

IVONE BATISTA DE OLIVEIRA ELOI

**MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ANÁLISE DA
VARIABILIDADE GENÉTICA E DA ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE
MILHO PIPOCA (*Zea mays* L.)**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010

IVONE BATISTA DE OLIVEIRA ELOI

**MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A ANÁLISE DA
VARIABILIDADE GENÉTICA E DA ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE
MILHO PIPOCA (*Zea mays* L.)**

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

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010

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

E48m Eloi, Ivone Batista de Oliveira, 1984-
Marcadores microssatélites para a análise da
variabilidade genética e da estrutura de populações de
milho pipoca (*Zea mays* L.) / Ivone Batista de Oliveira
Eloi. -- Maringá, 2010.
64 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

Orientadora : Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Pires da
Silva Machado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, 2010.

1. Milho pipoca - Genética - Avaliação. 2. Milho
pipoca - Marcadores moleculares. 3. Milho pipoca -
Melhoramento genético. I. Machado, Maria de Fátima Pires
da Silva, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.
III. Título.

CDD 21.ed. 635.677

A meu esposo, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor e presença constante.

À minha família, ao meu esposo Nivaldo Eloi, aos meus pais Josias e Ivanilde e à minha irmã Josiele, pelo imenso amor e apoio.

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

À CAPES pelo apoio financeiro.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela amizade, pela confiança e pelo exemplo de profissionalismo.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, por sua sabedoria, pela paciência e auxílio constante no laboratório e por sua grande amizade e carinho.

À professora doutora Sandra de Oliveira Collet, pelo exemplo de vida e grande amizade.

À professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela co-orientação.

À Leila Frota e ao Sérgio Calvi, pela ajuda nos trabalhos técnicos de laboratório e pela amizade.

A todos os colegas de curso e de laboratório, pela contribuição e amizade.

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

BIOGRAFIA

Ivone Batista de Oliveira Eloi, filha de Josias Soares de Oliveira e Ivanilde Batista de Oliveira, nasceu em Maringá-Paraná no dia dezoito de maio de 1984.

Cursou o Ensino Fundamental na Escola Municipal Odette Alcântara Rosa, em Maringá-PR, e o Ensino Médio no Colégio Estadual Branca da Motta Fernandes, em Maringá-PR, concluindo-o em 2001.

Em 2007, concluiu a graduação em Ciências Biológicas, com Licenciatura Plena em Biologia, pela Universidade Estadual de Maringá, sendo bolsista de projetos de iniciação científica sob orientação da professora Dra. Maria de Fátima Pires da Silva.

Em 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, no Curso de Mestrado, orientada pela professora Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Origem do milho pipoca.....	3
2.2. Classificação botânica e características do milho pipoca.....	4
2.3. Melhoramento genético do milho pipoca.....	7
2.3.1. Heterose e diversidade genética.....	11
2.3.2. Marcadores moleculares	14
2.3.3. Marcadores SSR (<i>Simple Sequence Repeated</i> - Sequências Simples Repetidas) ou Microsatélites.	18
2.3.4. Variabilidade genética em milho pipoca	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Material genético	25
3.2. Germinação das sementes	26
3.3. Extração do DNA	26
3.4. Quantificação do DNA.....	28
3.5. Amplificação do DNA.....	29
3.6. Análise dos dados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMO

ELOI, Ivone Batista de Oliveira, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Marcadores microssatélites para a análise da variabilidade genética e da estrutura de populações de milho pipoca (*Zea mays L.*)**. Professora orientadora: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Professores conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

No presente estudo, foram utilizados marcadores SSR para avaliar a diversidade genética e a estrutura de população de variedades de milho pipoca do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá: Viçosa M-21, SE-013, IAC-112, Chile, UNB-2, Laranjeiras do Sul, Argentina, e Zélia. Foram testados 100 pares de primers SSR mapeados para milho comum, dos quais 41% foram polimórficos e 15 foram selecionados. Com estes primers, foram identificados 57 alelos e o número de alelos por loco nos genótipos variou de 2 a 5, com um número médio de 3,8 alelos/loco. No conjunto de todos os 8 genótipos, a proporção média de locos polimórficos foi de 76,66%. As variedades Viçosa M-21, Laranjeiras do Sul e UNB-2 apresentaram 100% de locos polimórficos e a variedade Laranjeiras do Sul apresentou maior nível de heterozigosidade esperada. Essas variedades podem ser recomendadas para cruzamentos com plantas que apresentem características agrônômicas desejáveis, no sentido de ampliar a base genética de genótipos de milho pipoca. Os primers UMC2281, UMC2115, UMC2116 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados, podendo, portanto, serem apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em variedades de polinização aberta de milho pipoca. A heterozigosidade média observada variou entre 0,2074 e 0,5667. As variedades UNB-02 e Laranjeiras do Sul apresentaram a maior proporção de plantas heterozigotas e, juntamente com as variedades com excesso de heterozigotos observados (IAC-112, Argentina, Zélia e UNB-02), podem ser consideradas como promissoras para seleção continuada de progênies.

Palavras-chave: Pipoca, *Zea mays L.*, SSR.

ABSTRACT

ELOI, Ivone Batista de Oliveira, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, february 2010. **Microsatellite markers for the analysis of genetic variability and population structure of maize popcorn (*Zea mays* L.)**. Advisers: Maria de Fátima Pires da Silva Machado. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Primers for SSR locos were employed in current research to evaluate genetic diversity and the structure of populations of popcorn varieties in the germoplasm of the State University of Maringá, Maringá PR Brazil, namely, Viçosa M-21, SE-013, IAC-112, Chile, UNB-2, Laranjeiras do Sul, Argentina and Zélia. One hundred pairs of SSR primers, mapped for common maize, were tested. It was found that 41% were polymorphs and 15 were selected. Fifty-seven alleles were identified from these primers, whereas the number of alleles per loco in the genotypes varied between 2 and 5, with 3.8 alleles/loco on an average. Mean proportion of polymorphic locos in a set of 8 genotypes reached 76.66%. Viçosa M-21, Laranjeiras do Sul and UNB-2 varieties had 100% polymorphic locos, whereas Laranjeiras do Sul variety had the highest heterozygosity level expected. These varieties may be recommended for cross-breeding with plants that have the desired agronomic characteristics so that the genetic base of popcorn maize genotype may be broadened. Primers UMC2281, UMC2115 and UMC2116 showed polymorphism in all analyzed genotypes. They may be indicated as effective and promising to detect polymorphisms in varieties of open pollenization of maize popcorn. Mean heterozygosity varied between 0.2074 and 0.5667. UNB-02 and Laranjeiras do Sul varieties constituted the highest proportion of heterozygous plants and, coupled to the variety with excess heterozygotes (IAC-112, Argentina, Zélia and UNB-02), may be promising for the continuous selection of progenies.

Key words: Popcorn; *Zea mays* L., SSR.

1. INTRODUÇÃO

O milho pipoca pertence à mesma espécie que o milho comum (*Zea mays* L.), mas o melhoramento de milho pipoca tem recebido uma atenção especial, particular, porque, segundo alguns autores (Ruffato et al., 2000; Miranda et al., 2003; Seifert et al., 2006), além das características agrônômicas envolvidas com o cultivo e a produção das plantas, que são consideradas para o melhoramento genético, há também o interesse na qualidade da pipoca, relacionada com a capacidade de expansão dos grãos de milho. No Brasil, em particular, o melhoramento de milho pipoca tem sido considerado um investimento importante (Galvão et al., 2000; Scapim et al., 2002), não somente para reduzir a importação de grãos, mas também para desenvolver novas variedades adaptadas às diferentes regiões do país.

De acordo com as informações de alguns autores (Scapim et al., 2006; Ricci et al., 2007; Rocha, 2009; Cruz e Pereira Filho, 2008), as dificuldades enfrentadas com o melhoramento de milho pipoca no Brasil vêm sendo gradativamente superadas nos últimos anos, pelos investimentos de poucos programas de melhoramento desenvolvidos em São Paulo (ESALQ), Rio Grande do Sul (UFRGS), Minas Gerais (UFV), Rio de Janeiro (UENF), Paraná (UEM, UEL), Centro Nacional de Milho e Sorgo da Embrapa (Rangel, 2006). Os trabalhos baseiam-se no melhoramento intrapopulacional e no desenvolvimento de híbridos de linhagens.

