

JULIANA FRANZONI DOS SANTOS

**HETEROZIGOSIDADE EM CICLOS DE SELEÇÃO DO COMPOSTO
CMS-43 DE MILHO PIPOCA (*Zea mays* L.) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITE**

**MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO - 2008**

JULIANA FRANZONI DOS SANTOS

**HETEROZIGOSIDADE EM CICLOS DE SELEÇÃO DO COMPOSTO
CMS-43 DE MILHO PIPOCA (*Zea mays* L.) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITE**

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
DEZEMBRO – 2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S237h Santos, Juliana Franzoni dos
Heterozigosidade em ciclos de seleção do composto CMS-43 de milho pipoca (*Zea mays* L.) utilizando marcadores microssatélites. / Juliana Franzoni dos Santos. -- Maringá, 2008.
viii, 47 f. : il. color., figs., quadros.

Orientadora : Prof.^a Dr.^a Claudete Aparecida Mangolin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2008.

1. Milho pipoca (*Zea mays* L.) - Microssatélites.
2. Milho pipoca (*Zea mays* L.) - Variabilidade genética. 3. Milho pipoca (*Zea mays* L.) - Ciclos de seleção. 4. Milho pipoca (*Zea mays* L.) - Capacidade de expansão. I. Mangolin, Claudete Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 635.6777

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte.
(A autora)

A Deus, criador; à minha irmã Rafaela Franzoni dos Santos (in memorian)
e a minha mãe, Neuza Franzoni, com amor e carinho, dedico.

“Ainda que a figueira não floresça e nem haja fruto na videira
ainda que o produto da oliveira minta e os campos não produzam mantimento
ainda que as ovelhas fujam do aprisco e nos currais não haja mais gado
todavia eu me alegro no Senhor e exulto no Deus da minha salvação.
Pois o senhor meu Deus é minha fortaleza, e faz meus pés como os da corça
e faz –me andar altaneiramente. Por isso nEle sempre hei de confiar”
(Hc 3:17-19).

AGRADECIMENTOS

A Deus, digno de toda honra e toda glória!

À Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) e respectivos docentes.

À Coordenação de Apoio ao Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao secretário do PGM Francisco José da Cruz, pela competência e dedicação em seu trabalho e pela paciência irrestrita a mim dedicada.

A minha orientadora professora doutora Claudete Aparecida Mangolin e a minha co-orientadora professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela experiência e exemplos passados, pelos momentos a mim dedicados, pela presença constante e disponibilidade irrestrita, por serem pessoas ímpares, sejam como pesquisadoras, orientadoras, professoras, mulheres e amigas. Obrigada simplesmente porque vocês existem.

A minha mãe, Neuza Franzoni, pela presença constante, pelo modelo de mulher que é, ao meu pai, Walmirá Ribeiro dos Santos pelo carinho e aos meus parentes que estiveram presentes nesta caminhada.

À memória de minha irmã, Rafaela Franzoni dos Santos, por todos os momentos que compartilhamos juntas, pela amiga, irmã e companheira que sempre foi, pelo exemplo até o último minuto de vida, pela certeza de que está bem e que um dia iremos nos reencontrar no céu, por fazer valer a pena. Saudades e amor eternos.

Ao meu amado, Alessandro Otto Schneider, pela ajuda na execução dos experimentos, pelo ombro amigo nas horas difíceis, por compartilhar as conquistas; enfim, por ser benção de Deus em minha vida.

Aos professores doutores do Laboratório de Genética Animal e do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais, Ana Silvia Lapenta, Erasmo Renesto, José Ricardo P. Falco, Maria Claudia Takasusuki e Sandra Collet

pelo carinho e amizade. Também aos técnicos Leila Frota e Sérgio Luiz, pela ajuda nas rotinas do laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais e do Laboratório de Genética Animal (Lab. 17 e 21), por fazerem parte desta caminhada. Também ao Maycon Beviláqua, pela ajuda na execução deste trabalho; ao Alex e à Tânia Jorge, preciosos revisores.

Ao Ministério Infantil, de Artes, de Discipulado, de Adolescentes e de Louvor da Comunidade Evangélica de Maringá, pela presença constante e pelos momentos compartilhados.

À Greta Dettke, Adelina Kühl, Camila Ramos, Ana Paula, Josué Endo Junior, Nádia Galvão e respectivas famílias, pela amizade, alegria e força mesmo nos momentos mais difíceis.

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

BIOGRAFIA

SANTOS, Juliana Franzoni, filha de Walmirá Ribeiro dos Santos e Neuza Franzoni, nasceu em Maringá-PR, aos sete dias do mês de janeiro de 1985.

Concluiu o Ensino Fundamental e o Ensino Médio no Colégio Marista de Maringá, no ano de 2002.

Em 2006, diplomou-se em Ciências Biológicas, habilitação em Licenciatura e Bacharelado, pela Universidade Estadual de Maringá. Durante a graduação concluiu três projetos de iniciação científica (PIBIC), estagiou por dois anos no Parque do Ingá (Maringá-PR), realizando neste parque sua monografia e em 2006 ministrou aulas de Biologia e Química em um cursinho para pessoas carentes como parte do Projeto de Extensão da Universidade – Cursinho na Paróquia da Vila Esperança.

Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento pela Universidade Estadual de Maringá. Atualmente é professora do Ensino Fundamental, atuando neste município.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Importância do milho pipoca	4
2.2. Melhoramento de milho pipoca	5
2.3. Ciclos de Seleção em milho pipoca	7
2.4. Composto CMS-43	9
2.5. Marcadores moleculares	11
2.6. Microssátelites	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Descrição do composto CMS-43	18
3.2. Germinação das sementes.....	18
3.3. Extração de DNA das plantas de milho pipoca	18
3.4. Quantificação do DNA	19
3.5. Amplificação do DNA.....	20
3.6. Análise dos dados	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS	38

RESUMO

SANTOS, Juliana Franzoni dos, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2008. **Heterozigosidade em ciclos de seleção no composto CMS-43 de milho pipoca (*Zea mays* L.) utilizando marcadores microssatélites.** Orientadora: Claudete Aparecida Mangolin. Conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A variedade BRS Angela foi desenvolvida a partir do composto CMS-43 após sete ciclos de seleção recorrente intrapopulacional, a partir de quatro ciclos de recombinação de 33 materiais de grãos brancos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Este composto foi produzido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Milho e Sorgo (Centro Nacional de Pesquisas em Milho e Sorgo - CNPMS) de Sete Lagoas, Minas Gerais. Para o presente estudo foram avaliados os oito ciclos de seleção realizados para o composto CMS-43 e denominados de ciclos C_0 , C_I , C_{II} , C_{III} , C_{IV} , C_V , C_{VI} e C_{VII} . Para a avaliação genética foi extraído o DNA genômico das folhas das plantas de cada um dos ciclos de seleção. Para a avaliação da variabilidade e distância genética foi utilizado o marcador microssatélite; para a escolha dos marcadores polimórficos entre as linhagens avaliadas, foram testados 100 microssatélites já mapeados para milho comum. Destes marcadores foram selecionados 20 pares de *primers*. Com estes *primers* foram produzidos 52 alelos com um número médio de alelos por *locus* polimórfico igual a 2,6. Para o ciclo C_{VII} foi observada a perda de 5 alelos (46 alelos), caracterizando uma redução de 9,80% para os alelos em relação ao ciclo C_0 (51 alelos). A heterozigosidade observada entre os ciclos de seleção variou de 20,67% para o ciclo C_{VII} a 34,29% para o ciclo C_{III} . Dos 20 *loci*, dois (*Umc2261* e *Umc1318*) apresentaram valores negativos de Fis os valores para os dois *loci* foram de -0,0868 e -0,2745 respectivamente, indicando um excesso de heterozigotos mesmo frente aos processos de seleção recorrente. Para os 20 *loci* de microssatélites avaliados neste trabalho, nove deles apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg no último ciclo de seleção (C_{VII}). Este resultado indica que apesar da grande pressão de seleção exercida para as características desejáveis estes *loci* continuam comportando-se como se os cruzamentos estivessem ocorrendo casualmente. Tal fato chama atenção, pois este resultado indica possibilidade de ocorrer ganho de seleção efetuado em novos ciclos de seleção recorrente para a variedade BRS Angela.

Palavras-chave: Microssatélites, Ciclos de Seleção Recorrente, Milho Pipoca.

ABSTRACT

Santos, Juliana Franzoni dos, M.Sc. State University of Maringá, December, 2008. **Cycle of Selection heterozygosity at popcorn compound CMS-43 (*Zea mays* L.) using microsatellite markers.** Adviser Professor: Claudete Aparecida Mangolin. Committee members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

The BRS Angela variety was developed from the compound CMS-43 after seven intrapopulational recurrent selection cycles, from four recombination cycles from 33 materials of white grains from the Active Germoplasm Bank (BAG). This compound was produced by the Brazilian Embrapa of Agropecuary Research (EMBRAPA) Maize and Sorghum (National Center of Maize and Sorghum Research - CNPMS) of Sete Lagoas, Minas Gerais. To the present study eight selection cycles was assessed to the compound CMS-43 and named C₀, C_I, C_{II}, C_{III}, C_{IV}, C_V, C_{VI} and C_{VIB}. To the genetic evaluation the genomic DNA was extracted from the leaves of the plants in each of the selection cycles. For the assessment of variability and genetic distance the microsatellite marker was used; for the choice of the polymorphic markers between the evaluated lines, 100 microsatellites that have been mapped to common maize were tested. From those markers 20 pairs of primers were selected. With these primers 52 alleles were produced with an average number of alleles per polymorphic *locus* equal to 2.6. At C_{VIB} cycle it was noticed the loss of 5 alleles (46 alleles), featuring a reduction of 9.80% to the alleles in relation to the C₀ cycle (51 alleles). The observed heterozygosity between cycle selections ranged from 20.67% at C_{VIB} cycle to 34.29% at C_{III} cycle. Of the 20 *loci*, two (*Umc2261* e *Umc1318*) had negatives values to Fis index, and the values for the two *loci* were -0.0868, -0.2745 respectively indicating an excess of heterozygotes even in the face of the recurrent selection process. For the 20 microsatellite *loci* evaluated in this study, nine of them presented Hardy-Weinberg equilibrium at the last selection cycle (C_{VIB}). This result indicates that, despite the great selection pressure exerted to the desirable characteristics, these *loci* still is behaving as if the crosses were occurring randomly. This result indicates that it is still possible to occur to selection gains made in new recurrent selection cycles to the BRS Angela variety.

Key-words: Microsatellite, Recurrent Selection Cycle, Popcorn.

1. INTRODUÇÃO

O milho pipoca é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, da tribo Maydeae, do gênero *Zea* e da espécie *Zea mays* (*Zea mays* L., $2n=20$), assim como o milho comum. De acordo com Kerr (1969), o milho pipoca e o milho comum têm o mesmo número de cromossomos ($x = 10$) e se cruzam dando produtos férteis. Esse tipo de milho tem despertado a atenção dos melhoristas, visando o desenvolvimento de variedades melhoradas, que atendam à demanda e às exigências em qualidade, por parte do mercado consumidor (Zinsly e Machado, 1987). Conforme Alexander e Creech (1977), as principais características das plantas e dos grãos que merecem atenção para o melhoramento genético são a alta produtividade, o baixo acamamento e quebramento das plantas, a alta resistência a doenças e às pragas, a alta capacidade de expansão e boas características organolépticas como maciez, sabor e aroma da pipoca.

Um dos objetivos dos programas de melhoramento genético do milho pipoca tem sido a exploração do vigor do híbrido. Para isso, inicialmente há a necessidade de obtenção de linhagens homozigóticas, e para a obtenção destas linhagens é realizada a autofecundação artificial. Uma das conseqüências deste procedimento é a depressão por endogamia. Desta forma, o valor de uma população como fonte de linhagem é dependente da depressão por endogamia para várias características, principalmente para rendimento de grãos, dificultando assim a obtenção de linhagens vigorosas para a posterior obtenção de híbridos (Lima et al., 1984).

Outra metodologia importante empregada para o melhoramento de milho é a seleção recorrente; sendo este um processo cíclico de seleção que visa aumentar de forma progressiva e contínua a freqüência dos alelos favoráveis e, simultaneamente, manter a variabilidade genética em níveis adequados para os próximos ciclos seletivos (Destro e Montalván, 1999). As seleções são repetidas até que a freqüência de alelos favoráveis na população atinja níveis satisfatórios. A seleção recorrente pode ser conduzida visando o melhoramento das populações *per se* (intrapopulacional) ou da geração F1 (híbrido interpopulacional), resultante do

cruzamento entre duas populações (seleção recorrente recíproca ou interpopulacional) (Destro e Montalván, 1999). O emprego da seleção recorrente, especialmente na cultura do milho, tem sido expressivo ao longo dos anos.

Desde a década de 90, alguns autores consideraram que seria muito importante, o desenvolvimento de um método simples, eficiente, com baixo custo e viável tecnicamente para predizer a heterose, e inclusive se esta heterose está ou não sendo mantida ao longo dos ciclos de seleção, antes que os testes de campo sejam realizados. Esta predição permitiria o investimento em cruzamentos promissores *a posteriori*, reduzindo os trabalhos de polinização e o tamanho dos experimentos de campo (Xiao et al., 1996). Assim, os marcadores moleculares têm sido propostos como ferramentas para auxiliar os métodos de melhoramento, uma vez que estes podem fornecer medidas confiáveis da diversidade genética, que pode ser utilizada para determinação do grau de parentesco entre linhagens e variedades (Borém e Miranda, 2005). Dentre os vários marcadores moleculares estabelecidos, Hedrich (2001) ressalta que a descoberta de *loci* altamente variáveis como os *loci SSR* (*Simple Sequence Repeat*), também conhecidos como microssatélites, é bastante promissora para determinar as diferenças entre grupos de espécies.

