: a source for the genesis of primate *microsatellites*. **Genomics**, 29:136–144, 1995.

BARBIERI, V.H.; LUZ, J.M.Q.; BRITO, C.H.; DUARTE, J.M.; GOMES, L.S.; SANTANA, D.G. Produtividade e rendimento industrial de híbridos de milho doce em função de espaçamento e populações de plantas. **Horticultura Brasileira**, 23:826-830, 2005.

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. 525p.

BOYER, C.D.; SHANNON, J.C. The use of endosperm genes for sweet corn improvement. **Plant Breeding Review**, 1:139-139, 1984.

BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Potafos: Piracicaba, 1993. 301p.

DESTRO, D.; MANTOVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**, Londrina: UEL, 1999. 820p.

DINGES, J.R.; COLLEONI, C.; MYERS, A.M.; JAMES, M.G. Molecular structure of three mutations at the maize *sugary1 locus* and their allele-specific phenotypic effects. **Plant Physiology**. 125:1406–1418, 2001.

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

FIELD, D.; WILLS, C. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of *microsatellites* in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95:1647–1652, 1998.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273p.

GAMA, E.E.G.; GUIMARÃES, P.E.; MAGNAVACA, R.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P. Avaliação das capacidades geral e específica de combinação em sete populações de milho da América Latina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 27:1167-1172, 1992.

GAMA, E.E.G.; MORO, J.R.; MAGNAVACA, R.; VIANA, R.T.; NASPOLINI FILHO, V. Melhoramento do milho. In: **Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural**. Brasília: EMBRATER, 1983. p. 23-38.

GLEASON H.A.; CRONQUIST, A. **Manual of vascular plants of the northeastern United States and adjacent Canada**. New York: Botanical Garden, 1991. 910p.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.

HEDRICK, P.W.; PARKER, K.M.; LEE, R.N. Using *microsatellite* and MHC variation to identify species, *ESUs*, and *MUs* in the endangered Sonoran topminnow. **Molecular Ecology**. 10:1399-1412, 2001.

HEDRICK, P.W. Conservation genetics: where are we now. **Trends in Ecology and Evolution**, 16:629-638, 2001.

HEYWOOD, V.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, 113:321-335, 2003.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ-DE LION, D. **Laborator protocols**: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Mexico: CIMMYT, 1994. 50p.

HUELSEN, W. A. **Sweet corn**. New York: Intercience, 1954. 409p.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin Society Vaud Science Natural**, 44:223-270, 1994.

JAIN, A.; BHATIA, S.; BANGA, S.S.; PRAKASH, S.; LAKSHMIKUMARAN, M. Potential use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study

the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. **Theoretical Applied Genetics**, 88:116-122, 1994.

JAMES, M.G.; ROBERTSON, D.S.; MYERS, A.M., Characterization of the maize gene *sugary 1*, a determinant of starch composition in kernels. **Plant Cell**, 7:417-429, 1995.

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

KUROZAWA, C. **Glossário**. Globo Rural. disponível em <http://globo rural.tev.globo.com/GRural/0,27062,LPTO-4373-0-L-M,00.html>, acesso em: 20/10/2007.

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

LIA, V.V.; BRACCO, M.; GOTTLIEB, A.M.; POGGIO L.; CONFALONIERI, V.A. Complex mutational patterns and size homoplasy at maize microsatellite *loci*. **Theoretical Applied Genetics**, 115:981-991 2007.

MACHADO, J.A. **Melhoramento genético do milho doce (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1980. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; SANCHEZ, J.; BUCKLER, E. A single domestication for maize shown by multilocus *microsatellite* genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93:5131–5135, 2002.

MELCHINGER, A.E.; LEE, M.; LAMKEY, K.R.; HALLAUER, A. R.; WOODMAN, W.L. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimate genetic effects in maize breeding. **Crop Science**, 31:1033-1040, 1990b.

MELCHINGER, A.E.; LEE, M.; LAMKEY, K.R.; HALLAUER, A.R.; WOODMAN, W.L. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel set of maize inbreds. **Theoretical Applied Genetics**, 80:488-496, 1990a.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70:3321-3, 1973.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106:283-292, 1972.

NETTO, D.A.M.; ANDRADE, R.; PADILHA, L.; OLIVEIRA, A. C.; GAMA, E.; TEIXEIRA, F.F. **Maturação fisiológica de milho doce e sua relação com a qualidade das sementes**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154, 3).

OLIVEIRA JR., L.F.G.; DELIZA, R.; BRESSANSMITH, R.; PEREIRA, M.G.; CHIQUIERI, T.B. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26:159-166, 2006.

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

PAIVA, E.; VASCONCELOS, M.J.V.; PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.G.; MAGNAVACA, R. Seleção de progênies de milho doce de alto valor nutritivo com auxílio de técnicas eletroforéticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 27:1213-1218, 1992.

PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.G.; MAGNAVACA, R.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; VILLAS BOAS, G.L. Milho doce. **Informe Agropecuário**, 14:17-22, 1990.

PEDROTTI, A.; HOLANDA, F.S.R.; MANN, E.N.; AGUIAR NETTO, A.O.; BARRETO, M.C.V.; VIEGAS, P.R.A. Parâmetros de produção do milho doce em sistemas de cultivo e sucessão de culturas no Tabuleiro Costeiro

Sergipano. In: **Seminário de Pesquisa**, Sergipe, 2003. Anais... Sergipe: FAP, 2003.

PINTO L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, J.R.; SOUZA, A.P. Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite *loci*. **Genetics and Molecular Biology**, 26:355-364, 2003a.

PINTO, R.; DONZELE, J.L.; FERREIRA, A.S. Exigência de metionina mais cistina para codornas japonesas em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 32:1166-1173, 2003a.

ROHLF F.J.; **NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.5**. New York: Exeter Publications, 1989.

ROMERO-SEVERSON, L.; SMITH, J.S.C.; ZIEGLE, J.; HAUSER, J.; JOE, L.; HOOKSTRA, G. Pedigree analysis and haplotype sharing within diverse groups of *Zea mays* L. inbreds. **Theoretical Applied Genetics**, 103:367-574, 2001.

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

SAWAZAKI, E.; ISHIMURA, I.; ROSSETO, C.J.; MAEDA, J.A.; SAES, L.A. Milho verde: avaliação da resistência à lagarta da espiga, da espessura do pericarpo e outras características agrônômicas. **Bragantia**, 49:241-251, 1990.

SCAPIM, C.A.; CRUZ, C.D.; ARAÚJO, J.M. Cruzamentos dialélicos entre sete cultivares de milho doce. **Horticultura Brasileira**, 13:19-21, 1995.

SOUZA, I.R.P., MAIA, A.H.N.; ANDRADE, C.L.T. **Introdução e avaliação de milho doce na região do baixo Parnaíba**. Teresina: Embrapa-Cnpa, 1990. 7p.

STORK, L, LOVATO, C. Milho doce. **Ciência Rural**, 21:283-192, 1991.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Desestabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, 365: 274-276, 1993.

SYNGENTA SEEDS. **Comunicação Interna**. São Paulo, 2008.

TEIXEIRA, F.F.; SOUSA, I.R.P.; GAMA, E.E.G.; PACHECO, C.A.P.; PARENTONI, S.N.; SANTOS, M.X.; MEIRELLES, W.F. Avaliação da capacidade de combinação entre linhagens de milho doce. **Ciência e Agrotecnologia**, 25:483-488, 2001.

THORMANN, C.E.; FERREIRA, M.E.; CAMARGO, L.E.A.; TIVANG, J.G.; OSBORN, T.C. Comparison of *RFLP* and *RAPD* markers to estimate genetic relationships within and among cruciferous species. **Theoretical Applied Genetics**, 88:973-980, 1994.

TOSELLO, G.A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: Paterniani, E.; Viégas G.P. (eds). **Melhoramento e produção do milho**. Fundação Cargil: Campinas. p. 375-409, 1987.

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

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J.S.; MATSUOKA, Y.; SMITH, O.S.; BEAVIS, W.D. Rate and pattern of mutation at microsatellite *loci* in maize. **Molecular Biology and Evolution**, 19:1251–1260, 2002a.

VIGOUROUX, Y.; MATSUOKA Y.; DOEBLEY, J.; Directional evolution for *microsatellite* size in maize. **Molecular Biology and Evolution**, 20:1480–1483, 2003.

VIGOUROUX, Y.; MCMULLEN, M.; HITTINGER, C.T.; HOUCHINS, K.; SCHULZ, L. Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99:9650–9655, 2002b.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers. **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218, 1990.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Research**, 19:5275-5279, 1991.

WHITT, S.; WILSON, L.M.; TENAILLON, M.; GAUT, B.S.; BUCKER, E. Genetic diversity and selection in the maize starch pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:959–962, 2002.

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of *microsatellites* in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, 18:384-3 2001.

WILLIAM, J.K.F.; KUBELILK, A .R.; LIVAK, K.G.; RAFALKI, J.A.; TINGEY, S.V. Dna polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

WILSON-JUNIOR, D.; TRAWATHA, S.E. Physiological maturity and vigor in production of Florida Staysweet *shrunk sweet corn*. **Crop Science**, 31:1640-1647, 1991.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago, 1978. 580p

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE version 1.31**: Microsoft Window – based free ware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

YOUSEF, G.G.; JUVIK, J.A. Comparison of phenotypic and marker-assisted selection for quantitative traits in *sweet corn*. **Crop Science**, 41:645-655, 2001.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOSKY R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, 2:512-514, 2002.