Num programa de melhoramento, o conhecimento do germoplasma disponível tem sido considerado como um dos requisitos mais importantes para qualquer cultura, porque o sucesso de um programa de melhoramento depende da indicação da população mais promissora para a extração de linhagens (Lima et al., 2000), assim como da escolha de linhagens divergentes para a formação de híbridos. Um banco de germoplasma geralmente é constituído de materiais genéticos melhorados e não melhorados, disponíveis para cruzamentos no sentido de obter as novas variedades melhoradas, e é importante conhecer as populações e variedades para o manejo correto e para alcançar o objetivo traçado. A

autofecundação de variedades, por exemplo, pode gerar linhagens destinadas à síntese de novas variedades de milho pipoca híbridas. Para Paterniani e Miranda Filho (1978), em populações melhoradas, existe a maior probabilidade de extração de linhagens superiores com a finalidade de obtenção de híbridos, da mesma forma que é possível supor que populações desconhecidas também tenham potencial para serem usadas para a extração de linhagens.

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

O número de investigações que procuram caracterizar a diversidade genética de milho pipoca no Brasil ainda pode ser considerado como restrito frente ao número de variedades em potencial disponíveis para serem usadas por programas de melhoramento. A proposta do presente estudo é analisar locos SSR em oito variedades de milho pipoca do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR), com o objetivo de: a) selecionar e relacionar os locos SSR promissores para estimativas de diversidade genética; b) estimar a diversidade genética dentro de variedades; e c) analisar a estrutura das populações promissoras para compor programas de melhoramento genético. Alguns dos locos SSR analisados foram mais informativos para analisar a diversidade genética em variedades de milho pipoca e as diferentes variedades apresentam níveis de heterozigosidade diferentes, formando populações geneticamente estruturadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem do milho pipoca

O milho pipoca (*Zea mays*) é um tipo de milho. Atualmente são conhecidos 5 principais tipos de milho: pipoca, duro, dentado, farináceo e doce (Peixoto, 2002). Segundo Zinsly e Machado (1987), a origem do milho pipoca confunde-se com a dos demais tipos de milho, pois o mais primitivo exemplar de milho, encontrado, em 1948, pelo antropólogo e botânico Herbert Dick Earle Smith, na "Bat Cave", centro-oeste do Novo México, datado com carbono em aproximadamente 2.500 a.C, era de milho do tipo pipoca.

Entretanto, a origem do milho ainda não é muito clara. Alguns pesquisadores acreditam que esse cereal teve origem na Ásia, enquanto outros acreditam que foi no México (Tavares, 1988). Paterniani e Campos (2005) consideram o milho como essencialmente americano, pois não existem relatos de fósseis, evidências escritas ou históricas sobre o milho em outros continentes.

Há evidências arqueológicas e moleculares (Ranere et al., 2009; Piperno et al., 2009) de que o milho foi domesticado a aproximadamente 9000 anos na floresta tropical sazonalmente seco do Banco Central das Balsas, divisor de águas no sudoeste do México, onde o ancestral selvagem do milho é nativo. Posteriormente, foi cultivado pelos astecas, maias e incas. A prática de aquecer e estourar o milho era mais comum entre as tribos da América do Sul, que da América do Norte (Zinly e Machado, 1987). O explorador espanhol Hernando Cortez, catalogou em seu diário de viagem ao México, em 1519, que os astecas usavam o milho estourado, ou *momochitl*, como decoração para cerimonial, para fazer coroas, colares e enfeites das estátuas de seus deuses.

Há indícios de que o milho foi observado pela primeira vez pelos europeus em 5 de novembro de 1492, quando Cristóvão Colombo desembarcou na costa norte da ilha de Cuba. Esse navegador levou grãos desse cereal em seu retorno à Espanha (Paterniani e Campos, 2005), passando a fazer parte da dieta dos europeus.

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

A origem genética do milho pipoca também é objeto de hipóteses. Erwin (1949) considera que este milho é originário de uma mutação do milho de endosperma duro (*flint*). Por outro lado, Ziegler e Ashman (1994) acham muito improvável tal origem, devido às evidências arqueológicas e ao caráter poligênico da “pipocabilidade” (potencial do grão para estourar quando aquecido). Outros autores mencionados por Mangelsdorf (1974) sugeriram que a origem foi a partir de hibridação intergenérica *Euchalena* x *Zea*. Ambas as hipóteses geram controvérsias, não sendo passíveis de aceitação. Segundo Zinly e Machado (1987), a evolução teria ocorrido no sentido do milho pipoca para os demais tipos de milho, mas apesar das incertezas das hipóteses, o milho pipoca teve um papel importante no desenvolvimento pré-histórico do milho, sendo sua participação essencial para seu desenvolvimento (Pereira, 2004) e na formação do patrimônio genético atual da espécie *Zea mays* (Zinly e Machado, 1987).

2.2. Classificação botânica e características do milho pipoca

O milho pipoca é uma monocotiledônea pertencente à família *Poaceae*, da tribo *Maydeae*, do gênero *Zea* e da espécie *mays* (*Zea mays* L., $2n=20$), assim como

o milho comum (Macedo, 2003; Pereira, 2004). De acordo com Kerr (1969), ambos têm o mesmo número de cromossomos ($n = 10$) e se cruzam dando produtos férteis. O fato de suas sementes estourarem sob ação de altas temperaturas é uma característica essencial que distingue o milho pipoca do milho comum, mesmo que ambos pertençam à mesma espécie (Zinly e Machado, 1987; Sawazaki, 2001a).

As plantas de milho pipoca são anuais, monóicas, apresentando flores masculinas dispostas em panículas apicais e flores femininas em espigas laterais, tratando-se de uma espécie alógama (Zinsly e Machado, 1987). Para Magalhães et al. (2002), o caráter monóico e sua morfologia característica é resultante da supressão, condensação e multiplicação de várias partes da anatomia básica das gramíneas.

Essas plantas são eretas e podem medir de um a quatro metros de altura. Apresentam um sistema radicular geralmente superficial que consiste de raízes primárias e laterais com extensão de um a três metros de comprimento.

O milho pipoca difere em algumas características em relação ao milho comum. Os colmos são cilíndricos, compactos e mais finos; as folhas geralmente são estreitas e eretas, dispostas aleatoriamente no colmo e em menor número; produzem espigas menores e numa posição mais alta, originando mais espigas por planta e tornando-a mais suscetível a acamamento e quebraimento do colmo; possui maior susceptibilidade às doenças como podridão do colmo, espigas e grãos (Zinly e Machado, 1987). Essas características tornam o milho pipoca uma planta mais susceptível que o milho comum e, portanto, possui menor produtividade de grãos (Zinly e Machado, 1987). Isto se deve ao fato de, em milho pipoca, a característica a ser selecionada é o grão e os caracteres agrônômicos são considerados de menor importância que os caracteres de qualidade da pipoca sofrendo menor pressão de seleção.

Provavelmente, a maior diferença seja a forma e o tamanho dos grãos, pois são menores e mais duros do que o milho comum e com maior proporção de endosperma duro em relação ao endosperma macio, características essenciais da pipoca (Zinsly e Machado, 1987; Ziegler e Ashman, 1994). Como o valor comercial do milho pipoca são os grãos, estes necessitam ainda de cuidados especiais na

colheita e secagem, para evitar danos ao pericarpo e endosperma (Sawazaki, 2001b).

Os grãos de pipoca podem apresentar variações quanto ao formato (redondo, chato e pontiagudo), tamanho e coloração (rosa, creme, vermelha, roxa, preta, azul), sendo que as cores branca e amarela são as mais comuns e os tipos com maior aceitação comercial são os redondos, tipo pérola e com endosperma amarelo a laranja (Zinly e Machado, 1987).