Os microssatélites consistem de um número variável de unidades de repetições em *tandem* (cada repetição com 1 a 6 pares de bases) e representam uma classe de DNA repetitivo que é comumente encontrada em genomas de organismos eucariotos (Tautz e Renz, 1984). Eles são caracterizados por grande abundância (Condit e Hubbell, 1991; Röder et al., 1995), alta variabilidade (Schug et al., 1998), e ampla distribuição ao longo de genomas de muitas espécies (Liu et al., 1998; Taramino e Tingey, 1996; Röder et al., 1995). Os microssatélites são tipicamente *locus* multi alélicos e que apresentam mais que cinco alelos, sendo comumente observados em plantas (Senior et al., 1996) e animais (MacHugh et al., 1997). Além disso, técnicas automatizadas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm sido desenvolvidas para os microssatélites, e isto possibilita a obtenção de grande quantidade de dados, e boa resolução analítica e com baixo custo (Mitchell et al., 1997). Em razão destas características, os *loci*, microssatélites têm sido os

marcadores genéticos preferidos para estudos de diversidade genética em plantas e animais.

Os microssatélites têm sido usados como ferramenta para medir a diversidade e a distância genética em estudos evolutivos (Goldstein, 1995); isto é possível graças à alta diversidade alélica, ocorrida em função da alta taxa de mutação devido às derrapagens no processo de replicação do DNA presente nas repetições (Levinson e Gutman, 1987). Estudos realizados utilizando microssatélites em milho têm mostrado que estes marcadores são abundantes e altamente variáveis (Senior e Heun, 1993; Chin et al., 1996; Taramino e Tingey, 1996), sendo poderosa ferramenta para mapeamento, genotipagem de indivíduos, e avaliação de germoplasma (Smith et al., 1994; Senior et al., 1996). Alguns microssatélites de milho são aplicáveis para teosinte (Lübberstedt et al., 1998).

Assim, a proposta do presente estudo foi utilizar os *primers* de *loci SSR* previamente isolados de milho comum, para selecionar os mais adequados e amplificar seqüências de microssatélites no DNA de populações de milho pipoca (*Zea mays* L.). Esses *primers* permitem avaliar as mudanças na variabilidade genética nos sete ciclos de seleção recorrente na população CMS-43, realizados para a obtenção da variedade de milho pipoca BRS Angela (Pacheco et al., 1998). A análise dos *loci SSR* para os sete ciclos de seleção recorrente ($C_0 - C_{VIB}$) na população CMS-43 é importante, pois permite monitorar a heterozigosidade média e a estrutura genética das populações formadas no decorrer dos ciclos, verificando se a variabilidade genética das populações de cada ciclo está sendo preservada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do milho pipoca

Segundo Zinsly e Machado (1987), as plantas de milho pipoca diferem em alguns aspectos do milho comum, constituindo uma planta mais sensível; elas apresentam colmos mais finos e fracos, sendo mais suscetíveis ao acamamento; maior suscetibilidade à doenças e menor produtividade. Isto se deve ao fato de, em milho pipoca, os caracteres agrônômicos serem considerados menos importantes que os caracteres de qualidade da pipoca, e por isso, o milho pipoca sofre menor pressão de seleção.

De acordo com os mesmos autores, as plantas de milho pipoca resultam de supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas; estas são plantas anuais, eretas podem medir de um a quatro metros de altura, com um sistema radicular geralmente superficial que consiste de raízes primárias e laterais com extensão de um a três metros de comprimento. Os colmos são cilíndricos, compactos e mais finos que os do milho comum e terminam em um pendão, as folhas estão dispostas aleatoriamente ao colmo e em menor número quando comparadas ao milho comum, e originam mais espigas por planta. A característica monóica ocorre devido à evolução pelo aborto dos órgãos pistilados da inflorescência (pendão) e dos órgãos estaminados (espiga), e os grãos que são a parte da planta usada para estimar o valor comercial desta são pequenos e duros. Estes grãos apresentam a capacidade de estourar quando aquecidos em torno de 180°C; neste evento o óleo e a umidade exercem pressão sobre o pericarpo, até que ele se rompa, formando pipoca e diferenciando-se, deste modo, do milho comum (Sawazaki et al, 2001). Os grãos também podem apresentar variações quanto ao formato (redondo, chato, pontiagudo) e a coloração (rosa, creme, vermelha, roxa, preta, azul, etc.), sendo as cores, branca e amarela, as mais comuns (Zinsly e Machado, 1987).

Historicamente, o milho é uma das poucas plantas de interesse econômico que possui origem americana. De fato, o que se sabe é que o milho pipoca teve importante papel no desenvolvimento pré-histórico do milho no continente, pois

segundo relatos de Zinsly e Machado (1987) a evolução teria ocorrido no sentido do milho pipoca para os demais tipos de milho, sendo sua participação essencial para o desenvolvimento desta espécie (Pereira, 2004).

No Brasil, o milho pipoca é um alimento bastante apreciado, seu consumo vem aumentando a cada ano, mas seu plantio comercial é bastante modesto. Em 1998 foram importadas aproximadamente 61 mil toneladas de grãos dos Estados Unidos e da Argentina, e a produção nacional foi em torno de 20 mil toneladas. A grande importação deve-se, sobretudo à baixa qualidade da pipoca disponível no mercado brasileiro devido a limitação de cultivares de alta qualidade e tecnologia de produção adequada (Scapim et al, 2002). Desta forma pode-se dizer que o produto nacional apresenta qualidade inferior ao importado, dificultando o desenvolvimento do seu comércio e o interesse produtivo no Brasil. De acordo com Galvão et al. (2000) ainda há escassez de informações sobre a área semeada, produtividade, e quantidade importada.

Na safra de 2004/05, houve uma inversão no panorama nacional e isto ocorreu em razão da entrada do híbrido simples modificado IAC-112. Neste período a importação foi de 20 mil toneladas, assim o país começou a diminuir a dependência de sementes importadas (Scapim et al., 2006). Nesse contexto, alguns autores (Scapim et al., 2006) têm ressaltado a necessidade de que novos programas de melhoramento sejam iniciados, tanto por empresas públicas como privadas. Por outro lado, para alcançar sucesso nestes investimentos, os referidos autores destacam que será necessária introdução de populações com alta variabilidade genética.

2.2. Melhoramento de milho pipoca

A qualidade do milho pipoca no Brasil tem sido considerada por alguns autores (Pacheco et al., 1996) como baixa, em relação à qualidade dos milhos selecionados na América do Norte e em outros países da América do Sul; o cultivo comercial do milho pipoca ainda é limitado no Brasil e poucas empresas trabalham com este tipo de milho. Entre as instituições públicas que desenvolvem novas cultivares, o IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) tem no mercado os híbridos

IAC 112 e IAC 125, e a EMBRAPA Milho e Sorgo (Centro Nacional de Pesquisas em Milho e Sorgo - CNPMS), possui uma única variedade: a BRS Angela, lançada em 2000 e que apresenta alta produtividade de grãos, estabilidade de produção e bom índice de capacidade de expansão (Rocha, 2007). O melhoramento de milho pipoca no Brasil é uma atividade relativamente recente; esta atividade está registrada como tendo sido iniciada na década de 90. Entre as principais características de plantas e grãos que são alvos de melhoramento genético estão a alta produtividade, o baixo acamamento e quebramento das plantas, a alta resistência às doenças e pragas, a alta capacidade de expansão, e as características desejáveis ao consumidor, tais como maciez, sabor, aroma e coloração da flor da pipoca (Alexander e Creech, 1977). As populações de milho com potencial para serem utilizadas como genitoras em programas de melhoramento intrapopulacionais devem possuir altas médias e ampla variabilidade genética para as características de interesse (Hallauer e Miranda Filho, 1988). No melhoramento de milho pipoca, diferentes germoplasmas têm sido utilizados a fim de aumentar o valor das características de interesse comercial.

Em 1992, no mercado de sementes de milho pipoca foram lançados híbridos intervarietais. Dos 15 tratamentos incluídos no Ensaio Nacional de milho pipoca (92/93), por exemplo, 10 foram cultivares e 5 foram híbridos intervarietais experimentais. O melhoramento genético de milho pipoca tem sido considerado uma atividade difícil porque o produto do melhoramento deve ser simultaneamente adequado para os produtores (maior produção de grãos, plantas eretas, com boas características agronômicas, e resistentes a pragas), e para os consumidores (maior capacidade de expansão dos grãos proporcionando pipocas grandes e macias). O valor comercial do milho pipoca é maior que o do milho comum, o que justifica, inclusive, a aplicação de recursos do governo Federal nos programas de melhoramento vegetal (Sawazaki, 2001). Dessa forma, segundo Sawazaki (2001), os programas de melhoramento que desenvolvem variedades e híbridos devem ser incentivados.

Estudos realizados em germoplasma tropical de milho pipoca indicaram que a capacidade de expansão é uma característica poligênica, com as estimativas de

herdabilidade variando de 70% a 90% (Lira, 1983; Linares, 1987; Andrade, 1995; Pacheco et al., 1998; Pereira e Amaral Júnior, 2001). Sawazaki et al. (2001) e Galvão et al. (2000) obtiveram bons resultados de produtividade e capacidade de expansão em São Paulo e Minas Gerais. Nesses ensaios, a capacidade de expansão média variou de 32 a 36 mL.g⁻¹ e o rendimento de grãos ficou acima de 4.000kg.ha⁻¹. Os resultados foram obtidos na avaliação de híbridos de linhagens Guarani e IAC-64, obtidos no Instituto Agrônomo de Campinas, SP (IAC). Os materiais apresentaram boa adaptação à região e seus resultados se aproximam aos obtidos com os melhores híbridos norte-americanos. Apesar dos avanços já alcançados no melhoramento de milho pipoca, o número reduzido de cultivares tem sido limitante para expansão da cultura no Brasil, uma vez que as empresas empacotadoras não trabalham com o milho pipoca nacional devido a pouca oferta no mercado, decorrente, por sua vez, da falta de sementes.

2.3. Ciclos de seleção em milho pipoca

Segundo Destro e Montalván (1999), a seleção recorrente foi proposta na década de 1940 para plantas alógamas. O emprego desta técnica, especialmente na cultura do milho, tem sido expressivo ao longo do tempo. Várias estratégias têm sido utilizadas pelos pesquisadores em cada uma das três etapas básicas do programa de seleção recorrente (obtenção da população base, avaliação de famílias, e recombinação das famílias selecionadas para formar o ciclo seguinte). A expectativa com a seleção recorrente é a contínua melhoria na expressão do caráter sob seleção, sem com isto reduzir a variabilidade genética para se continuar obtendo ganhos futuros. O composto de milho pipoca CMS-43, por exemplo, foi produzido pela EMBRAPA Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). As progênies obtidas a partir deste composto têm sido selecionadas e avaliadas desde 1990, tanto para o aumento da produção de grãos como para o aumento do volume de expansão dos grãos, e para isso tem sido usado o método de seleção recorrente com cruzamentos entre e dentro das famílias CMS-43 (Pacheco et al., 1998), determinando assim, vários ciclos de seleção.

Em famílias S1, a principal limitação do melhoramento intrapopulacional é a redução significativa da variabilidade genética depois de poucos ciclos de seleção, particularmente quando um baixo número de progênies (por exemplo, dez progênies) é recombinado para gerar o próximo ciclo de seleção (Hallauer e Sears, 1973; Benson e Hallauer, 1994). Uma medida simples da variação genética em uma população é a quantidade de heterozigosidade observada; muitas vezes descrita para um só *locus* ou como uma média de vários *loci*. A frequência de heterozigosidade em um *locus* na população refere-se à frequência de heterozigosidade na população amostrada (Weir, 1996).

A pressuposição básica requerida nesse tipo de avaliação é de que todos os genótipos precisam ser selecionados de forma equitativa. No entanto, isso nem sempre é feito. Stuber e Moll (1972), Stuber et al. (1992), Kahler (1985) e Pollak et al. (1984) encontraram associações significativas entre frequências alélicas para isozimas e características agronômicas em programas de melhoramento envolvendo seleção. Essas associações nem sempre são consistentes quando são avaliados diferentes germoplasmas (Pollak et al., 1984). As alterações nas frequências alélicas devido à seleção poderiam causar um viés nas suas estimativas, bem como, uma redução de polimorfismo de alelos neutros e na heterozigosidade esperada (Stephan e Langley, 1992).

No decorrer dos vários ciclos de seleção, os melhoristas selecionam para o aumento da expressão das características desejadas (obtendo os ganhos de seleção) estabelecendo retro-cruzamentos (autofecundações) ou cruzamentos entre plantas irmãs ou meio-irmãs. Tais cruzamentos entre plantas irmãs ou meio-irmãs, que caracteriza o método de seleção recorrente, têm sido usados em populações de milho pipoca para evitar a depressão por endogamia (Lima et al., 1984), porque evita drástica alteração da variabilidade genética das novas populações formadas. A manutenção da variabilidade genética, que pode ser mensurada pela estimativa da proporção de heterozigotos nas populações, é um fator importante para garantir o progresso das seleções das características de interesse no melhoramento (Pinto, 2003), portanto, esta deve ser investigada e monitorada, bem como os ciclos de seleção devem ser acompanhados.

2.4. Composto CMS-43

A variedade BRS Angela é o resultado de seis ciclos de seleção recorrente intrapopulacional no composto de milho pipoca CMS 43, 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 (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo, selecionados para tolerância a *Helminthosporium tursicum* e *Puccinia* spp, em 1979. Em 1982, no terceiro ciclo de recombinação, o composto foi dividido em dois grupos: um de grãos brancos pontudos (tipo alho) e o outro de grãos brancos redondos (tipo americano). Em 1984, foram obtidas progênes S1 dentro do composto de grãos redondos. Essas progênes foram avaliadas fenotipicamente em 1985 e as mais vigorosas foram recombinadas duas vezes. O melhoramento da versão de grãos pontudos foi paralisado. Em 1988, para melhorar a qualidade da pipoca, a CMS 43 foi cruzada com a população Ângelo (BRA 065901). No inverno de 1989, na primeira recombinação da geração F1 do cruzamento CMS 43 x Ângelo, foram obtidas 300 progênes de meios-irmãos (PMI), que foram avaliadas na safra 1989/90. As 56 PMI selecionadas com base no peso das espigas foram recombinadas em agosto de 1991, pelo método Irlandês modificado, com a obtenção simultânea de 196 novas PMI, completando-se o primeiro ciclo de seleção entre e dentro de PMI, que foi denominado de ciclo 0. As 196 PMI, avaliadas em Sete Lagoas, na safra 1991/92, foram as primeiras progênes em que se determinou a capacidade de expansão. A grande capacidade produtiva da CMS 43 permitiu que a seleção das dez melhores PMI fosse feita praticamente com base no índice de capacidade de expansão (ICE), seleção truncada, de modo que, das PMI em ordem decrescente de seu ICE, foram descartadas as progênes com médias muito elevadas de acamamento, quebramento e de espigas doentes (Pacheco *et al.*, 1998). Fez-se uma mistura de 80 sementes remanescentes de cada uma das dez PMI, para plantio de um campo de polinização, onde foram obtidas 196 progênes de irmãos-completos (PIC), com forte seleção para tolerância a helmintosporiose, completando-se o ciclo I de seleção. A seleção entre PIC foi feita em Sete Lagoas, MG, no verão de 1992/93, e as progênes selecionadas foram recombinadas em 1993, em Janaúba, MG, quando foram obtidas

novas PMI, que foram avaliadas e recombinadas no verão de 1993 e no inverno de 1994, respectivamente. Com uma mistura das espigas colhidas nas fileiras femininas desse lote isolado, foi semeado um campo de 3 ha, para multiplicação na safra de 1996/ 1997, visando o lançamento, mas, na avaliação do campo, optou-se por fazer uma seleção fenotípica (323 indivíduos) com base em características de planta e espiga. Depois do teste de expansão, foram selecionadas 40 espigas, completando-se o ciclo IV de seleção. Da recombinação dessas espigas, foram obtidas 169 novas PMI, ciclo V, que foram avaliadas na safra 1997/ 1998. Para reduzir a frequência de grãos amarelados e limão, foram autofecundadas cinco plantas dentro de cada PMI, na segunda repetição do ensaio de avaliação. A análise estatística foi feita com base nas características anotadas nas PMI, mas, na recombinação, foram usados os grãos mais brancos selecionados da melhor espiga S1 no lugar das sementes remanescentes das 14 melhores PMI. Foi estabelecido um sistema de pedigree, relacionando as progênies S1 (PS1) com as novas 169 PMI obtidas, após dois ciclos de recombinação, pelo método irlandês modificado, como sugerido por Pacheco et al. (1997). As espigas das 169 PMI foram avaliadas para ICE e selecionadas as 67 melhores, das quais uma amostra balanceada foi semeada em lote isolado, para obtenção de novas 121 PIC e de 10 kg de semente genética do ciclo VI de seleção, que foi multiplicado no inverno de 2000, em Janaúba. Um sumário do processo seletivo a que foi submetida a CMS 43, relacionando os métodos de seleção empregados e a evolução da qualidade e produtividade, pode ser visto no Quadro 1. O sexto ciclo de seleção recebeu o nome comercial de BRS Angela, que foi lançada comercialmente em vinte de outubro de 2000. Embora os resultados da Tabela 1 mostrem que foram conseguidos ganhos na capacidade de expansão sem afetar a produtividade e que todos os cuidados tenham sido tomados para que a variedade fosse também melhorada para outras características agrônomicas importantes, como altura de planta e espiga, porcentagem de plantas acamadas e quebradas e porcentagem de espigas doentes, os ciclos ainda não foram avaliados nas mesmas condições ambientais, para estimar os ganhos realizados com a seleção. É comum verificar, por esse tipo de ensaio, que os ganhos realizados não só podem ser muito menores que os ganhos esperados com a seleção (Arriel et al,

1993), como podem ser negativos em um ciclo ou outro. Como cada ciclo de seleção é obtido em uma condição ambiental, uma das explicações para essa oscilação é a seleção de diferentes grupos gênicos, chegando-se, mesmo, conforme a variação ambiental, a se selecionar contra o grupo de genes cuja frequência havia sido elevada no ciclo anterior (Gardner, 1961). Com isso, a substituição da versão comercial por um novo ciclo de seleção tem importância especial, porque a nova população pode ser pior que a que está sendo substituída. Uma das maneiras de se evitar isso é avaliar os dois ciclos em ensaios de competição e só fazer a substituição se o ciclo novo for melhor que o anterior na maioria das características importantes.

Quadro 1 - Resumo dos resultados obtidos com o processo seletivo da população de milho pipoca CMS- 43 (Adaptado de Pacheco et al, 2005)

Ciclo	Safrá	Método	Nº de progênies Entre/Dentro	ICE ml ml ⁻¹		Massa de espigas (kg.ha ⁻¹)	
				Geral	Selec.	Geral	Selec.
0	1990/91	SED PMI	300/56			2593	4246
I	1991/92	SED PMI	196/10	16,85	22,21	3591	3821
II	1992/93	SE PIC	196	18,68	21,90	4924	5580
	1993	SD PIC	20	20,81	25,27	-	-
III	1993/94	SED PMI	100/16	22,47	24,16	4969	5381
IV	1996/97	Massal	323/40	23,65	30,26	5048 ²	4925 ²
V	1997/98	Entre PMI	169	21,98	24,99	4958	50,54
	1998/99	Dentro PMI ¹	14	26,14	29,67	-	-
	1999	2ª rec. PMI ¹	169/67			-	-
VI	2000	SEPIC	121	-	-	-	-

SED: seleção entre e dentro; SE: seleção entre; SD: seleção dentro; PMI: progênies de meio-irmãos; PIC: progênies de irmãos-completos; ICE: índice de capacidade de expansão; Geral: média geral das progênies; Selec.: média das progênies selecionadas.

¹PMI – avaliação de PMI com recombinação de progênies S1.

² Média estimada com base no peso médio das espigas selecionadas.

2.5. Marcadores moleculares

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

da célula; portanto, não são confundidos com efeitos ambientais, pleiotrópicos ou epistáticos.

Os marcadores moleculares apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos porque fornecem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, permitindo a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse. O número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações restringem a sua utilização (Guimarães e Moreira, 1999). Os marcadores moleculares, ou técnicas baseadas em DNA como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Simple Sequence Repeat* (SSR) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) são frequentemente utilizados em estudos de ecologia, evolução, taxonomia, filogenia e estudos genéticos em plantas (Agarwall et al., 2008). Nos últimos anos os marcadores de DNA baseados no comprimento da seqüência amplificada, têm sido desenvolvidos usando a metodologia de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), para facilitar o melhoramento de plantas (Tanksley et al., 1989); os estudos baseados em metodologia de PCR reúnem tanto os requerimentos técnicos quanto genéticos para a caracterização de recursos genéticos animal e vegetal. Inicialmente RFLP foi proposto e usado para mapeamento genético em um grande número de espécies vegetais. Vários outros marcadores moleculares baseados em PCR, incluindo RAPD e SSR foram sugeridos e utilizados (Gupta et al., 1996). Hoje os marcadores microssatélites estão sendo utilizados e certamente terão seu uso aumentado no futuro para mapear genomas, quantificar a diversidade genética, caracterizar acessos em coleções de germoplasma de plantas e dinâmica de população (Thomas e Scott, 1993; Yang et al., 1994; Rongwen et al., 1995; Gupta et al., 1996).

Durante várias décadas, a variação na seqüência de DNA tem sido extensivamente explorada, para produzir marcadores para análise do genoma de organismos eucariotos. A disponibilidade de um grande número de marcadores em nível de DNA tem produzido uma mudança radical na capacidade de mapear genomas, com conseqüentes aplicações para genética humana e para a agricultura

(Ferreira e Gratapaglia, 1996). Os recursos genéticos em plantas são um importante componente de biodiversidade, sendo a base da variabilidade genética que permite que cultivares novos e melhorados sejam desenvolvidos. Numerosas coleções de germoplasma têm sido estáveis, e esta estabilidade é importante para que tais coleções sejam representativas e acessíveis para os melhoristas e os biotecnologistas (Gama et al, 2000).

2.6. Microsatélites

Os marcadores moleculares denominados de SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou também conhecidos por microsatélites, tratam de uma classe de marcadores moleculares baseada em PCR, e foi desenvolvida por Litt e Luty (1989) e simultaneamente por Weber e May (1989). Os microsatélites têm sido extensivamente usados graças a sua abundância, hipervariabilidade no comprimento de seus alelos, distribuição casual nos diversos genomas e à pequena quantidade de DNA que é usada para a amplificação e subsequente análise (Kun-Sheng e Tanksley, 1993). Eles ocorrem freqüentemente e casualmente em toda a extensão do DNA de eucariontes examinados (Beckmann e Soller, 1990), e representam vasta fonte de marcadores altamente informativos (Zhao e Kochert; 1992, 1993). A abundância e polimorfismo de microsatélites foram primeiramente demonstrados no genoma humano e de outros eucariontes por Hamada et al. (1982) e Weissenbach et al. (1992).

Os microsatélites são repetições de poucos pares de bases de DNA (2 – 6 pb) em seqüências, onde as seqüências mais abundantes são os dinucleotídeos (repetições de 2 pares de bases). Estas seqüências são distribuídas aleatoriamente através do genoma (Jacob et al., 1991; Agarwall et al, 2008).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites ou loci *SSRs* são conservadas, e são utilizadas para construir as seqüências de *primers*, para serem usados para a amplificação dos *loci* de microsatélites usando a PCR. Quando um par de *primers* construído para as regiões flanqueadoras é utilizado para amplificar o *locus SSR* em vários genótipos, este poderá revelar polimorfismo no referido *locus*. Este polimorfismo é observado na forma de diferença no comprimento do

segmento de DNA produzido pela reação de amplificação, ou produto amplificado (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989). Cada segmento ou seqüência de DNA que é produto da amplificação, separado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), ou em gel de agarose de alta qualidade (Becker e Heun, 1995), representa um alelo do *locus* (Gupta et al., 1996).

As diferenças no tamanho dos microssatélites são atribuídas à variação no número de unidades de repetição em um *locus* de *SSR* em particular. Os microssatélites são muito importantes para a evolução em função de sua extrema alta taxa de mutação. É 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder uma repetição de uma geração para a próxima, do que o gene para hemoglobina sofrer uma mutação em única base promovendo a desordem anemia falciforme. Os microssatélites podem retornar ao seu estado de comprimento original dentro de poucas gerações (Moxon e Wills, 1999). A hipervariabilidade de microssatélites não é totalmente entendida, e pode ser originada através de *crossing-over* desigual ou deslizamento de seqüências durante a replicação do DNA. É um marcador codominante, existindo muitos alelos em uma população, o nível de heterozigosidade para este marcador tem sido considerado como extremamente alto. De acordo com Röder et al. (1995), este marcador é muito importante para o mapeamento genético de espécies com pouco polimorfismo intraespecífico, tais como a maioria das espécies endogâmicas. Os estudos realizados indicaram que os tipos de motivos de repetições abundantes, e o grau de polimorfismo podem variar de uma espécie para a outra. Nas plantas, a freqüência estimada é 0,85% em *Arabidopsis* e 0,37% em *Zea mays*, enquanto nos peixes é de 3,21%; em *Tetraodon nigroviridis* é de 2,12%.

As espécies de plantas autógamas, em particular, apresentam uma deficiência no número de *loci* polimórficos quando marcadores do tipo RFLP são usados. Para o arroz, o valor de heterozigosidade foi significativamente maior com microssatélite do que com RFLP (Kun-Sheng e Tanksley, 1993). Outra característica importante deste marcador é que ele é herdado de forma Mendeliana, assim pode ser usado para análise de ligação.

Enquanto os microssatélites são amplamente utilizados como fonte alternativa de polimorfismo para mapeamento do genoma de mamíferos, o seu uso em estudos de espécies vegetais teve início mais recentemente (Bell e Ecker, 1994; Morgante et al., 1994; Cregan et al., 1994). O primeiro estudo publicado utilizando microssatélite em plantas foi realizado por Condit e Hubbell (1991), neste trabalho foi descrita a alta ocorrência deste marcador em genoma de espécies de plantas. Em trigo (Röder et al., 1995) e cevada (Shagai-Marrof et al., 1994) observou-se abundância em microssatélites, e estes foram altamente polimórficos.

Este marcador tem sido usado para análise genética em espécies de mamíferos (Riley e Krieger, 2008), em outras espécies de eucariontes como insetos (Miao et al., 2008), aves (Johansson, 2008), peixes (Cheng et al., 2007; Pardo et al., 2007), e plantas (Tsilo et al., 2008; Xu et al., 2008; Perera et al., 2008; Ofori et al., 2008).

Pesquisas em bases de dados indicaram que microssatélites são cinco vezes menos abundantes nos genomas de plantas do que em animais e que a abundância dos diferentes motivos de microssatélites em plantas e animais diferem consideravelmente. A repetição (CA)_n é uma das que ocorre com maior frequência em humanos e muitos mamíferos (Hamada et al., 1982; Beckmann e Weber, 1992), mas é comparativamente menos freqüente em plantas (Lagercrantz et al., 1993). As repetições (AT)_n são os dinucleotídeos mais comuns em microssatélites de plantas. Entretanto a maior abundância da repetição (GA)_n do que da (CA)_n parece ser um aspecto consistente de genoma de plantas (Akkaya et al., 1992; Bell e Ecker, 1994). Esta repetição é a mais abundante no genoma de arroz (Kun-Sheng e Tanksley, 1993) e também em trigo (Panaud et al., 1995; Röder et al., 1995). Em *Pinus radiata* os di-nucleotídeos (CA)₁₀ e (GA)₁₀ foram os microssatélites mais abundantes (Smith e Devey, 1994). Em milho a relativa abundância de diferentes motivos repetitivos variou consideravelmente, e todos os possíveis tipos de motivos de di e tri-nucleotídeos foram observados. As mais abundantes repetições observadas por Chin et al. (1996) foram (AG/CT)_n, (CCT/GGA)_n e (CCG/GGC)_n. Os motivos com tri-nucleotídeos e tetra-nucleotídeos são também encontrados em

genomas de plantas; os mais frequentes deles são (AAG)_n e (AAT)_n (Lagercrantz et al., 1993; Wang et al., 1994).

A variação no número de repetições de nucleotídeos da sequência em *tandem* em um *locus SSR*, entre os diferentes genótipos, fornece as bases para o polimorfismo que pode ser usado em estudo de genética de plantas (Condit e Hubbell, 1991). Existe uma boa relação linear entre o número de alelos detectado em um *locus*, e o comprimento do microssatélite. Quanto maior o número de repetições em um microssatélite, maior é o número de alelos detectados (Gupta et al., 1996).