Segundo Zinsly e Machado (1987), a capacidade de expansão do milho pipoca é devida à resistência de seu pericarpo, associada à presença, no grão, de óleo e umidade. Quando aquecido, o amido do milho pipoca expande-se, aumentando gradualmente a pressão interna do grão até o momento da explosão, em temperatura de aproximadamente 180 °C (Silva et al., 1993). Nessa temperatura, o óleo e a umidade exercem pressão sobre o pericarpo até que este se rompe, expondo o endosperma (Zinsly e Machado, 1987).

Segundo Luz et al. (2005), para o mecanismo de estouro da pipoca é importante o milho possuir pericarpo íntegro, uma vez que é essa estrutura que suporta elevada pressão interna na semente até atingir uma temperatura apropriada para expansão da pipoca. Portanto, se o pericarpo estiver trincado ou rompido, a pressão ideal poderá não ser atingida e, conseqüentemente, a pipoca não se expandirá totalmente.

A qualidade da pipoca está associada a sua capacidade de expansão, sendo essa a principal característica nessa avaliação (Ruffato et al., 2000; Miranda et al., 2003; Seifert et al., 2006). A capacidade de expansão (CE) é calculada pela proporção entre o volume de pipoca obtido após o pipocamento dos grãos pelo volume de grãos utilizados (Ruffato et al., 2000).

Segundo Green Junior e Harris Junior (1960), de acordo com os padrões de qualidade norte americanos, genótipos de milho pipoca menor que 25 mL g⁻¹ é considerado pequeno; se a CE estiver entre 25 a 30, ele é considerado regular; valores entre 30 e 35 são considerados como bons; e acima de 35 como excelentes. De acordo com Pacheco et al. (1996), para que o milho pipoca seja comercializado, precisa ter, no mínimo, uma CE de 15 mL mL⁻¹.

A CE do milho pipoca depende de fatores genéticos e ambientais, como as condições de desenvolvimento em campo, colheita e pré-processamento (Ruffato et al., 2000). Dentre os fatores que afetam o “pipocamento” encontram-se a temperatura, teor de umidade (Alexander, 1988; Macedo, 2003), tamanho do grão (Sawazaki, 1996) além da presença ou não de danos mecânicos e idade fisiológica dos grãos (Jugenheimer, 1976).

A umidade encontrada nos grãos de milho pipoca é um dos principais fatores não genéticos que afetam a CE. A umidade relativa ideal dos grãos para uma CE máxima deve ser de aproximadamente 13,5% (Sawazaki, 2001b), mas, para Luz et al. (2005), a umidade necessária para a CE máxima depende da população.

O processo de secagem deve ser lento e em temperaturas abaixo de 35 °C, pois secagens rápidas e temperaturas altas proporcionam o trincamento dos grãos, prejudicando a expansão.

2.3. Melhoramento genético do milho pipoca

A pipoca é um alimento bastante apreciado pelos brasileiros. Leonello et al. (2009) afirmam que o consumo nacional de pipoca é de aproximadamente de 80 mil toneladas, das quais 20 mil toneladas são de grãos americanos, importados principalmente da Argentina.

A dependência dessa importação deve-se à baixa qualidade da pipoca disponível no mercado brasileiro, devido ao número limitado de genótipos acessíveis ao produtor e o cultivo comercial modesto quanto à área e tecnologia de produção (Freitas Júnior et al., 2006, Rangel et al., 2007, Rangel et al., 2008).

Desta forma, o produto nacional apresenta qualidade inferior ao importado, dificultando o desenvolvimento do seu comércio e o interesse produtivo no Brasil, apesar de que, para Seifert et al. (2006), há interesse dos produtores, mas um dos maiores problemas enfrentados por eles é a falta de opção devida à escassez, no mercado, de cultivares que reúnam boas características agrônômicas e um alto índice de expansão.

Segundo Sawazaki et al. (2003), os programas de melhoramentos de populações e híbridos em desenvolvimento nessa cultura, frequentemente, introduzem germoplasma norte americano de alta qualidade como estratégia para o aumento da CE do milho pipoca brasileiro.

Sawazaki et al. (2000) afirmaram que o Brasil não tem dado ao milho pipoca a mesma atenção que dá ao milho comum, e que o programa de melhoramento deste milho tem tido pequeno progresso, tanto em função do pequeno número de instituições e de melhoristas dedicados a ele. Este fato fica evidente quando se observa que, na safra 2006/2007, somente 7 dos 278 cultivares de milho disponíveis no mercado foram de milho pipoca (Zélia e Jade, ambos híbrido triplo; IAC-112, híbrido simples modificado; e RS-20, BRS Ângela e UFVM2-Barão-Viçosa, variedades de polinização aberta) (Freitas Júnior et al., 2006; Cruz e Pereira Filho, 2008), apesar do valor comercial do milho pipoca ser pelo menos duas vezes o valor comercial do milho comum (Sawazaki et al., 2003; Daros et al., 2004).

Apesar da existência de poucas cultivares brasileiras, o programa de melhoramento de milho pipoca no Brasil não é uma atividade recente. Ele iniciou-se em 1932 no Instituto Agrônomo de Campinas-IAC (Krug et al., 1943). De acordo com Sawazaki (2001a), a primeira variedade nacional foi liberada em 1947 e foi derivada de ciclos de seleção em massa originada a partir da população americana *South American Muschroom* (SAM). Somente em 1988, houve a liberação do híbrido simples modificado IAC-112 e quase simultaneamente a liberação do híbrido triplo Zélia que é comercializado pela *Pioneer* (Rangel et al., 2008).

Com o intuito de auto sustentar o mercado de pipoca brasileiro, desde 1990, o Brasil tem feito um lento progresso no setor pipoqueiro, mas a liberação de cultivares melhoradas de programas brasileiro ainda é escassa. Em 2001, somente sete cultivares de milho pipoca híbrido estavam registrados no SNPC (Serviço Nacional de Proteção aos Cultivares), sendo seis delas de acesso restrito aos produtores parceiros das empresas detentoras de sementes e a cultivar Zélia a única comercializada no Brasil e acessível a qualquer produtor (Sawazaki, 2001a).

Por outro lado, o mercado nacional vem passando por várias mudanças, principalmente no que diz respeito ao sistema de parceria entre produtores e empacotadoras e a importação de produto. Segundo Santos et al. (2007), o cultivo do milho pipoca por meio do sistema integrado entre empresas empacotadoras e produtores tem crescido no País. As empacotadoras selecionam a região onde querem produzir, fornecem as sementes e a tecnologia, favorecendo o aumento de produtividade e a redução nos custos de produção.

De acordo com informações das indústrias empacotadoras, a atual importação de grãos tem diminuído consideravelmente, devido principalmente, a produção em larga escala na safra 2004/05 do híbrido simples utilizado pela companhia Hikari, o IAC-112 (Rangel, et al., 2007); nessa ocasião a importação de milho pipoca diminuiu para 20 mil toneladas (Scapim et al., 2006). O híbrido triplo IAC-215 derivado do IAC-112, foi indexado em abril de 2006 e a BRS Angela, uma variedade obtida de polinização aberta a partir de seleção recorrente no composto CMS-43, lançada pela Embrapa Milho e Sorgo em 2000, também ajudou a diminuir a dependência da importação de milho pipoca (Ricci et al., 2007; Rocha, 2009).

A diminuição de importação de milho pipoca pelo Brasil tem ocorrido também em função do cultivo de híbridos Norte Americanos como: o P608, o P608 HT, o P618, o P621 e o P625, todos estes de uso restrito pelos produtores da companhia empacotadora Yoki Alimentos S.A. (Sawazaki, 2001a; Sawazaki et al., 2000; Freitas Junior et al., 2006). Na safra de 2006/2007 também foi liberado para o mercado de sementes pela *Pioneer* o híbrido triplo Jade (Cruz e Pereira Filho, 2008).