A aplicação de *SSR* em pesquisas com plantas é muito mais recente do que o emprego para estudos com animais (Bell e Ecker, 1994; Morgante et al., 1994; Cregan et al., 1994). Em poucos anos, *loci* de microssatélites têm sido documentados em uma grande variedade de espécies de vegetais, havendo um aumento no desenvolvimento e identificação de *primers* para *loci SSRs* para várias espécies tais como: soja (Rongwen et al., 1995); arroz (Zhao e Rochert, 1993; Wu e Tanksley, 1993; Panaud et al., 1996); milho (Taramino e Tingey, 1996; Senior et al., 1996; Chin et al., 1996); *Brassica* (Langercrantz et al., 1993); trigo (Röder et al., 1995); *Arabidopsis* (Bell e Ecker, 1994); árvores tropicais (Condit e Hubbell, 1991); uva (Thomas e Scott, 1993); cevada (Shagai-Marroof et al., 1994); *Pinus radiata* (Smith e Devey, 1994) e em tomate (Vosman e Arens, 1997). Ribaut et al. (1997) ressaltaram que uma das necessidades nos programas de melhoramento é a capacidade de separar uma grande população segregante para um traço desejável. Estes autores destacaram que muitas vezes esta separação é difícil, e crescer uma grande população de plantas até o estágio adulto para mera seleção, necessita de espaço para plantio, um grande trabalho para o cuidado das plantas até o estágio adulto e gasto financeiro. Desta forma, por meio de seleção assistida por marcadores moleculares, a escolha de genótipos para cruzamentos de plantas poderia ser facilitada, e a seleção poderia ser feita em estágio de plântulas. Tanto os *loci SSR* como as *Sequence Tagged Site* (STS), têm sido usados como ferramenta molecular para separar populações segregantes, envolvidas em esquema de retrocruzamento por meio de seleção assistida por marcadores. Desde que a

avaliação pode ser aplicada a uma população muito grande, a pré-seleção aumenta a pressão de seleção em cada geração de retrocruzamento. Estas técnicas são rápidas e reproduzíveis, podendo ser utilizadas de forma mais eficiente e com menos custo (Ribaut et al., 1997).

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

Durante os últimos 10 anos, mapas moleculares baseados em marcadores de DNA têm sido preparados para várias espécies de plantas. Genes para muitos traços fenotípicos têm também sido adicionados a estes mapas, formando um mapa composto, possuindo tanto marcadores moleculares como também genes para traços específicos. A disponibilidade de um mapa genético saturado para um cereal, permite a clonagem baseada neste mapa, e subsequente isolamento de genes (Gupta et al., 1996). Os *loci SSRs* apresentam um alto nível de polimorfismo sendo numerosos em genomas de plantas, estes aspectos facilitaram grandemente a construção de mapas genéticos, parecendo ser um dos mais promissores marcadores. O enriquecimento de mapas genéticos de planta com marcadores moleculares permitiu a localização tanto de monogenes como de *Quantitative Trait Loci* (QTLs), capacitando subsequente clonagem posicional de vários genes. Yu et al. (1994) descreveram o primeiro mapeamento de um gene de soja que confere resistência à doença em plantas, usando como marcador microssatélite. Zhang et al. (1994) usaram microssatélites de arroz para identificar regiões cromossomais que estão correlacionadas com produção.

Os microssatélites também foram escolhidos para a identificação de indivíduos e para teste de paternidade (Ferreira e Gratapaglia, 1996). A alta sensibilidade de análises de microssatélites baseado em PCR foi de grande benefício também para as investigações forenses e, além disso, abriu completamente novas áreas de pesquisa, tais como as análises de amostras com quantidade limitada de DNA, ou com DNA degradado (Schlötterer, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição do composto CMS-43

Para o presente estudo foram utilizadas oito populações, a saber: CMS-43 - C₀ Ciclo original e os sete ciclos subseqüentes (C_I, C_{II}, C_{III}, C_{IV}, C_V, C_{VI} e C_{VIB}).

3.2. Germinação das sementes

Trinta sementes de plantas de cada um dos ciclos de seleção (C₀, C_I, C_{II}, C_{III}, C_{IV}, C_V, C_{VI} e C_{VIB}), foram germinadas em balaios contendo terra e mantidas à temperatura ambiente. Para a extração de DNA e avaliação da variabilidade e distância genética foram utilizadas folhas jovens de 15 plantas de cada um dos ciclos de seleção, totalizando 120 amostras.

3.3. Extração de DNA das amostras de milho pipoca

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando o protocolo descrito por Hoisington et al. (1994). Para a extração de DNA, cada planta foi considerada um indivíduo dentro de cada um dos ciclos de seleção, sendo estes representados por cada microtubo de extração. Em um microtubo (2mL, tubo 1) foram adicionados 300mg de tecido de folha previamente pulverizada com nitrogênio líquido e 800uL de tampão de extração contendo CTAB (preparado com 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 com 65°C durante 1 hora, realizando-se agitações suaves a cada 5 minutos. Após os tubos serem retirados da incubação em banho-maria, eles foram deixados por 5 minutos em temperatura ambiente para esfriar. Em seguida, foram adicionados 800 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (na proporção 24:1) com agitação suave durante 5 minutos. Após uma centrifugação com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi recuperado, coletado e transferido para um microtubo (2mL) limpo (tubo 2) e adicionado 800 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 com agitação durante 5 minutos, centrifugado com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi

novamente coletado e transferido para outro microtubo (1,5mL) limpo (tubo 3) e foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol em relação ao sobrenadante recuperado. Após a adição de isopropanol os tubos foram levemente vertidos por 1 minuto, e mantidos em -20 °C por 30 minutos. Após este período foi efetuada uma centrifugação com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado, este foi adicionado e misturado levemente por inversão por 1 minuto. Foi realizada uma nova centrifugação com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado; o *pellet* foi seco e foi adicionado 400µL de TE (0,001M Tris/HCl e 0,0001M EDTA) para ressuspender o DNA. Para a digestão do RNA foram adicionados 2µL de RNase a 20ng/µL, e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 2 horas. Após este período foram adicionados 200µL de fenol e 200µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1); esta mistura foi agitada durante 5 minutos e centrifugada com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para microtubo limpo (tubo 4), e foi adicionando 400µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1); esta mistura foi agitada durante 5 minutos e centrifugada com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (fase superior) foi transferida novamente para um microtubo de 1,5mL limpo (tubo 5), foram adicionados 250µL de isopropanol e 25µL de NaCl 5M, e misturado levemente por inversão por 1 minuto. O microtubo foi colocado em -20°C por 30 minutos. Após este tempo foi centrifugado com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado, misturando por inversão por 1 minuto. Após efetuar uma centrifugação com 12.000r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco e ressuspendido em 100µL de TE.

3.4. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi feita por análise através de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M e EDTA 0,001M) e 80 Volts por aproximadamente 1 h (Hoisington et al., 1994). O

DNA extraído de cada amostra foi comparado com soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas de 50, 100 e 150 ng, respectivamente. Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminator High Performance* - Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

3.5. Amplificação do DNA

Para a escolha dos marcadores polimórficos entre as populações a serem avaliadas, foram testados 100 microssatélites já mapeados para milho comum. Todos os microssatélites utilizados foram obtidos a partir do banco de dados MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>, acesso em 22 de outubro de 2008).

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*; reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2ml, usando um termociclador Techne TC-512. Para a reação foi utilizado 25ng de DNA, $2,0 \mu\text{l}$ de tampão de reação 10X, 2,5mM de MgCl_2 , $0,8 \mu\text{M}$ de cada dNTP, 1U de *Taq-DNA Polimerase* (Invitrogen), e $0,4 \mu\text{M}$ de cada um dos *primers* F e R específicos para um volume final de $20 \mu\text{l}$ (Quadro 2).

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

Reagentes	Concentração Estoque dos Reagentes	Concentração Final dos Reagentes/reação	$\mu\text{L}/20\mu\text{L}$ de reação
H ₂ O			12,1
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1,6
DNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0,8
<i>Primer</i> (F)	10 μM	0,3 μM	0,4
<i>Primer</i> (R)	10 μM	0,3 μM	0,4
Taq-DNA Polimerase	5 U/ μL	1 U	0,2
DNA	10 ng/ μL	25ng	2,5
Total			20 μL

Para a amplificação dos microssatélites, inicialmente foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991), descrito no Quadro 3. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose ms-8 a 4% de concentração,

usando tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,045M e EDTA 0,001M), e o gel foi preparado com 50% de agarose ms-8 e 50% de agarose comum. A eletroforese foi realizada com 60 Volts por 4 horas. Após a eletroforese os géis foram corados em solução 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 3 - Seqüência do programa *Touchdown* utilizado para amplificação do DNA das diferentes plantas de milho pipoca dos diferentes ciclos de seleção

PASSO	ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO
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	Voltar ao passo 2 - 9 vezes	-----	-----
6	Desnaturação	94°C	1 Min.
7	Anelamento	55°C	1 Min.
8	Extensão	72°C	2 Min.
9	Voltar ao passo 6 – 19 vezes	-----	-----
10	Extensão Final	72°C	2 Min.
12	Imersão	10°C	∞

3.6. Análise dos dados

Os *loci SSR* polimórficos foram analisados para estimar, o número médio de alelos por *locus*, a heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada (H_e) foram avaliadas para a plantas de cada ciclo de seleção estudado. O afastamento do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi examinado para cada *locus*, para cada ciclo. Usando a estatística F, de Sewall Wright, o déficit de heterozigotos (F_{IT}) e a diversidade genética entre os ciclos foram estimados empregando-se o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). O coeficiente **F** de Wright (Wright, 1951) é definido como a correlação entre os alelos nos gametas que formam um zigoto. A estatística F baseia-se na probabilidade de se obter o mesmo alelo por amostragem

em uma população diplóide finita com N indivíduos. Essa probabilidade é de $1/(2N)$.

Wright descreveu os seguintes coeficientes de endogamia, aplicáveis a uma população com nível hierárquico de subdivisão:

$$F_{IT} = F$$

$$F_{IS} = f$$

$$F_{ST} = \theta$$

F : desvio das freqüências genóticas da população em relação ao equilíbrio de Hardy – Weinberg.

θ : coeficiente de ancestralia, representando a probabilidade de que dois indivíduos pertencentes a subpopulações diferentes possuam um alelo idêntico por descendência

f : probabilidade de que os dois alelos presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência (ou seja, a endogamia em nível de indivíduo).

Para a análise da variância genética, usando o componente $s^2_{\text{subpopulações}}$ obtido por meio da análise de variância feita com genótipos codificados, o coeficiente F_{st} é estimado por:

$$F_{ST} = \sigma^2_{\text{subpopulações}} / p(1-p)$$

O coeficiente F_{IT} pode ser estimado com base nas freqüências observadas (H_o) e esperadas (H_e) de genótipos heterozigotos, ou seja:

$$F_{IT} = 1 - H_o / H_e$$

E a significância pode ser testada por χ^2 .

Usando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) foi gerada uma matriz de similaridade e os agrupamentos em um dendrograma. O método UPGMA é um método de agrupamento hierárquico aglomerativo, pois opera diretamente sobre a matriz das distâncias genéticas, dispensando o retorno à matriz dos dados originais (Dias, 1998). Nesse método, o critério utilizado para formação dos grupos é a média das

distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. A distância intergrupo é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos, algebricamente, a distância entre os itens i e j para $i \neq j$ é dada por:

$$d_{(ij)} = \text{mín} (d_{ij})$$

A distância do item k em relação ao primeiro grupo formado por i e j com $k \neq i, j$, fica definida por:

$$d_{(ij)k} = 1/2 (d_{ik} + d_{jk})$$

e a distância entre dois grupos (ij) e (kl) , com $i, j \neq k, l$ é dada por (Alfenas, 1998):

$$d_{(ij)(kl)} = 1/4 (d_{ik} + d_{il} + d_{jk} + d_{jl})$$

Para essa análise, foi utilizado o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999) e foi utilizado o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei, 1972). A distância de Nei é a mais conhecida das medidas de distância genética (Dias, 1998). Essa metodologia pressupõe uma medida de intensidade genética (I) definida por:

$$I = \frac{J_{PQ}}{\sqrt{J_P \times J_Q}}$$

onde $J_P = \sum p_i$, $J_Q = \sum q_i$ e $J_{PQ} = \sum p_i q_i$, sendo p_i e q_i as freqüências respectivas do i -ésimo alelo considerado nas populações P e Q . Uma vez obtido o estimador da identidade genética, a distância D é dada pelo cologaritmo neperiano de I , tal que:

$$D = -\ln (I)$$

A base teórica da distância de Nei reside na pressuposição de que, se duas populações quaisquer não possuem alelos em comum, então $J_{PQ} = I = 0$. No entanto, se ambas têm os mesmo alelos em idênticas freqüências, então $J_P = J_Q = J_{PQ} = I = 1$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação do DNA genômico das folhas das plantas de cada um dos ciclos de seleção, foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA do fago λ em gel de agarose. Com a metodologia utilizada para a extração do DNA foi possível realizar uma extração de qualidade para a amplificação e com quantidade, que variou de 10 a 40 ng. μL^{-1} (Figura 1).

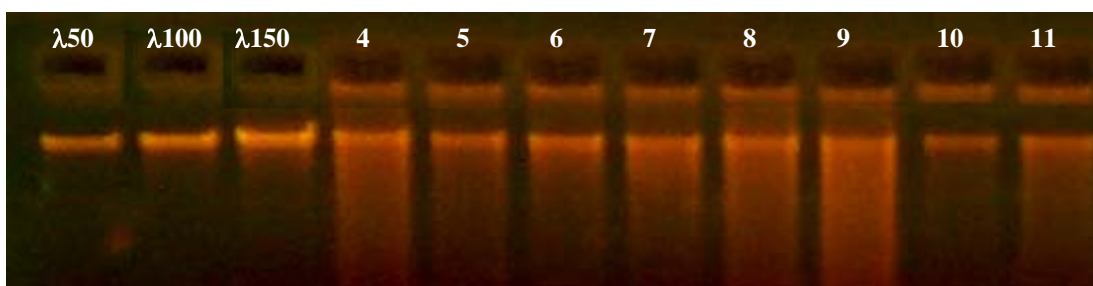


Figura 1 - Gel de Agarose 0,8% usado para a quantificação das amostras de DNA de milho pipoca. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de fago λ utilizadas como padrão de concentração com 50, 100 e 150 ng, respectivamente. As amostras 4 - 11 são de DNA de milho pipoca extraídos de diferentes plantas dos diferentes ciclos de seleção.

Dos 100 pares de *primers* de microsatélites isolados para milho comum e testados para milho pipoca, 76 produziram fragmentos de DNA amplificados para os ciclos $C_0 - C_{VIB}$ produzidos a partir do composto CMS-43. Destes *primers*, 21 foram considerados polimórficos conferindo um aproveitamento de 21% dos *primers* desenvolvidos para milho comum, e neste trabalho foram utilizados 20 desses *primers* para estudar a variabilidade genética em milho pipoca; estes *primers*, suas seqüências, repetições flanqueadas, número de alelos e localizações nos cromossomos estão apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Sequências dos *primers* de microsatélite, repetição da seqüência, nº de alelos detectados para cada *primer* e localização destes nos cromossomos usados na estimação da diversidade genética dos ciclos de seleção em milho pipoca

Locus	Seqüência de Nucleotídeos	Repetição	Número de Alelos	Cromossomo
<i>Umc 1354</i>	GATCAGCCCCGTTTCAGCAAGTT(F)	(CCG) ₅	3	1
<i>Umc 1354</i>	GAGTGGAGGCGGAGGATCTG(R)			

Quadro 4, cont.

<i>Bnlg 1083</i>	ACAGTCTGTTGGGGAACAGG ((F)	AG(29)	3	1
<i>Bnlg 1083</i>	CAACGCTGGTTTGTCTTTA(R)			
<i>Bnlg 1063</i>	GGAGACAACCCGACGAC(F)	AG(42)	3	3
<i>Bnlg 1063</i>	GGTACCAGAGCCACAGATCC(R)			
<i>Umc 2245</i>	CGTCGTCTTCGACATGTACTCAC (F)	(CAA)7	3	2
<i>Umc 2245</i>	GCCCTGTTATTGGAACAGTTTACG (R)			
<i>Umc 1292</i>	GAAGTGGGGAACATGGTTAATGTC (F)	(TGG)6	3	1
<i>Umc 1292</i>	TCACGGTTCAGACAGATACAGCTC(R)			
<i>Umc 2261</i>	ACCAGTCCACCAGGAACATCTTTA (F)	(GAAGAG)4	2	3
<i>Umc 2261</i>	GTCGAAAGACGGAGAGAGGAAAAG (R)			
<i>Umc 2343</i>	GACTGACAACCTCAGATTTACCCCA (F)	(TGTGTGTG)4	3	9
<i>Umc 2343</i>	TCATCTTCCCCACAAATTTTCATT (R)			
<i>Umc 2115</i>	CTGTCTGTCTACCCAACCAACAG(F)	(TGCCA)5	3	5
<i>Umc 2115</i>	GGGGATAGGCGTGTGTATGTACTG(R)			
<i>Umc 1071</i>	AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG (F)	(TACGA)5	3	1
<i>Umc 1071</i>	GTGGTTGTCGAGTTCGTCTATT(R)			
<i>Umc 2116</i>	GTCACTGCACGATCCATCACAT(F)	(GCGACT)4	2	1
<i>Umc 2116</i>	CTCAGCTACAGGAGCGAAGAGG(R)			
<i>Umc 2262</i>	TCTGTTCCGGATTCTTCTTCAGTC(F)	(CATCT)5	2	3
<i>Umc 2262</i>	CGTTCCTGGTACCCTGTCTATAA(R)			
<i>Umc 2237</i>	CGTTCCTGGTACCCTGTCTATAA (F)	(CATCT)5	3	3
<i>Umc 2237</i>	TCTGTTCCGGATTCTTCTTCAGTC (R)			
<i>Umc 1336</i>	CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTGG (F)	(ACCAG)4	3	10
<i>Umc 1336</i>	GTACAAATGATAAGCAAGGGGACAG (R)			
<i>Umc 2226</i>	AGCTTCACGCTTCTTAGACCAAA (F)	(TGG)6	2	1
<i>Umc 2226</i>	TGCTGTGCAGTTCTTGCTTCTTAC(R)			
<i>Umc 1245</i>	TGGTTATGTGCATGATTTTCCTG(F)	(AGCAG)4	2	1
<i>Umc 1245</i>	CATGCGTCTGATCTTCAGAATGTT (R)			
<i>Umc 1318</i>	ACTTCGTCTAGTGTCCCTCCGTT(F)	(GTC)5	3	10
<i>Umc 1318</i>	TGCCAGATTAAGCAACACAAGA(R)			
<i>Umc 1077</i>	CAGCCACAGTGAGGCACATC(F)	(CA)15(CGCA)12	3	10
<i>Umc 1077</i>	CAGAGACTCTCCATTATCCCTCCA(R)			
<i>Umc 1737</i>	ATGCTTCTCTCAGAAGCCATCC(F)	(AGA)7	2	1
<i>Umc 1737</i>	TAGCTAGGTAGTGATGTGCGTGCT (R)			
<i>Umc 1906</i>	ACCTTTGCTGCTGCTACTGTGTC(F)	(AGA)6	2	1
<i>Umc 1906</i>	CTAAAGAGGAATCGGTGAAGTCC (R)			
<i>Umc 1656</i>	GTACGAGCAGGCCATTAACCC (R)	(CGGT)7	3	6
<i>Umc 1656</i>	AGTTTTGACCGCGCAAAAAGTTA (L)			

Dentre os 20 *primers* polimórficos utilizados no presente estudo, 12 apresentaram 3 alelos (*Umc1354*, *Bnlg1083*, *Bnlg1063*, *Umc2245*, *Umc1292*,

Umc2343, Umc2115, Umc1071, Umc2237, Umc1336, Umc1077 e Umc1656), enquanto que 8 apresentaram dois alelos (*Umc2261, Umc2116, Umc2262, Umc2226, Umc1245, Umc1318, Umc1737 e Umc1906*).

Com estes *primers* foram identificados 52 alelos, com um número médio de alelos por *locus* polimórfico igual a 2,6 (Figura 2 e Quadro 5) mesmo após seis ciclos de seleção entre e dentro de progênies de meio irmãos na população de milho pipoca CMS- 43.

O polimorfismo nos 20 *loci SSR* avaliados para os ciclos de seleção da população CMS-43 de milho pipoca foi menor quando comparado com os valores registrados na literatura para populações de polinização aberta e também para linhagens de milho comum (Liu et al., 2003; Vigouroux et al., 2005), também foi menor do que o polimorfismo observado para o milho Dentado do Corn Belt (Smith, 1986), Flint do Norte e Dentado do Sul (Labate et al., 2003). O fato dos *primers* de microssatélites terem sido construídos originalmente a partir do genoma de milho comum, e selecionados não casualmente a partir da biblioteca genômica do milho comum, pode ser um dos fatores que contribuiu para a menor diversidade genética verificada na população CMS-43. Alguns autores têm registrado que os microssatélites são mais variáveis na espécie original, a partir da qual estes foram construídos, do que nas espécies intimamente relacionadas com a espécie original (Matsuoka et al., 2002). O milho pipoca é da mesma espécie que o milho comum, porém, em estudos que comparam a diversidade genética nos *loci 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 milho doce, o milho pipoca tem apresentado um número de alelos por *locus* menor e valores de heterozigosidade média também menor do que os verificados para o milho comum (Liu et al., 2003).

O outro aspecto que pode estar contribuindo para o reduzido número de alelos nos 20 *loci SSR* estudados nos ciclos de seleção da população CMS-43 de milho pipoca, é que somente 20% dos *locus SSR* (4 *locus*) são formados por repetições de di-nucleotídeos. Nos *loci Umc 1354, Umc 1063, Umc 2343, e Umc 1077* foram detectados 3 alelos por *locus* (Quadro 4), enquanto para os demais 16

loci, formados por três ou mais repetições de pares de bases, foram detectados 2,57 alelos por *locus* com tri-nucleotídios e 2,55 alelos por *locus* com mais de três nucleotídeos. Valores altos para a diversidade genética, estimados a partir de *loci SSR*, tem sido obtidos quando a maior proporção dos *loci* analisados é formada por di-nucleotídeos (Vigouroux et al., 2002; Liu et al, 2003). A heterozigosidade média esperada em sete linhagens de milho pipoca em *loci SSR* de di-nucleotídeos foi registrada por Liu et al. (2003) como sendo igual a 0,56 e para *loci* com 3 ou mais repetições como sendo igual a 0,45. O valor de heterozigosidade média esperada na população de CMS-43, onde 80% dos *loci SSR* são formados por 3 ou mais repetições de nucleotídeo, foi igual a 0,40 no ciclo C₀. A frequência dos alelos nos 20 *loci SSR* foi diferente e variável nos diferentes ciclos de seleção no ciclo C_{VIB} foi observado a perda de 5 alelos (46 alelos), caracterizando uma redução de 9,8% para os alelos em relação ao ciclo C₀ (51 alelos). Para a maioria dos *loci* a mudança na frequência dos alelos deve ocorrer por conta de processos estocásticos como, por exemplo, em função de deriva genética. *Loci* de microssatélites representam regiões repetitivas do genoma e não codificantes; de acordo com Heath et al. (1993), aparentemente estas regiões não estão sujeitas a fortes pressões de seleção. Entretanto estas regiões seletivamente neutras podem estar ligadas aos *loci* que estão sofrendo seleção intencional, e desta maneira podem também estar sujeitas à pressão de seleção. A aparente falta de neutralidade para *loci* moleculares já foi observada em programas de seleção recorrente recíproca por Labate et al. (2003). Estes autores observaram que 17% dos *loci* de RFLP distribuídos ao longo do genoma de milho apresentaram seleção associada aos *loci* que estavam sofrendo seleção para a característica de interesse econômico. Pinto et al. (2003) e Hyrkas e Carena (2005) descreveram que sob alta pressão de seleção, drástica redução na variabilidade genética é esperada em curto tempo, deste modo reduzindo as possibilidades de seleção a médio e longo prazo. Entretanto, mais alta pressão de seleção em pequenas populações pode resultar em problemas relacionados com o tamanho efetivo da população, aumentando a possibilidade de perda de alelos importantes devido à deriva genética. Muitos autores detectaram que mudanças na frequência de alelos podem estar associadas com a seleção para produção e também

com outras características de interesse agrônômico. Labate et al. (2003) utilizando marcadores moleculares examinaram os efeitos de seleção para produção sobre a frequência dos alelos em duas populações de milho submetidas à seleção recorrente recíproca. Estes autores concluíram que as mudanças na heterozigosidade devido à endogamia são confundidas com mudanças resultantes de seleção e de deriva. Pollak et al. (1984) também detectaram correlações entre frequências de alelos dos *loci Acp-1* (fosfatase ácida-1), *Got-1* (glutamato oxalacetato transferase-1), *Prx-1* (Peroxidase-1) e *Adh-1* (álcool desidrogenase-1) com produção, maturação, e variáveis foliares.

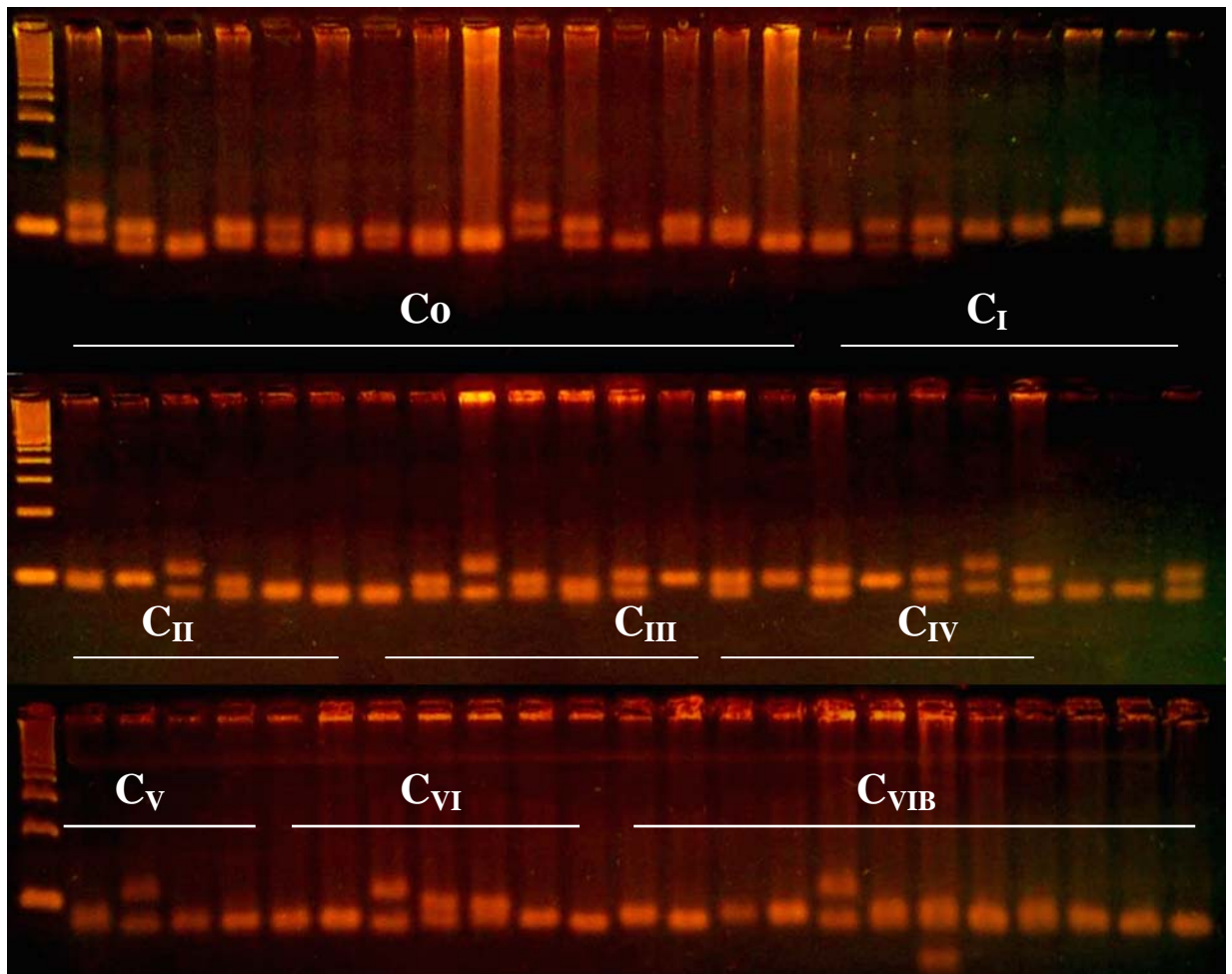


Figura 2 - Gel de amplificação do *primer* UMC1336 concentrado a 4% (50% agarose comum e 50% agarose ms-8). No gel estão apresentadas as plantas do ciclo C₀ e os sete ciclos de seleção (C_I – C_{VIB}); a primeira amostra de cada pente é o *ladder* 100pb (Invitrogen).