Assim, a cultura do milho pipoca está se expandindo no país. Segundo Rangel (2006), trabalhos vêm sendo desenvolvidos em São Paulo (ESALQ), Rio Grande do Sul (UFRGS), Minas Gerais (UFV), Rio de Janeiro (UENF) e Paraná (UEM, UEL), Instituto Agrônomo de Campinas e Centro Nacional de Milho e Sorgo da EMBRAPA. Os trabalhos baseiam-se no melhoramento intrapopulacional e no desenvolvimento de híbridos de linhagens.

A cultura do milho pipoca no Brasil vem recebendo ultimamente uma maior atenção de melhoristas e produtores em decorrência do aumento no consumo,

principalmente em razão da chegada do milho pipoca importado dos Estados Unidos para uso em microondas (Matta e Viana, 2001; Daros et al., 2004). Mas segundo Scapim et al. (2006), ainda existe a necessidade de que novos programas de melhoramento sejam iniciados, tanto por empresas públicas como privadas, pois considerando as dimensões continentais do Brasil, para Vilarinho et al. (2003), é indispensável um número relativamente grande de materiais selecionados para uma oferta de variedades e híbridos adaptados às diversas regiões do país e, para alcançar sucesso nestes investimentos, serão necessárias introduções de populações com alta variabilidade genética.

No melhoramento genético de milho pipoca, as principais características que buscam ser melhoradas 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 (Alexander e Greech, 1977).

Entretanto, no melhoramento de milho pipoca, existem algumas dificuldades adicionais no trabalho do melhorista quando comparado com o milho comum, pois, ao agricultor interessa produtividade elevada e bons caracteres agronômicos; e ao consumidor, interessa alta capacidade de expansão, que confere a pipoca melhor textura e maciez (Scapim et al., 2002).

Como a produtividade de grãos está inversamente correlacionada com a capacidade de expansão (Sawazaki, 1995; Coimbra et al., 2001; Miranda et al., 2003), isto dificulta o ganho de seleção simultâneo quanto às duas características no melhoramento populacional (Miranda et al., 2003). Isto dificulta a obtenção de cultivares que sejam agronomicamente superiores e com alta qualidade da pipoca. Ao melhorista cabe, então, a tarefa de “quebrar” essa correlação negativa, oferecendo um produto intermediário que satisfaça tanto produtores como consumidores (Zinsly e Machado, 1987).

Por outro lado, Andrade (1995) relatou que apesar das correlações negativas entre CE e produtividade, estas não são suficientemente significativas para impedir que se tenha “ganhos” positivos para CE e produtividade, quando se conduz a seleção baseada nesses dois caracteres. O melhoramento da pipoca brasileira já está

tendo algum progresso nesse sentido, pois 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 4.000 kg.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 estudos realizados em germoplasma tropical de milho pipoca, utilizando genética quantitativa clássica e análise estatística tradicional, indicaram que a capacidade de expansão é uma característica poligênica, condicionada por fatores genéticos de herança quantitativa, que possui uma distribuição normal. (Pereira, 2004; Zeigler, 2001; Li, 2007). As estimativas da herdabilidade da CE variam de 70% a 90% (Lira, 1983; Linares, 1987; Andrade, 1995; Pacheco et al., 1998; Pereira e Amaral Júnior, 2001), ampliando as possibilidades de obtenção de ganhos por meio da seleção (Alexander e Greech, 1977), apesar de que é difícil conhecer o efeito de cada alelo na expressão do caráter quantitativo, isto é, quanto cada alelo contribui para o fenótipo (Ramalho et al., 2004).

2.3.1. Heterose e diversidade genética

Todos os métodos de melhoramento aplicáveis ao milho comum podem ser utilizados para o milho pipoca; métodos intra e interpopulacionais, bem como os métodos de obtenção de híbridos (Zinsly e Machado, 1987). Desse modo, segundo Vilarinho et al. (2003), o melhoramento genético do milho pipoca possui duas alternativas que podem ser conduzidas de forma conjunta: a obtenção de populações melhoradas e a obtenção de híbridos. No primeiro caso, a utilização adequada de métodos de seleção possibilita o aumento gradativo da frequência dos alelos favoráveis na população melhorada, sendo esta superior à original. No segundo caso, a estratégia de melhoramento visa a obtenção de linhagens endogâmicas que, quando em combinações adequadas, produzirão híbridos superiores em relação às populações de origem dessas linhagens (Paterniani e Miranda Filho, 1978; Vilarinho et al., 2003).

A heterose ou vigor híbrido é o aumento do vigor, da altura de planta, do conteúdo de carboidratos, da produtividade e da intensidade de outros fenômenos fisiológicos, decorrentes do cruzamento entre indivíduos contrastantes. Dentro de um contexto acadêmico, o híbrido expressa heterose quando é superior aos seus genitores; e dentro do contexto comercial, o híbrido expressa heterose quando é superior ao melhor genitor (Borém e Miranda, 2005).

Muitos programas de melhoramento em milho são baseados no desenvolvimento e seleção de linhagens com o objetivo de produzir híbridos superiores (Shieh e Thseng, 2002), pois os híbridos de linhagens são comercialmente importantes (Hallauer et al., 1988).

A escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos são etapas fundamentais para o sucesso de um programa de melhoramento (Borém e Miranda, 2005).

O acesso a diferentes germoplasmas tem sido apresentado como base para extrair linhagens e conhecer o germoplasma disponível é um dos requisitos mais importantes para o melhoramento de qualquer cultura, pois o sucesso de um programa de melhoramento depende da indicação da população mais promissora para a extração de linhagens (Lima et al., 2000). Este germoplasma pode ser constituído de materiais genéticos não melhorados, contidos em bancos de germoplasmas, e também de materiais genéticos melhorados, disponíveis principalmente em instituições públicas. Portanto, é importante conhecer as populações e variedades de populações livres e também os materiais comerciais, pois a autofecundação de cultivares híbridas pode gerar linhagens destinadas à síntese de novas variedades de milho pipoca híbrido (Silva, 2009). Para Patterniani e Miranda Filho (1987), em populações melhoradas, existe a maior probabilidade de extração de linhagens superiores com a finalidade de obtenção de híbridos.

Entretanto, para a escolha dos genitores, é de fundamental importância a predição da heterose. Desenvolver e selecionar linhagens com base na performance "per se" não é um processo muito difícil, mas bastante demorado (Shieh e Thseng, 2002).

Os métodos de cruzamentos dialélicos são muito usados para predição de médias e um melhor conhecimento sobre a capacidade de combinação de genótipos de milho (Hallauer et al., 1988), mas, nesses cruzamentos, com o desenvolvimento de n linhagens, é possível formar $n*(n-1)/2$ híbridos simples, que serão avaliados em diversos experimentos e em vários ambientes. Entretanto, com um número considerável de linhagens, o processo fica caro e trabalhoso (Smith, 1986; Hallauer et al., 1988).

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

Segundo Miranda et al. (2003), a divergência genética pode estar associada à heterose. Assim, as análises dessa divergência genética podem ser úteis para a predição preliminar dos cruzamentos que otimizem a heterose.

Como o mecanismo genético da heterose ainda não está bem entendido, os estudos revelam que cruzamentos entre genótipos geneticamente divergentes proporcionam grande vigor em relação àqueles cruzamentos entre indivíduos semelhantes geneticamente (Hallauer, 1999). Tal fato decorre porque a heterose e a capacidade específica de combinação entre dois parentais dependem da existência de dominância no controle do caráter e da presença de dissimilaridade entre os genótipos (Falconer e Mackay, 1996).

De maneira geral, a divergência genética pode ser conceituada como quaisquer diferenças entre espécies ou indivíduos dentro da espécie. Portanto, o conhecimento da divergência genética entre um grupo de parentais é importante no melhoramento, sobretudo para identificar combinações híbridas de maior heterozigose e de maior efeito heterótico (Carvalho et al., 2003).

Conforme Retuci (2003), os genitores para melhores combinações híbridas são estabelecidos, formando-se grupos heteróticos. Lee (1995) definiu grupo heterótico como uma coleção de germoplasma que, quando cruzada com

germoplasmas externos, geralmente de outro grupo heterótico, tende a exibir maior grau de heterose do que se fosse cruzada com alguma planta do próprio grupo.