Stuber et al. (1980) relataram correlações entre o produto dos *loci Acp-1*, *Pgm-1*, *Glu-1*, *Mdh-1* e produção. Labate et al. (1999) afirmaram que a produção de

grãos é controlada por um grande número *loci* distribuídos ao longo de todo o genoma, e a relação entre marcadores moleculares e produção de grãos pode ser um sensível indicador do nível de heterosigozidade de uma população. Neste trabalho foram realizados sete ciclos de seleção recorrente intrapopulacional no composto de milho pipoca CMS-43. A seleção foi realizada para capacidade de expansão (CE) um caráter importante para o milho pipoca (Pacheco et al., 2005). Os melhoristas de milho tem freqüentemente usado seleção recorrente baseando-se em famílias de meio-irmãos, irmãos completos e progênies S1 ou S2 (Flint-Garcia et al., 2003; Carena, 2005). A seleção recorrente é um método de melhoramento que aumenta os alelos favoráveis enquanto mantém a variação genética. Os alelos são rapidamente fixados; e tanto alelos deletérios quanto homozigotos são expostos e eliminados no início da seleção (Doerksen et al., 2003). Como é possível observar no quadro 5, a seleção recorrente imposta para o composto de milho pipoca CMS-43 não é refletida no conjunto de alelos estudados para os 20 *loci* de microssatélites avaliados, não foi possível observar variações alélicas associadas com a característica capacidade de expansão (CE) e nem para o rendimento de peneiras, características alvo deste processo de seleção, apesar de parecer haver tendência para futura fixação de alelos para alguns *loci*, como por exemplo para o alelo c do locus *Umc1354* observado no Quadro 5.

Quadro 5 - Frequência dos alelos para os diferentes *loci* de microssatélites analisados para os sete ciclos de seleção de milho pipoca

<i>Locus/</i> População	C ₀	C _I	C _{II}	C _{III}	C _{IV}	C _V	C _{VI}	C _{VIB}
<i>Umc1354</i>								
Alelo A	0,1333	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,0667
Alelo B	0,2333	0,2143	0,7143	0,2857	0,1429	0,2143	0,1429	-----
Alelo C	0,6333	0,7857	0,2857	0,7143	0,8571	0,7857	0,8571	0,9333
<i>Bnlg1083</i>								
Alelo A	0,0667	0,2857	-----	0,2857	0,0714	0,1429	-----	-----
Alelo B	0,5667	0,4286	0,3571	0,2143	0,2857	0,7143	0,7143	0,5000
Alelo C	0,3667	0,2857	0,6429	0,5000	0,6429	0,1429	0,2857	0,5000
<i>Bnlg1063</i>								
Alelo A	0,2667	0,6429	0,1429	0,2143	0,1429	0,1429	-----	-----
Alelo B	0,6667	0,2857	0,5000	0,7857	0,5714	0,5714	0,7857	0,0800
Alelo C	0,0667	0,0714	0,3571	-----	0,2857	0,2857	0,2143	0,2000
<i>Umc2245</i>								
Alelo A	0,4667	0,4286	1,0000	0,8571	0,1429	0,2143	-----	0,8667
Alelo B	0,4000	0,5714	-----	0,1429	0,2143	0,5714	0,8571	0,1333
Alelo C	0,1333	-----	-----	-----	0,6429	0,2143	0,1429	-----

Quadro 5, cont.

<i>Umc1292</i>								
Alelo A	0,0333	0,0714	-----	0,2857	0,4286	0,4286	0,1429	0,1333
Alelo B	0,8667	0,7143	0,7143	0,2143	0,4286	0,5714	0,5714	0,7000
Alelo C	0,1000	0,2143	0,2857	0,5000	0,1429	-----	0,2857	0,1667
<i>Umc2261</i>								
Alelo A	0,9333	1,0000	0,8571	0,8571	0,8571	1,0000	0,9286	0,7667
Alelo B	0,0667	-----	0,1429	0,1429	0,1429	-----	0,0714	0,2333
<i>Umc2343</i>								
Alelo A	0,2667	0,2857	0,2857	0,2857	0,2143	0,2143	0,5714	0,6667
Alelo B	0,1333	0,6429	0,7143	0,7143	0,5714	0,5000	0,3571	0,2667
Alelo C	0,6000	0,0714	-----	-----	0,2143	0,2857	0,0714	0,0667
<i>Umc2115</i>								
Alelo A	0,1333	-----	0,2143	0,3571	0,1429	0,0714	0,2143	0,1333
Alelo B	0,6333	0,8571	0,6429	0,4286	0,7143	0,6429	0,2857	0,3333
Alelo C	0,2333	0,1429	0,1429	0,2143	0,1429	0,2857	0,5000	0,5333
<i>Umc1071</i>								
Alelo A	0,2000	0,3571	0,4286	0,4286	0,3571	0,5714	0,4286	0,9000
Alelo B	0,5333	0,6429	0,2857	0,4286	0,3571	0,3571	0,1429	0,6667
Alelo C	0,2667	-----	0,2857	0,1429	0,2857	0,0714	0,4286	0,0333
<i>Umc2116</i>								
Alelo A	0,0667	0,1429	0,4286	0,2857	0,2143	0,1429	0,1429	0,1333
Alelo B	0,9333	0,8571	0,5714	0,7143	0,7857	0,8571	0,8571	0,8667
<i>Umc2262</i>								
Alelo A	0,3333	0,5714	0,2857	0,4286	0,8571	0,5714	0,0714	0,5000
Alelo B	0,6667	0,4286	0,7143	0,5714	0,1429	0,4286	0,9286	0,5000
<i>Umc2237</i>								
Alelo A	0,0667	-----	-----	0,1429	0,1429	-----	0,1429	-----
Alelo B	0,8667	1,0000	0,7857	0,7857	0,7143	0,9286	0,8571	1,0000
Alelo C	0,0667	-----	0,2143	0,0714	0,1429	0,0714	-----	-----
<i>Umc1336</i>								
Alelo A	0,6000	0,3571	0,5000	0,5714	0,5714	0,7857	0,7857	0,7667
Alelo B	0,3333	0,5000	0,4286	0,3571	0,3571	0,1429	0,1429	0,1333
Alelo C	0,0667	0,1429	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,0714	0,1000
<i>Umc2226</i>								
Alelo A	0,4333	0,5714	0,6429	0,4286	0,5714	0,5000	0,5000	0,8333
Alelo B	0,5667	0,4286	0,3571	0,5714	0,4286	0,5000	0,5000	0,1667
<i>Umc1245</i>								
Alelo A	0,4667	0,5714	0,5714	0,9286	0,6429	0,8571	0,9286	0,8333
Alelo B	0,5333	0,4286	0,4286	0,0714	0,3571	0,1429	0,0714	0,1667
<i>Umc1318</i>								
Alelo A	0,7667	0,7143	0,5714	0,7143	1,0000	0,9286	0,9286	0,8000
Alelo B	0,2333	0,2857	0,4286	0,2857	-----	0,0714	0,0714	0,2000
<i>Umc1077</i>								
Alelo A	0,2000	0,2857	0,0714	0,0714	0,4286	0,0714	0,1429	0,4000
Alelo B	0,4333	0,2857	0,7857	0,5000	0,5000	0,8571	0,5714	0,5667
Alelo C	0,3667	0,4286	0,1429	0,4286	0,0714	0,0714	0,2857	0,0333
<i>Umc1737</i>								
Alelo A	0,1333	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0,3333
Alelo B	0,8667	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6667
<i>Umc1906</i>								
Alelo A	1,0000	1,0000	1,000	0,8571	0,8571	1,0000	1,0000	0,8667
Alelo B	-----	-----	-----	0,1429	0,1429	-----	-----	0,1333
<i>Umc1656</i>								
Alelo A	0,7667	0,1429	0,5714	0,7143	0,5714	0,8571	0,9286	0,7667
Alelo B	0,0667	0,5714	0,2143	0,1429	0,2857	-----	0,0714	0,2000
Alelo C	0,1667	0,2857	0,2143	0,1429	0,1429	0,1429	-----	0,0333

Dentre os 20 *loci* de microssatélites avaliados nos ciclos de seleção da população CMS-43 neste trabalho, nove deles apresentaram-se em equilíbrio de Hardy – Weinberg no último ciclo de seleção (C_{VIB}), como pode ser observado no Quadro 6. Este resultado indica que apesar da grande pressão de seleção exercida para as características desejáveis estes *loci SSR* continuam se comportando como se os cruzamentos estivessem ocorrendo casualmente.

Quadro 6 - Teste do χ^2 -quadrado para verificar o Equilíbrio de Hardy–Weinberg para os 20 *loci* de microssatélites estudados tanto na população inicial (C_0) e nos sete ciclos de seleção ($C_I - C_{IVB}$) para o composto CMS-43

População <i>Locus</i>	C_0	C_I	C_{II}	C_{III}	C_{IV}	C_V	C_{VI}	C_{VIB}
<i>Umc1354</i>	2,3224	0,3272	8,8888	1,0888	13,0909	0,3272	0,0909	0,0370
<i>Bnlg1083</i>	29,0389	9,4666	4,2666	12,1904	4,5555	13,2222	0,8000	0,1536
<i>Bnlg1063</i>	0,5834	1,3055	17,1428	0,3272	22,0952	9,0952	0,3272	6,2526
<i>Umc2245</i>	35,7669	8,2285	-----	13,0909	16,5925	10,5396	13,0909	19,4133
<i>Umc1292</i>	9,0030	3,6888	0,8000	6,0000	8,6000	8,2285	14,3571	20,0761
<i>Umc2261</i>	0,0370	-----	0,0909	0,0909	0,0909	-----	0,0000	0,1686
<i>Umc2343</i>	12,7958	4,5555	1,0888	1,0888	4,6071	12,1904	8,2285	36,4095
<i>Umc2115</i>	6,2836	0,0909	6,0000	12,9555	13,2222	1,3055	6,6190	4,1621
<i>Umc1071</i>	5,8178	4,2666	9,4666	3,1111	4,7866	3,2142	3,1111	29,0370
<i>Umc2116</i>	0,0370	0,0909	8,2285	1,8888	3,6363	0,0909	0,0909	3,7979
<i>Umc2262</i>	0,2542	8,2285	1,0888	1,7285	0,0909	1,7285	0,0000	2,0317
<i>Umc2237</i>	0,2584	-----	0,3272	13,0909	13,2222	0,0000	13,0909	-----
<i>Umc1336</i>	5,8496	13,1190	2,0380	0,7071	2,6571	0,3272	0,3272	28,2898
<i>Umc2226</i>	0,5279	0,0571	4,2666	0,0571	1,7285	0,3401	0,3401	1,6846
<i>Umc1245</i>	8,8320	1,7285	0,0571	0,0000	0,1500	0,0909	0,0000	0,4666
<i>Umc1318</i>	1,1620	0,8000	0,0571	0,8000	-----	0,0000	0,0000	0,7608
<i>Umc1077</i>	12,2965	2,2625	6,0000	8,2285	4,5142	13,0909	2,1889	12,1907
<i>Umc1737</i>	19,4133	-----	-----	-----	-----	-----	-----	16,3742
<i>Umc1906</i>	-----	-----	-----	0,0909	0,0909	-----	-----	19,4133
<i>Umc1656</i>	1,8498	5,3035	13,4285	13,2222	22,0952	0,0909	0,0000	1,1620

Tal fato chama atenção, pois este resultado indica que ainda é possível que ocorra ganho de seleção efetuados em novos ciclos de seleção recorrente para o composto de milho pipoca CMS-43. Um método de seleção recorrente recíproca com alta intensidade de seleção foi aplicado para duas populações de milho tropical, BR-105 e BR-106 por Pinto et al. (2003), deste processo de seleção foram originados os sintéticos melhorados IG-3 e IG-4. O efeito da seleção foi avaliado utilizando 30 *loci* de microssatélites, e estes autores constataram uma redução no número de alelos bem como uma mudança na frequência dos alelos. Estes autores

encontraram resultados semelhantes aos obtidos em nosso trabalho, eles descreveram que mesmo frente a um alto nível de seleção aplicada, a diversidade genética total achada para os sintéticos permitirá que estes possam ser usados em novos ciclos de seleção recorrente recíproca.

A análise do polimorfismo para os *loci SSR* para cada ciclo de seleção da população de milho pipoca CMS-43 na presente investigação, mostrou que a heterozigosidade observada (H_0) variou de 20,67% para o ciclo C_{VIB} a 34,29% para o ciclo C_{III} . A heterozigosidade média observada para todos os ciclos de seleção avaliados foi menor que a heterozigosidade média esperada (H_e), e estas estão apresentadas no Quadro 7. Os valores menores para H_0 podem ser explicados pelo processo seletivo imposto a cada novo ciclo de seleção. Os métodos de seleção causam mudanças nas frequências alélicas, nos níveis e distribuições de variabilidade genética e conseqüentemente na estrutura genética de populações (Pinto et al., 2003). O valor da H_e verificado no ciclo C_0 (0,40) da população CMS-43 é mais alto que o valor da H_e no ciclo C_{VIB} que é de 0,34 (Quadro 7).