Desse modo, para Eckert (2006), os estudos sobre divergência genética têm sido de grande importância em programas de melhoramento envolvendo hibridações, pois podem ser usadas para selecionar genitores potencialmente promissores para gerar populações com elevada variabilidade e adaptação, que, quando cruzados, aumentam as probabilidades de recuperarem genótipos superiores nas gerações segregantes, permitindo aos melhoristas concentrarem seus esforços em um menor número de combinações híbridas (Fuzatto et al., 2002), ou seja, entre os materiais mais divergentes (Rinaldi et al., 2007).

A determinação da distância genética entre os parentais tem sido feita por meio do uso de marcadores moleculares. Este procedimento tem sido usado como uma importante ferramenta para prever o vigor do híbrido a partir de cruzamentos simples (Shieh e Thseng, 2002). Em particular, os polimorfismos baseados nos segmentos de DNA são poderosas ferramentas usadas para avaliar a similaridade genética entre os estoques de linhagens (Lee, 1995).

No contexto de diversidade genética, os dados obtidos experimentalmente são utilizados para estimar parâmetros genéticos. Em geral, as estimativas de diversidade genética em uma amostra populacional baseiam-se em dois níveis de variação: no número de alelos dos locos analisados e a na frequência desses alelos na população. Com base nessas estimativas, diferentes parâmetros podem ser calculados, possibilitando uma maior compreensão da diversidade de uma população ou populações (Ferreira, 2006).

2.3.2. Marcadores moleculares

De acordo com as considerações de Guimarães e Moreira (1999), os estudos da diversidade genética de plantas vêm cada vez mais auxiliando no melhoramento genético, pois estimar essa variabilidade é a base para os cruzamentos em programas de melhoramento. Inicialmente, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos. Esse marcador é determinado por mutações simples em um gene particular, gerando alterações

fenotípicas de fácil identificação no organismo. No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações restringiram sua utilização. Mesmo com limitações, os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica.

Com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, os estudos morfológicos foram complementados. O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene, ou por alelos diferentes, codificando cada uma das enzimas (Moss, 1982). Nos últimos 25 anos, inúmeras investigações têm feito uso dessa técnica para estimar os níveis e entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A partir da descoberta da estrutura do DNA por Francis Crick e James Watson em 1953, o foco dos estudos passou a ser o DNA. Com descobertas importantes, como das enzimas de restrição e da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), descoberta na década de 80 por Kary Mullis, foi possível o desenvolvimento e o avanço das técnicas de Biologia Molecular, tornando possível uma maior manipulação do DNA, e culminando com o surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares.

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

Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos, por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos

distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e também por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse (Guimarães e Moreira, 1999).

Os marcadores moleculares têm grandemente contribuído para o atual nível de conhecimentos sobre a estrutura genética de várias espécies cultivadas e silvestres. Vários marcadores têm sido utilizados, tanto os baseados em hibridação como os revelados por amplificação. O sucesso destes é devido a um amplo acesso ao genoma do organismo estudado, de maneira rápida e eficiente (Kumar, 1999).

Os marcadores baseados em hibridação são o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein et al., 1980), que utilizam fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição; e os marcadores minissatélites, também conhecidos como VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) (Jeffreys et al., 1985).

Os marcadores revelados por amplificação, baseados em reações em cadeia de amplificações de segmentos de DNA usando enzimas polimerases, denominada de PCR (Polymerase Chain Reaction) são: o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990), em que o polimorfismo de seqüências de DNA são amplificadas com primers aleatórios; SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) (Paran & Michelmore, 1993); SSR (Simple Sequence Repeats, mais tarde denominadas microssatélites) (Tautz, 1989 e Litt e Luty, 1989), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et al., 1995), em que os fragmentos genômicos são produzidos por enzimas de restrição e; SNP (International SNP Map Working Group, 2001), baseados em polimorfismos em único nucleotídeo.

Os vários tipos de marcadores moleculares atualmente disponíveis diferenciam-se pela tecnologia usada para demonstrar a variabilidade no DNA por meio do polimorfismo molecular, expressão genética, distribuição no genoma, custo e operação do trabalho (Griffiths et al., 2000).

Demeke et al. (1997) sugerem que o uso combinado de diferentes marcadores pode fornecer melhores informações do que quando um só tipo de

marcador é utilizado, uma vez que alguns dos problemas apresentados por um marcador podem ser superados pelo uso de outros.

Os marcadores moleculares têm sido extensivamente utilizados com sucesso em estudos de ecologia, evolução, taxonomia, filogenia e estudos genéticos em plantas (Agarwall et al., 2008), também na caracterização da variabilidade que existe entre os indivíduos (Borém e Miranda, 2005; Beckmann et al., 2006). Segundo Melchinger (1999), também pode monitorar a diversidade genética entre cultivares melhoradas em uso e em coleções de germoplasma. 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).

Os marcadores moleculares auxiliam beneficentemente de modo a complementar o melhoramento, ou seja, pode fornecer dados confiáveis sobre a diversidade genética que poderá ser utilizada para a determinação do grau de parentesco entre linhagens e variedades (Borém e Miranda, 2005). Segundo Sereafini et al. (2001), os marcadores de DNA podem contribuir de forma indireta auxiliando também na predição do desempenho dos híbridos, uma vez que permitem a obtenção de estimativas de distância genética, estimativas estas que são muito importantes, por meio da suposição de que uma maior dissimilaridade entre as linhagens, do ponto de vista molecular, corresponde a uma maior probabilidade de geração de híbridos superiores. Melchinger (1999) afirmou que numerosos estudos experimentais demonstraram que os marcadores moleculares são eficientes para caracterizar grupos heteróticos, identificar novos grupos heteróticos de maneira sistemática, relacionar linhagens de procedência desconhecida com os grupos heteróticos.

Os avanços mais recentes das técnicas moleculares, juntamente com a bioinformática e a genética quantitativa, têm contribuído para o atual nível de conhecimentos sobre a estrutura genética de várias espécies. Atualmente, estão disponíveis mapas genéticos saturados para a maioria das espécies vegetais, além do desenvolvimento de metodologias cada vez mais precisas voltadas à análise de locos gênicos associados a caracteres quantitativos (QTLs). A aplicação dessas

metodologias para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem implicado grandes avanços no desenvolvimento de variedades (Borém e Miranda, 2005), com conseqüentes avanços para a agricultura (Ferreira e Gratapaglia, 1996).

2.3.3. Marcadores SSR (*Simple Sequence Repeated* - Sequências Simples Repetidas) ou Microssatélites.

Os microssatélites são regiões repetidas do DNA composta de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em *tandem* (em seqüência), nos genomas de eucariotos e procariotos (Field e Wills, 1998; Litt e Luty, 1989; Toth et al., 2000). Essas repetições são chamadas motivos e são distribuídas aleatoriamente através do genoma (Jacob et al., 1991; Agarwall et al., 2008), pois há diferenças em suas freqüências dentro do códon e das seqüências do anticódon (Arcot et al., 1995, Wilder e Hollocher, 2001).

A região microssatélite é classificada de acordo com o tipo de seqüência de repetição, como imperfeito, interrompido ou composto. Em um microssatélite perfeito a seqüência de repetição não é interrompida por nenhuma base que não pertence a esta repetição (por exemplo, TATATATATATATATA). Por outro lado, se houver um par de bases diferente entre as repetições, este é um microssatélite imperfeito (por exemplo, TATATATACTATATA). No exemplo de um microssatélite interrompido, há uma seqüência pequena dentro de uma seqüência repetida, diferente da seqüência original (por exemplo, TATATACCGTGTTATATATATA). No microssatélite composto, a seqüência contém duas seqüências repetidas distintas (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGTGT). As seqüências mais abundantes são os dinucleotídeos (repetições de 2 pares de bases) (Borém e Caixeta, 2006).