Quadro 7 - Estimativas de heterozigosidade média para os diferentes Ciclos de Seleção avaliados em milho pipoca. **N**: tamanho da amostra; **N(pl)**: número de *loci* polimórficos; **%P**: porcentagem de alelos polimórficos; **A**: número efetivo de alelos; **Ho**: heterozigosidade média observada e **He**: heterozigosidade média esperada de Nei

População	N	N(pl)	%P	A	Ho	He
C_0	15	19	95	2,55	0,3167	0,4062
C_I	7	16	80	2,15	0,2857	0,3786
C_{II}	7	17	85	2,15	0,2571	0,3939
C_{III}	7	19	95	2,35	0,3429	0,4112
C_{IV}	7	18	90	2,45	0,2500	0,4143
C_V	7	17	85	2,25	0,2500	0,3347
C_{VI}	7	18	95	2,20	0,2571	0,3082
C_{VIB}	15	19	90	2,30	0,2067	0,3402

Entretanto, os valores de H_e são variáveis a cada ciclo de seleção, indicando que não há tendência marcante para a redução dos valores de heterozigosidade média no decorrer da formação dos ciclos de seleção a partir da população do composto CMS-43. Os valores de H_0 e H_e , encontrados nos *loci SSR* para os ciclos $C_0 - C_{VIB}$ produzidos a partir do composto CMS-43 (Quadro 7)

merecem atenção, pois esta característica 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 e Luikart, 2007).

A manutenção da diversidade genética avaliada por meio da heterozigosidade média observada é uma evidência de que a domesticação e a seleção artificial para características morfológicas e agronômicas importantes no milho pipoca tem um efeito menor na diversidade genética nos *loci SSR*; tais evidências também foram apresentadas por Vigouroux et al. (2005).

Por outro lado, os parâmetros de diversidade genética apresentados no Quadro 8 apontam para uma deficiência global de heterozigotos resultante do processo de seleção recorrente (F_{IS}) nos sete ciclos de seleção do composto CMS-43; o valor global de F_{IS} é 0,2783 mas parece ser mais alto ou mais baixo dependendo do *locus SSR* considerado. A análise dos *loci Umc2245* ($F_{IS} = 0,9021$) e *Umc1737* ($F_{IS} = 1,0$) indica a fixação de homozigotos no decorrer dos ciclos de seleção. Dentre os 20 *loci SSR*, dois deles (*Umc2261* e *Umc1318*) apresentaram valores negativos de F_{IS} (coeficiente de endogamia). Os valores para os dois *loci Umc2261* e *Umc1318* foram de -0,0868 e -0,2745, respectivamente, indicando um excesso de heterozigotos mesmo frente aos processos de seleção recorrente. O excesso de heterozigotos foi verificado no *locus SSR* formado por repetições de trinucleotídeos (*Umc1318*; GTC) e no *locus SSR* formado por mais de três nucleotídeos (*Umc2261*; GAAGAG), entretanto, o déficit de heterozigotos ou excesso de homozigotos global (27,83%), resultante das polinizações nos sete ciclos de seleção parecem ser mais marcantes em *loci SSR* formados por repetições de dinucleotídeos (Quadro 8). O valor médio de F_{IS} nos 4 *loci SSR* formados por repetições de di-nucleotídeos (*Umc1083*, *Umc1063*, *Umc2343*, e *Umc1077*) corresponde a 0,4092 contrastando com os valores menores para F_{IS} nos demais *loci SSR* formados por repetições de tri-nucleotídios ($F_{IS} = 0,3298$) e por repetições com mais de três nucleotídeo ($F_{IS} = 0,2020$). Estas evidências conduzem a uma suspeita de que o processo de seleção estaria conduzindo, preferencialmente, os *loci SSR* formados por repetições de di-nucleotídeos para a homozigose. Tal suspeita poderá

ser testada analisando-se um número maior de *loci SSR* formados por repetições de di-nucleotídeos, nos ciclos de seleção do composto CMS-43. Este é um aspecto importante para ser investigado uma vez que os *loci SSR* formados por repetições de di-nucleotídeos têm sido relacionados como sendo os que apresentam alta taxa de mutações ($10^{-3} - 10^{-4}$) quando comparados com outros *loci SSR* formados por diferentes números de repetições (Vigouroux et al., 2005).

A análise da divergência genética entre as populações (F_{ST}), correspondentes aos sete ciclos de seleção, resultou num valor global igual a 0,1519 e mostrou que todos os 20 *loci SSR* apresentaram valores superiores a 0,05 (Quadro 8).

Quadro 8 - Parâmetros de diversidade genética para os *primers* avaliados nos 8 ciclos de seleção ($C_0 - CV_{IB}$) de milho pipoca **N**: Número de indivíduos amostrados; **F_{IS}**: Coeficiente de endogamia; **F_{IT}**: Déficit de heterozigotos; **F_{ST}**: Proporção da diversidade gênica entre os *primers* testados; **Nm** = Fluxo gênico estimado de $F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$

<i>Locus</i>	N	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	Nm
<i>Umc1354</i>	144	0,2289	0,3738	0,1879	1,0802
<i>Bnlg1083</i>	144	0,3592	0,4373	0,1219	1,8009
<i>Bnlg1063</i>	144	0,3776	0,4669	0,1435	1,4927
<i>Umc2245</i>	144	0,9021	0,9407	0,3946	0,3835
<i>Umc1292</i>	144	0,1182	0,2454	0,1443	1,4829
<i>Umc2261</i>	144	-0,0868	-0,0185	0,0628	3,7309
<i>Umc2343</i>	144	0,4996	0,5831	0,1667	1,2496
<i>Umc2115</i>	144	0,1460	0,2439	0,1146	1,9312
<i>Umc1071</i>	144	0,1707	0,3156	0,1747	1,1812
<i>Umc2116</i>	144	0,4552	0,4950	0,0730	3,1732
<i>Umc2262</i>	144	0,4523	0,5579	0,1928	1,0467
<i>Umc2237</i>	144	0,2805	0,3375	0,0793	2,9021
<i>Umc1336</i>	144	0,0348	0,1067	0,0744	3,1081
<i>Umc2226</i>	144	0,1268	0,1810	0,0621	3,7774
<i>Umc1245</i>	144	0,1471	0,2715	0,1459	1,4633
<i>Umc1318</i>	144	-0,2745	-0,1325	0,1114	1,9934
<i>Umc1077</i>	144	0,4005	0,4754	0,1248	1,7529
<i>Umc1737</i>	144	1,0000	1,0000	0,2314	0,8306
<i>Umc1906</i>	144	0,2073	0,2805	0,0923	2,4592
<i>Umc1656</i>	144	0,2184	0,3552	0,1751	1,1778
Total	144	0,2783	0,3879	0,1519	1,3954

O Quadro 8 mostra que 13 *loci SSR* (65%) apresentaram valores de F_{ST} no intervalo 0,05 – 0,15 que de acordo com Wright (1978), corresponde à diferenciação genética moderada entre as populações, e que 7 *loci SSR* (35%) apresentaram valores de F_{ST} no intervalo 0,15 – 0,25 ou maior que 0,25 indicando

alta diferenciação entre as populações. A maior proporção de diversidade gênica entre as populações (F_{ST}) foi encontrada para o *locus Umc2245* ($F_{ST} = 0,3946$). Em concordância com estes resultados, o fluxo gênico (Nm) entre as populações foi menor para o *locus Umc2245* (0,3835), e foi maior para o *locus Umc2226* (3,7774) (Quadro 8). Um reflexo da moderada e alta diferenciação imposta pela pressão de seleção sobre os *loci* de microssatélites pode ser vista por meio da avaliação da similaridade genética apresentada no Quadro 9. Neste quadro podemos observar a maior similaridade entre C_{IV} e C_V (0,9477) e a menor entre C_I e C_{VIB} (0,8143).

Quadro 9 - Matriz de identidade genética e distância genética de Nei (identidade genética de Nei sobre a diagonal e distância genética abaixo da diagonal). **POP:** população **ID:** identidade

POP/ID	C_0	C_I	C_{II}	C_{III}	C_{IV}	C_V	C_{VI}	C_{VIB}
C_0	*****	0,9188	0,9005	0,9039	0,9060	0,9400	0,9197	0,8864
C_I	0,0847	*****	0,8818	0,8865	0,9045	0,8815	0,8500	0,8143
C_{II}	0,1048	0,1258	*****	0,9403	0,8674	0,8780	0,8396	0,8785
C_{III}	0,1011	0,1205	0,0615	*****	0,9108	0,9192	0,9000	0,9077
C_{IV}	0,0988	0,1004	0,1423	0,0935	*****	0,9477	0,8763	0,8797
C_V	0,0618	0,1262	0,1301	0,0842	0,0537	*****	0,9538	0,9105
C_{VI}	0,0837	0,1626	0,1748	0,1053	0,1320	0,0473	*****	0,8996
C_{VIB}	0,1206	0,2055	0,1295	0,0968	0,1282	0,0937	0,1058	*****

Embora os valores para F_{ST} tenham sido correlacionados com o número de repetições de nucleotídeos nos *loci SSR* em populações de teosinte e de milho comum (Vigouroux et al., 2005), nos ciclos de seleção da população CMS-43 de milho pipoca não foi possível identificar valores maiores para F_{ST} nos *loci SSR* formados por di-nucleotídeos (Quadro 8). É possível que o número reduzido de *loci SSR* com di-nucleotídeos (apenas 4 *loci*) analisados nos ciclos de seleção do composto CMS-43 tenha conduzido a interpretação de que os valores de F_{ST} não são maiores nos *loci SSR* formados por di-nucleotídeos.

A despeito destas discordâncias quanto aos valores de F_{ST} e número de repetições de di-nucleotídeos nos *loci SSR* de milho comum, a observação de que há um nível alto de diferenciação ($F_{ST} = 0,1519$) entre as populações dos sete ciclos de seleção do composto CMS-43 indica que o processo de seleção recorrente para a

característica maior capacidade de expansão de grãos de milho pipoca, tem conduzido a diferenciação dos genótipos ao longo dos ciclos de seleção, sustentando uma proposta de que uma nova variedade possa ser caracterizada no ciclo C_{VI} , sem que tenha havido drástica redução no número de alelos por *locus SSR* e também nos valores de heterozigosidade média esperada. Em estudos prévios, Pereira et al. (2004) utilizaram isozimas para avaliar o comportamento da variabilidade genética durante 4 ciclos de seleção realizados para o composto de milho pipoca CMS-43, e concluíram que nenhuma mudança significativa para a variabilidade e distância genética foi detectada entre os 4 ciclos de seleção ($C_0 - C_{IV}$) para a população de milho pipoca CMS-43. No Ciclo C_{VIB} Pacheco et al. (2005) verificaram que houve incremento de 4,4% na produtividade e 4,3% no Índice de Capacidade de Expansão (ICE) do milho pipoca, o que indica benefícios tanto para os produtores quanto para consumidores, e lançaram no comércio em 20 de outubro de 2000, a variedade BRS Angela (Pacheco et al., 2005). O ciclo C_{VIB} de seleção é resultado da recombinação das quatro melhores progênies S1 selecionadas dentro das quatorze que originaram o Ciclo $_{VI}$; esta variedade apresentou desempenho semelhante ao híbrido simples IAC112 e superior ao híbrido triplo Zélia.

O emprego de marcadores moleculares tem sido frequentemente utilizado para identificar contaminantes, e para auxiliar na escolha dos genótipos que quando recombinados maximizam a heterose entre populações. Estas técnicas podem ser incluídas para monitorar os programas de seleção recorrente, principalmente quando estes programas apresentam como alvo o desenvolvimento de híbridos (Tardin et al., 2007).

Vários autores que têm analisado as mutações em *loci SSR* de milho, apresentaram evidências de diferentes taxas e tipos de mutações para estes *loci*, assim como também para as regiões “flanqueadoras” dos *loci* (Vigouroux et al., 2002, 2003; Lia et al., 2007). Os resultados mostram que microssatélites desenvolvidos para linhagens de milho temperado, podem ser utilizados para monitorar a variabilidade genética durante os ciclos de seleção e dar suporte para os programas de melhoramento de milho pipoca.

5. CONCLUSÕES

a) 21% dos *primers* de microssatélites desenvolvidos para milho comum tropical possibilitam o monitoramento da variabilidade genética durante os ciclos de seleção da população CMS-43 de milho pipoca, usando o programa de amplificação *Touchdown* PCR.

b) Apesar da grande pressão de seleção exercida para as características agrônômicas desejáveis em milho pipoca, nove *loci* SSR continuam comportando-se como se os cruzamentos estivessem ocorrendo casualmente (estão em equilíbrio de Hardy – Weinberg no último ciclo de seleção), indicando que ainda é possível que ocorra ganho de seleção efetuados em novos ciclos de seleção recorrente para o composto de milho pipoca CMS-43.

c) O processo de seleção recorrente para a característica maior capacidade de expansão de grãos de milho pipoca, produziu um alto nível de diferenciação entre as populações dos sete ciclos de seleção do composto CMS-43, sustentando a proposta de que uma nova variedade foi caracterizada no ciclo C_{VIB}, a variedade BRS Angela.

6. REFERÊNCIAS

- AGARWALL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Report**, 27:617–631, 2008.
- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, 132:1131-1139,1992.
- ALEXANDER, D.E.; CREECH, R.G. Breeding special industrial and nutritional types. **Corn improvement**. USA: Am. Soc. Agr., 1977. p. 336-386.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALLENDOR, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Massachusetts: Blackwell Publishing Maden, 2007. 642p.
- ANDRADE, R.A. **Cruzamentos dialélicos entre seis cultivares de milho-pipoca**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).
- ARRIEL, E.F.; RAMALHO, M.A.P.; PACHECO, C.A.P. Expected and realized gains in the CMS-39 maize population after three cycles of half-sib family selection. **Revista Brasileira de Genética**, 16:1013-1018, 1993.
- BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: Allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology**, 27:835-845, 1995.
- BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Towards unified approach to the genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites. **Biotechnology**, 8:930-932, 1990.
- BECKMANN, J.S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, 12:627-631, 1992.
- BELL, C.J.; ECKER, J.R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. **Genomics**, 19:137-144, 1994.
- BENSON, D.L.; HALLAUER, A.R. Inbreeding depression rates in maize populations before and after recurrent selection. **Journal Hereditas**, 85:122-128, 1994.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. 525p.