As regiões repetidas do DNA sofrem elevadas taxas de mutações em todos os genomas. Assim o estudo dessas regiões é usado como um marcador molecular, que detecta variabilidade nos indivíduos em nível de DNA (Jarne e Lagoda, 1996). Esse marcador foi desenvolvido simultaneamente por Litt e Luty (1989) e por Weber e May (1989) e é chamado microssatélite, ou seqüências simples repetidas

(SSR) ou repetições curtas em tandem (STR). Os microssatélites ocorrem freqüentemente e casualmente (ou aleatoriamente) em todo o DNA de eucarionte examinado (Beckmann e Soller, 1990), representando uma vasta fonte de marcadores altamente informativos (Zhao e Kochert, 1992; 1993).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas (Schlotterer, 2000) e são utilizadas para construir as seqüências de primers (20 a 30 bases) para serem usados para a amplificação dessa região usando a PCR. Essa região, independente do motivo repetido, constitui um loco microssatélite.

Quando um par de primers construído especificamente para as regiões flanqueadoras é utilizado para amplificar o loco SSR em vários genótipos, este poderá revelar polimorfismo no referido loco. 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). Por exemplo, um segmento pode conter 9 repetições e o outro 10. 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 loco (Gupta et al., 1996).

Um indivíduo pode ser homozigoto para um loco microssatélite, se este tiver o mesmo alelo em ambos os cromossomos homólogos, e pode ser heterozigoto se possuir alelos diferentes. Entretanto, no mesmo loco, a população ao todo contém geralmente diversos alelos, cada um com um número diferente de repetições. Isso significa que os marcadores de microssatélite são muito úteis para discriminar indivíduos diferentes (Borém e Caixeta, 2006).

As diferenças no tamanho dos microssatélites são atribuídas à variação no número de unidades de repetição em um loco de SSR em particular. A taxa de mutação é 10.000 vezes mais provável para 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 anemia falciforme. Entretanto, 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 da recombinação (*crossing-over* desigual), no reparo do DNA, ou no deslizamento da polimerase durante a replicação do DNA (Strand *et al.*, 1993), pois ela pode adicionar ou deletar uma ou mais cópias da repetição na nova seqüência de DNA, em um processo conhecido como *slippage* (Tautz *et al.*, 1986).

A variação no número de repetições de nucleotídeos da seqüência em *tandem* em um loco 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).

Os estudos realizados indicaram que os tipos de motivos de repetições são abundantes e o grau de polimorfismo pode variar de uma espécie para a outra. Nas plantas, a freqüência de microssatélites é estimada em 0,5% em *Arabidopsis* e 0,37% em *Zea mays*. No cromossomo 22 do *Homo sapiens* a freqüência de microssatélites é de 1,07%; no genoma inteiro do *Caenorhabditis elegans* é de somente 0,21% (Tóth *et al.*, 2000).

As espécies de plantas autóгамas, em particular, apresentam uma deficiência no número de locos 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). Isso é devido à expressão co-dominante e o multialelismo dos marcadores SSRs, que os faz ser considerados como os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), pois os SSRs são muito freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Desse modo, 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 microssatélites têm sido extensivamente usados, pois eles são abundantes, uniformemente distribuídos, altamente polimórficos, co-dominantes, proporcionam rápida obtenção de resultados por PCR, são relativamente simples para interpretar. Trata-se de é um marcador facilmente acessado por outros laboratórios, pois as seqüências de primers estão disponíveis na literatura

especializada (Shagai-Marroof et al., 1994). Outra vantagem dos microssatélites é que eles requerem uma pequena quantidade e baixa qualidade de DNA (Kun-Sheng e Tanksley, 1993; Schlötterer, 2000), e o mesmo pode ser extraído de qualquer material biológico, sementes ou plântulas em diferentes fases do desenvolvimento, permitindo, por exemplo, uma avaliação precoce e eficiente de lotes de sementes (Padilha et al., 2003).

Padilha et al. (2003) registram que a adaptação e a incorporação de tecnologia de marcadores microssatélites às atividades de programa de melhoramento é uma estratégia precisa e eficiente.

Os marcadores baseados em microssatélites são desenvolvidos para estudos genéticos de várias culturas (Ferreira e Grattapaglia, 1996), pois são ideais para o mapeamento genético e físico de genomas. Eles são eficientes na identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Além disso, devido as suas características de multialelismo e co-dominância, os marcadores SSR são úteis para detectar heterozigosidade de um loco específico e, portanto, são os mais indicados para o monitoramento da pureza genética das linhagens elite e das sementes híbridas de milho e do nível de endogamia dos materiais elites utilizados em programas de melhoramento genético (Padilha, 2002). Por meio dele, o melhorista terá acesso às informações sobre variabilidade genética, advinda diretamente do DNA, o que permite um grande diferencial na seleção das plantas que serão utilizadas como fonte genética.

Segundo Ribaut et al. (1997), a seleção assistida por meio de microssatélites na escolha de genótipos para cruzamentos de plantas, facilita a seleção de uma grande população segregante para uma característica desejável. Essa técnica é rápida e reproduzível, podendo ser utilizada de forma mais eficiente e com menos custo do que nas formas tradicionais (Ribaut et al., 1997).

Os microssatélites também podem ser usados durante o processo de introgressão de genes. Neste programa, o híbrido F_1 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 usando os microssatélites como marcadores moleculares dos genótipos (Gupta et al., 1996).

Outra característica importante deste marcador é que ele é herdado de forma Mendeliana. Assim é um dos marcadores mais promissores para análise de ligação, e devido à sua hipervariabilidade, ele é um importante marcador para o mapeamento genético, tanto de monogenes como de locos para caracteres quantitativos (*Quantitative Trait Loci*; QTLs), sendo altamente eficientes em espécies com pouco polimorfismo intraespecífico, como é o caso da maioria das espécies autógamas (Röder et al., 1995).

A maior limitação do método de análise dos locos SSR é a obtenção dos primers específicos que flanqueiam as repetições. Para a obtenção destes primers, há a necessidade do desenvolvimento prévio desses marcadores que requer infraestrutura especializada de laboratório, pois é necessário construção de bibliotecas genômicas, seqüenciamento de DNA em larga escala, grande quantidade de trabalho envolvendo pessoal especializado, aliado ao alto custo de um empreendimento desta natureza (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Chin et al., 1996). No entanto, uma vez obtidos os primers informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica.

2.3.4. Variabilidade genética em milho pipoca

Os estudos da diversidade genética de plantas vêm cada vez mais auxiliando no melhoramento genético, pois estimar essa variabilidade é a base para os cruzamentos em programas de melhoramento (Guimarães e Moreira, 1999).

Para o estudo de diversidade genética, os dados obtidos experimentalmente são utilizados para estimar parâmetros genéticos baseados nas variações do número de alelos dos locos analisados e a frequência desses alelos na população. Esses parâmetros possibilitam uma maior compreensão da diversidade de uma população ou populações (Ferreira, 2006). Os parâmetros genéticos mais utilizados são: heterozigosidade média observada (H_o) e a esperada de Nei (H_e), número de alelos por locos, número médio de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e),

porcentagem de alelos polimórficos, coeficiente de endogamia (F_{IT}) e déficit de heterozigotos (F_{IS}).

Os marcadores moleculares são hoje amplamente utilizados para estudo de variabilidade genética, eles apresentam potencial de facilitar o monitoramento de materiais como linhagens e cultivares, utilizadas em programas de melhoramento com o objetivo de ampliação da base genética (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A expressão co-dominante, multialelismo, alta frequência e distribuição ao acaso dos microssatélites, tornam este marcador ideal para o mapeamento genético e físico de genomas, utilizando-os para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia; 1996). Além disso, os marcadores SSR são úteis para detectar heterozigosidade de um loco específico, que é importante para o acompanhamento do nível de endogamia dos materiais elites utilizados em programas de melhoramento genético (Padilha, 2002). Por meio dele, o melhorista terá acesso às informações sobre variabilidade genética, advinda diretamente do DNA, o que permite um grande diferencial na seleção das plantas que serão utilizadas como fonte genética.

A técnica de análise de locos microssatélites tem sido aplicada para estimar a divergência genética entre linhagens de milho pipoca (Liu et al., 2003; Dandolini et al., 2008) ou entre genótipos de diferentes origens (Wu et al., 2004; Silva et al., 2009). Liu et al. (2003) encontraram 54% de locos polimórficos e 2,5 alelos/locos em 7 linhagens de milho pipoca. Dandolini et al. (2008) registraram 50% de polimorfismo e 3,35 alelos/locos em 10 linhagens de milho pipoca analisando 14 locos SSR, e as distâncias genéticas entre as linhagens variaram de 0.2092 a 0.8495. Li et al. (2004) encontraram 2,7 alelos/locos em 56 linhagens de milho pipoca, analisando 113 locos SSR e as distâncias genéticas entre as linhagens variaram de 0,1247 a 0,7295. Wu et al. (2004) encontraram 5,4 alelos/locos em raças de pipoca com 61 primers SSR. Silva et al. (2009) registraram 4,34 alelos/locos em 23 populações de milho pipoca utilizando de 23 locos SSR.

As referidas investigações têm caracterizado a proporção de locos SSR polimórficos, o número de alelos por loco polimórfico e as distâncias genéticas

(dissimilaridade) entre os genótipos analisados, mas não tem registrado a heterozigosidade observada e esperada dentro de cada população analisada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

O material genético utilizado para analisar a diversidade genética de milho foi proveniente do Programa de Melhoramento de Milho Pipoca do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá. Para esse estudo, foram utilizados 8 genótipos, relacionados no quadro 1.

Quadro 1 - Genótipos de milho pipoca avaliados

Genótipos	Caracterização genética
Zélia	Híbrido triplo
Viçosa M-21	Variedade de polinização aberta
IAC-112	Híbrido simples modificado
Argentina	-
Chile	-
UNB-2	Variedade de polinização aberta
SE-013	Variedade de polinização aberta
Laranjeiras do Sul	Variedade de polinização aberta

O genótipo Zélia é um híbrido triplo desenvolvido pela empresa DuPont do Brasil S.A. – Divisão Pioneer Sementes, a partir de mesclas entre germoplasma temperado e germoplasma tropical.

O genótipo Viçosa M-21 é uma variedade de polinização livre desenvolvida pela Universidade Federal de Viçosa (MG), com base em cruzamentos entre populações locais e híbridos norte-americanos.

O genótipo IAC-112 é um híbrido simples modificado, desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas, oriundo de combinação de linhagens da variedade SAM com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani e Viçosa Amarelo.

O genótipo Argentina é originário desse país, tendo, porém, genealogia desconhecida.

O genótipo Chile é um material de genealogia desconhecida.

O genótipo UNB-2 é uma variedade de polinização aberta originado de seleção praticada no Composto Indígena da ESALQ/USP (Piracicaba, SP). Este composto foi doado à Universidade Nacional de Brasília (DF), dando origem à UNB-1. Esta, por sua vez, foi cruzada com uma população de milho pipoca americana, cujas progênes selecionadas foram cruzadas com uma população de milho pipoca de grãos amarelos e resistentes a *Exserohilum turcicum*. Após dois ciclos de seleção massal, foi obtida uma população formada por plantas resistentes, com alta produção e com grãos amarelos. Tal população foi retrocruzada por três vezes com a americana, originando a UNB-2.

O genótipo SE-013 representa a geração avançada de um híbrido americano não identificado.

A variedade Laranjeiras do Sul foi obtida junto aos produtores, sendo proveniente de Taiwan (República da China).

3.2. Germinação das sementes

Cerca de 80 sementes, 10 sementes de cada um dos 8 genótipos de milho pipoca (Viçosa M-21, SE-013, IAC-112, Chile, UNB-2, Laranjeiras do Sul, Argentina e Zélia) foram germinadas individualmente em balaios de plástico contendo terra e mantidos a temperatura ambiente.

Para a extração de DNA utilizados na avaliação da variabilidade e distância genética foram coletadas folhas jovens de aproximadamente 15 dias de 8 a 9 plantas de cada genótipo, totalizando 69 amostras.

3.3. Extração do DNA

Para a análise individual das amostras, o DNA genômico foi extraído individualmente de cada planta de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com modificações, que consistiram em adicionar menor volume de tampão de extração contendo CTAB e de solução clorofórmio: álcool isoamílico (de 1mL para 800 µL) devido a um menor volume de sobrenadante

recuperado; substituição de octanol por álcool isoamílico na purificação com clorofórmio: álcool isoamílico; acréscimo de duas purificações com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), ao invés de uma só, como descrito no protocolo original; acréscimo de duas precipitações do DNA com isopropanol (uma sem sal, após a primeira etapa de purificação e a outra com sal, após a segunda etapa de purificação); adição de menor volume de RNase (de 10µL para 2µL), devido ao menor volume de sobrenadante recuperado; acréscimo de uma purificação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1); acréscimo de duas lavagens com etanol 70% ao invés de uma só.

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

A extração foi realizada em tubos de microcentrífuga (2 mL), contendo aproximadamente 300 mg de tecido vegetal previamente pulverizado com nitrogênio líquido e 800 µL de tampão de extração CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 0,5M pH 8,0; CTAB 1% e 140 mM de β-mercaptoetanol), previamente preparado. Os tubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria com 65°C durante 1h, realizando-se agitações suaves a cada 5 minutos. Após serem removidos do banho, quando atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1, com inversão suave durante 5 minutos para homegeinização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos com 13.000 rpm em temperatura ambiente. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com agitação suave durante 5 minutos. Após uma nova centrifugação com 13.000 rpm durante 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante coletado foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Para precipitar o DNA, foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol gelado por volume de sobrenadante recuperado, misturando-se levemente por inversão por 1 minuto. As amostras foram mantidas por 12 horas em -20 °C para uma melhor precipitação.

Após a etapa descrita acima, efetuou-se uma centrifugação usando 13.000 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante,

foram adicionados 800 μ L de etanol 70% gelado, misturando-se levemente por inversão por 1 minuto, seguindo-se uma nova centrifugação com 13.000 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, foi feita a secagem do *pellet* de DNA em temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 400 μ L de TE (Tris/HCl 100 mM e EDTA 50 mM pH 8,0), mantendo-se o material por 12 horas em 4 °C.

Após 24 horas, foram adicionados 2 μ L de RNase na concentração de 10 ng/ μ L e a mistura foi mantida na temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, o DNA foi purificado com 200 μ L de fenol mais 200 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), realizando-se agitação durante 5 minutos e centrifugando com 13.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo limpo, foi adicionando 400 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo-se uma agitação durante 5 minutos e centrifugando-se com 13.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 250 μ L de isopropanol e 25 μ L de NaCl 5M, os quais foram misturados por inversões suaves por 1 minuto, mantendo-se essa mistura *over-night* em -20 °C.

Após o período acima descrito, foi realizada uma centrifugação com 13.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 μ L de etanol 70% gelado, misturando-se por inversão por 1 minuto. Após efetuar uma nova centrifugação usando 13.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente e finalmente foi ressuspendido em 50 μ L de TE. O DNA foi então estocado em 4 °C.

3.4. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi feita por comparação visual por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) e 80 Volts por aproximadamente 1 h (Hoisington et al., 1994). A concentração do DNA extraído de cada amostra foi estimada por comparação visual

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

3.5. Amplificação do DNA

Para o estudo da diversidade genética em milho pipoca utilizando primers para locos SSR, foram testados 100 microssatélites já mapeados para milho comum (Quadro 2). Todos os microssatélites utilizados foram obtidos a partir do *site Maize DB* acessado em <http://www.maizedb.org/ssr.php>.

Quadro 2 - 100 primers microssatélites mapeados para milho comum testados em milho pipoca.