- CARENA, M.J. Maize commercial hybrids compared to improved population hybrids for grain yield and agronomic performance. **Euphytica**, 141:201-208, 2005.
- CHENG, L.; LIAO, X.; YU, X.; TONG, J. Development of EST-SSRs by an efficient FIASCO-based strategy: a case study in rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Animal Biotechnology**, 18:143-52, 2007.
- CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SHU, H.; SMITH, J.C.S. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, 39:866-873, 1996.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. **Genome**, 34:66-71, 1991.
- CREGAN, P.B.; BHAGWAT, A.A.; AKKAYA, M.S.; RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods of Molecular Cell Biology**, 5:49-61. 1994
- DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. (eds.). **Melhoramento genético de plantas**. Londrina:UEL, 1999. p. 85-102.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. (ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-475.
- DOERKSEN, T.K.; KANNENBERG, L.W.; LEE, E.A. Effect of recurrent selection on combining ability in maize breeding populations **Crop Science**, 43:1652-1658, 2003.
- 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.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-Cenargem, 1996. 220p.
- FLINT-GARCIA, S.A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annals and Review of Plant Biology**, 54:357-374, 2003.
- GALVÃO, J.C.C.; SAWAZAKI, E.; MIRANDA, G.V. Comportamento de híbridos de milho-pipoca em Coimbra. **Ceres**, 47:201-218, 2000.
- GAMA, E.E.G.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P.; OLIVEIRA, A.C.; GUIMARÃES, P.E.O.; SANTOS, M.X. Estabilidade da produção de germoplasma de milho avaliado em diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, 35:1143-1149, 2000.

- GARDNER, C.O. Na evaluation of effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. **Crop Science** Madison, 1:241-245, 1961.
- GOLDSTEIN, D.B.; RUIZ-LINARES, A.; CAVALI-SFORZA, L.L.; FELDMAN, M.W. Genetic absolute dating base don microsattellites and the origin of modern humans. **Procedures of National Academy Science**, 92:6723-6727, 1995.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.
- GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Microsattellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, 70:45-54, 2002.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Iowa: Iowa State University Press, 1988. 468p.
- HALLAUER, A.R.; SEARS, J.H. Changes in quantitative traits associated with inbreeding in a synthetic variety of maize. **Crop Science**, 13:327-330, 1973.
- HAMADA, H.; PETRINA, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Procedures of National Academy of Science**, 79:6465-6469, 1982.
- HEATH, D.D.; IWAMA, G.K.; DEVLIN, R.H. PCR rimed with VNTR core sequences yields species-specific patterns and hyper variable probes **Nucleic Acids Research**, 21:5782-5785, 1993.
- HEDRICH, K.; HARRIS, J.; KANN, M. Mutational analysis in early-onset parkinsonism (EOP) including gene dosage studies. **American Journal of Human Genetics**, 69:598-598, 2001.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico: D.F.: CIMMYT, 1994. 50p.
- HYRKAS, A.; CARENA, M.J. Response to long-term selection in early maturing maize synthetic varieties **Euphytica**, 143:43-49, 2005.
- JACOB, H.J.; LINDPAINTER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, YI-PEI.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, 67:213-224, 1991.

JOHANSSON, H.; SURGET-GROBA, Y.; THORPE, R.S. Microsatellite data show evidence for male-biased dispersal in the Caribbean lizard *Anolis roquet*. **Molecular Ecology**, 17:4425 – 4432, 2008. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&cmd=link&linkname=pubmed_pubmed&uid=19083789&ordinalpos=3:

KAHLER, A.L. Association between enzyme marker loci and agronomic traits in maize. In **Procedures of 40th Annual Corn and Sorghum** Washington, DC: Res. Conf. Am. Seed Trade Assoc., 1985. p. 66-89.

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

KUN-SHENG, W.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genomic and Genetics**, 241:225-235, 1993.

LABATE, J.A.; LAMKEY, K.R.; MITCHELL, S.H.; KRESOVICH, S.; SULIVAN, H.; SMICH, J.S.C. Molecular and historical aspects of Corn Belt dent diversity. **Crop Science**, 43:80 - 91, 2003.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates **Nucleic Acids Research**, 21:1111-1115, 1993.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology Evolution**, 4:203-221, 1987.

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

LIMA, M.; MIRANDA-FILHO, J.B.; GALLO, P.B. Inbreeding depression in brazilian populations of maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, 29:203-215, 1984.

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.)**. Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1983. 63 p. 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, K.J.; GOODMAN, M.; MUSE, S.; SMITH, J.S.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, 165:2117-2128, 2003.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. New York: CRC Press. 1998. 611p.

LÜBBERSTEDT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A.E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breed**, 117:447-450, 1998.

MACHUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G.; Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, 146:1071- 1086, 1997.

MaizeGDB. **Maize Genetic and Genomic Database**. Disponível em: <http://www.maizegdb.org/ssr.php>. Acessado em: 22/10/2008.

MANGOLIN, C.A.; DE SOUZA JUNIOR, C.L.; GARCIA, A.A.F. Mapping QTLs for kernel oil content in a tropical maize population **Euphytica**, 137:251-259, 2004.

MATSUOKA, Y.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; GOODMAN, M.; DOEBLEY, J. Microsatellites in Zea - variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**, 104:436-450, 2002.

MIAO, X.X.; LI, W.H.; LI, M.W.; ZHAO, Y.P.; GUO, X.R.; HUANG, Y.P. Inheritance and linkage analysis of co-dominant SSR markers on the Z chromosome of the silkworm (*Bombyx mori* L.). **Genetic Research**, 90:151-156, 2008.

MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C.A.; JAVIER HERNANDEZ, C.; SZEWC-MCFADDEN, A.K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi- automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, 37:617-624, 1997.

MORGANTE, M.; RAFALSKI, A.; BIDDLE, P.; TINGEY, S.; OLIVIERI, A.M. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. **Genome**, 37:763-769, 1994.

MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA microsatellites: Agents of Evolution? **Scientific American**, 1:72-77, 1999

- NEI, M.; FELDMAN, M.W. Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. **Theoretical Population Biology**, 3:460-465, 1972.
- OFORI, A.; BECKER, H.C.; KOPISCH-OBUCH, F.J. Effect of crop improvement on genetic diversity in oilseed Brassica rapa (turnip-rape) cultivars, detected by SSR markers. **Journal of Applied Genetics**, 49:207-212, 2008.
- PACHECO, C.A.P.; CASTOLDI, F.L.; ALVARENGA, E.M. Efeito do dano mecânico na qualidade fisiológica e na capacidade de expansão de sementes de milho pipoca. **Revista Brasileira de Sementes**, 18:267-270, 1996.
- PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.E.G.E.; GUIMARÃES, P.E.O.; SANTOS, M.X.; FERREIRA, A.S. Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e CMS-43 de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:1995-2001, 1998.
- PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.E.G.; PARENTONI, S.N.; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES, P. E. O. Avanços no processo seletivo da variedade de milho pipoca BRS Angela. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 4:436-444, 2005.
- PANAUD, O.; CHEN, X.; MCCOUCH, S.R. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome**, 38:1170-1176, 1995.
- PANAUD, O.; CHEN, X.; MCCOUCH, S.R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Genomic and Genetics**, 252:579-607, 1996.
- PARDO, B.G.; FERNÁNDEZ, C.; HERMIDA, M.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, A.; PÉREZ, M.; PRESA, P.; CALAZA, M.; ALVAREZ-DIOS, J.A.; COMESAÑA, A.S.; RAPOSO-GUILLÁN, J.; BOUZA, C.; MARTÍNEZ, P. Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Genome**, 50:329-332, 2007.
- PERERA, P.I.; PERERA, L.; HOCHER, V.; VERDEIL, J.L.; YAKANDAWALA, D.M.; WEERAKOON, L.K. Use of SSR markers to determine the anther-derived homozygous lines in coconut. **Plant Cell Report**, 27:1697-703, 2008.
- PEREIRA, L.K. **Avaliação de heterozigosidade entre ciclos de seleção recorrente em um composto de milho pipoca por meio de marcadores isoenzimáticos**. Universidade Estadual de Maringá, 2004. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).
- PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, 1:3-10, 2001.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA-JR.; 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, 2003.

POLLAK, L.M.; GARDNER, C.O.; PARKHURST, N. Relationships between enzyme marker loci and morphological traits in two mass selected maize populations. **Crop Science**, 24:1174-1179, 1984.

RIBAUT, J.M.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE-LEON, D.; EDMEADES, G.O.; HOISINGTON, D.A. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. **Theoretical and Applied Genetics**, 94:887-896, 1997.

RILEY, D.E.; KRIEGER, J.N. Embryonic nervous system genes predominate in searches for dinucleotide simple sequence repeats flanked by conserved sequences. **Gene**, 429:74-79, 2008.

ROCHA, D. **Cultivo comercial do milho pipoca ainda é limitado no Brasil**. Disponível em: <http://brasilatual.com.br/sistema/?p=822> Acessado em 29/02/2009.

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

RONGWEN, J.; AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; LAVI, U.; CREGAN, P.B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:43-48, 1995.

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

SCAPIM, C.A. Análise dialéctica e heterose de populações de milho-pipoca. **Bragantia**, 61:219-230, 2002.

SCAPIM, C.A.; BRACCINI, A.L.; PINTO, R.J.B.; AMARAL JÚNIOR, 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.

SCHLOTTERER, C.S.; HARR, B. *Drosophila virilis* Has Long and Highly Polymorphic Microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, 17:1641-1646, 2000.

SCHUG, M.D.; HUTTER, C.M.; WETTERSTRAND, K.A.; GAUDETTE, M.S.; MACKAY, T.F.C.; AQUADRO, C.F. The mutation rates of di- tri- and tetra-nucleotide in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, 15:1751-1760, 1998.

SENIOR, M.L.; HEUN, M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome**, 36:884-889, 1993.

SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, 36:1676-1683, 1996.

SHAGAI-MAROOF, M.A.; BIYASHEV, R.M.; YANG, G.P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R.W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and populations dynamics. **Proceedures of National Academy of Science**, 91:5466-5470, 1994.

SMITH, D.N.; DEVEY, M.E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. **Genome**, 37:977-983, 1994.

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

STEPHAN, W.; LANGLEY, C.H. Evolutionary consequences of DNA mismatch inhibited repair opportunity. **Genetics**, 136:333-341, 1992.

STUBER, C.; MOLL, R.H. Frequency changes of isozyme alleles in a selection experiment for grain yield in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, 12:337-340, 1972.

STUBER, C.W.; LINCOLN, S.E.; WOLFF, D.W.; HELENTJARIS, T. ; LANDER, E.S. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid form two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, 132:823-839. 1992.

TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBLE, M.W. RFPL mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Biotechnology**, 7:257-263, 1989.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, 39:277-287, 1996.

TARDIN, F.D.; PEREIRA, M.G.; GABRIEL, A.P.C. Selection index and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, 7:225-233, 2007.

- TAUTZ, D.; RENZ, M. simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes **Nucleic Acids Research**, 12:4127-4138, 1984.
- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). **Theoretical and Applied Genetics**, 86:985-990, 1993.
- TSILO, T.J.; CHAO, S.; JIN, Y.; ANDERSON, J.A. Identification and validation of SSR markers linked to the stem rust resistance gene Sr6 on the short arm of chromosome 2D in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 118:512-524, 2008.
- VIGOUROUX, Y.M.; McMULLEN, C.T.; HITTINGER, K.; HOUCHINS, L. Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication. **Proceedures of National Academy of Science**, 99:9650-9655, 2002.
- VIGOUROUX, Y.; MATSUOKA, Y.; DOEBLEY, J. Directional evolution for microsatellite size in maize. **Molecular Biology and Evolution**, 20:1480-1483, 2003.
- VIGOUROUX, Y.; MITCHELL, S.; MATSUOKA, Y.; HAMBLIN, M.; KRESOVICH, S.; SMITH, J. S.; JAQUETH, J.; DOEBLEY, J. An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. **Genetics**, 169:1617-1630, 2005.
- VOSMAN, B.; ARENS, P. Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. **Genome**, 40:25-33, 1997.
- WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, 44:388-396, 1989.
- WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II - Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Associates, Sunderland. 1996.
- WEISSENBAACH, J.; GYAPAY, G.; DIB, C.; VIGNAL, A.; MORISETTE, J.; MILLASSEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP, M. A second generation linkage map of the human genome. **Nature (London)**, 359:794-801, 1992.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- WU, K.; TANKSLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genomic and Genetics**, 241:225-235, 1993.

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

XU, H.X.; JING, T.; TOMOOKA, N.; KAGA, A.; ISEMURA, T.; VAUGHAN, D.A. Genetic diversity of the azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) gene pool as assessed by SSR markers. **Genome**, 51:728-38, 2008.

YANG, G.P.; SAGHAI MAROOF, M.A.; XU, C.G.; ZHANG, Q.; BIYASHEY, R. M. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of Rice. **Molecular Genomic and Genetics**, 245:187-194, 1994.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene Version 1.31**: Microsoft Window based freeware for population genetic analysis: Quick user guide. University of Albert, Center for International Forestry Research, 1999.

YU, Y.G.; SHAGAI MAROOF, M.A.; BUSS, G.R.; MAUGHAN, P.J.; TOLIN, S.A. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. **Phytopatology**, 84:60-64, 1994.

ZHANG, Q.F.; SHEN, B.Z.; DAÍ, X.K.; MEI, M.H.; SHAGAI MAROOF, M.A.; LI, Z.B. Using bulked extremes and recessive classes to map genes for photoperiod-sensitive genic sterility in rice. **Procedures of National Academy of Science**, 91:8675-8679, 1994.

ZHAO, X.; KOCHERT, G. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeat, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Genomic and Genetics**, 231:353-359, 1992.

ZHAO, X.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, 21:607-614, 1993.

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.713-717.