N	Primer	BIN	N	Primer	BIN	N	Primer	BIN
1	BNLG1063	3.06	35	UMC1495	3.04	69	UMC2145	1.03
2	BNLG1083	1.02	36	UMC1506	10.05	70	UMC2181	1.08
3	BNLG2295	1.04	37	UMC1512	1.09	71	UMC2191	1.02
4	DUPSSR31	10.04	38	UMC1566	1.01	72	UMC2196	6.01
5	MMC0501	10.02	39	UMC1582	10.02	73	UMC2204	1.02
6	UMC1071	1.01	40	UMC1590	1.06	74	UMC2221	10.05-10.06
7	UMC1077	10.04	41	UMC1636	9.02	75	UMC2226	1.02
8	UMC1152	10.01-10.02	42	UMC1638	8.09	76	UMC2227	1.04
9	UMC1169	1.03-1.04	43	UMC1653	6.07	77	UMC2228	1.04
10	UMC1232	4.00	44	UMC1656	6.02-6.03	78	UMC2233	1.05
11	UMC1241	7.00	45	UMC1661	1.07	79	UMC2237	1.06-1.07
12	UMC1245	1.07	46	UMC1664	1.06	80	UMC2238	1.06-1.07
13	UMC1246	10.04	47	UMC1668	1.06	81	UMC2245	2.00-2.01
14	UMC1272	10.04	48	UMC1685	1.01	82	UMC2246	2.03-2.00
15	UMC1279	9.00	49	UMC1702	4.05-4.06	83	UMC2255	3.00-3.01
16	UMC1287	8.05-8.06	50	UMC1703	1.05	84	UMC2261	3.04
17	UMC1288	4.02	51	UMC1711	1.02	85	UMC2262	3.04
18	UMC1292	1.01	52	UMC1736	2.09	86	UMC2280	4.03
19	UMC1314	6.05	53	UMC1737	1.10-1.11	87	UMC2281	4.03
20	UMC1318	10.01	54	UMC1739	10.03	88	UMC2292	5.00
21	UMC1336	10.03	55	UMC1754	1.06	89	UMC2292	5.00
22	UMC1354	1.00	56	UMC1766	5.01	90	UMC2293	5.02-5.03
23	UMC1363	1.01	57	UMC1906	1.05	91	UMC2302	5.03-5.04
24	UMC1370	9.01	58	UMC1917	1.04	92	UMC2312	6.01
25	UMC1380	10.00	59	UMC2018	10.01-10.02	93	UMC2319	6.04-6.05
26	UMC1383	1.08	60	UMC2025	1.05	94	UMC2339	9.03
27	UMC1397	1.03	61	UMC2034	10.02	95	UMC2343	9.05-9.06
28	UMC1414	8.01	62	UMC2047	1.09	96	UMC2350	10.04
29	UMC1422	2.02	63	UMC2067	10.03	97	UMC2352	8.01-8.02
30	UMC1423	5.00	64	UMC2071	3.01	98	UMC2354	8.03
31	UMC1426	7.00	65	UMC2075	8.03-8.04	99	UMC2383	1.02-1.03

Quadro 2, cont...

32	UMC1431	1.09	66	UMC2080	1.08	100	UMC2409	4.01
33	UMC1446	1.08	67	UMC2115	5.02			
34	UMC1472	1.04	68	UMC2116	1.08			

A PCR (Polimerase Chain Reaction - reação em cadeia da polimerase) foi preparada em microtubos de 0,2 ml, usando um termociclador Techne TC-512. Para a amplificação do DNA e escolha dos primers foram utilizados: 25 ng de DNA de duas amostras, com 2,0 µl de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada dNTP, 1 U de Taq-DNA Polimerase (Invitrogen), e 0,4 µM de primers F e R específicos para um volume final de 20 µl (Quadro 3).

A seleção de primers microssatélites foi realizada utilizando-se de duas amostras de DNA das variedades, escolhidas aleatoriamente, e verificado a complementaridade e reprodutibilidade dos primers.

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

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

Para a amplificação dos microssatélites, inicialmente foi utilizado o método Touchdown PCR (Don et al., 1991), que consiste em uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguido por 10 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C (diminuindo 1°C por ciclo) por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por 20 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 2

minutos, imersão a 4°C até a retirada das amostras. Para o primer UMC1664, foi utilizado programa com temperatura de anelamento específica em 53 °C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 4%, usando 50% de agarose comum e 50% agarose Metaphor (CAMBREX) e tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, e 1 mM EDTA), com 60 Volts por 4 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução com brometo de etídio contendo 0,5 µg/ml e a imagem capturada com Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder* (Invitrogen).

3.6. Análise dos dados

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

Esses dados foram utilizados para determinar a freqüências dos alelos nos 15 locos microssatélites nos 8 genótipos de milho pipoca. As freqüências dos alelos foram usadas para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco.

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

Foram estimados para cada loco o coeficiente de endogamia (F_{IT}), definido como a probabilidade de que dois alelos presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência; o déficit de heterozigotos (F_{IS}), determinado pelo desvio das freqüências fenotípicas; a proporção da diversidade gênica entre os primers testados (F_{ST}), dado pela probabilidade de dois indivíduos pertencentes a populações diferentes possuírem um alelo idêntico por descendência, e o fluxo gênico (Alfenas, 1998).

A estimativa destes parâmetros foi feita 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 $1/(2N)$.

O cálculo da distância genética entre duas populações foi estimado de acordo com o complemento aritmético da distância genética de Nei (Nei, 1972). A distância de Nei é a mais conhecida das medidas de distância genética (Alfenas, 1998). Essa estatística pressupõe uma medida de identidade genética (I), expressa pela probabilidade de que um alelo de um loco, tomado ao acaso em duas populações diferentes, seja idêntico em relação à probabilidade de que dois alelos do mesmo loco, tomados ao acaso na população, sejam também idênticos e é definida por:

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

Em que $J_{PQ} = \sum p_i q_i$, $J_P = \sum p_i^2$, $J_Q = \sum q_i^2$, sendo p_i e q_i as frequências respectivas do i-ésimo alelo considerado nas populações P e Q.

A base teórica da distância de Nei reside na suposição de que, se duas populações quaisquer não possuem alelos em comum, então $J_{PQ} = I = 0$. No entanto, se ambas têm os mesmos alelos em idênticas frequências, então $J_P = J_Q = J_{PQ} = I = 1$ (Alfenas, 1998).

Estimada a identidade genética, a distância genética D, de Nei, dada pelo cologaritmo neperiano de I, calculada como:

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

A partir das distâncias genéticas de Nei, foi construído um dendrograma por meio da análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using the Arithmetic Average), utilizando o programa POPGENE 1.32 (Yeh, et al., 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração de DNA descrito por Hoisington et al. (1994), com modificações, foi adequado para produzir DNA de qualidade e em quantidade suficiente para estudar a estrutura de população e diversidade genética das 69 plantas de 8 variedades de milho pipoca (Viçosa M-21, SE-013, IAC-112, Chile, UNB-2, Laranjeiras do Sul, Argentina e Zélia).

A quantificação do DNA genômico individual das plantas de cada genótipo, foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas com concentrações conhecidas do 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 220 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Figura 1).

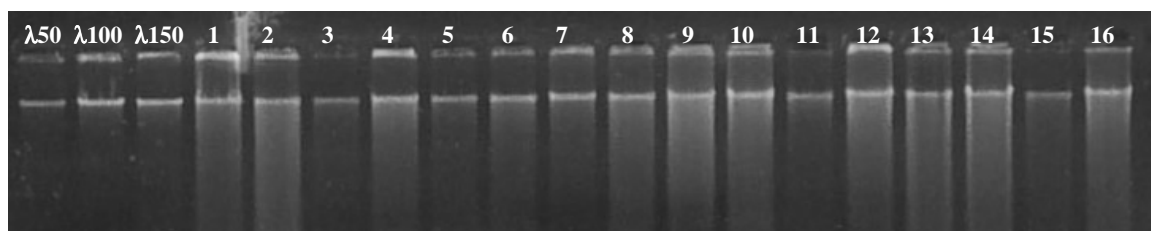


Figura 1 - Gel de Agarose 0,8% usado para a quantificação das amostras de DNA de milho pipoca. Amostras 1 a 8 são DNAs de milho pipoca extraídos de diferentes plantas da população Chile; as amostras 9 a 14 são da variedade UNB-02 e as amostras 15 e 16 são do híbrido Zélia.

Dos 100 pares de primers de microssatélites desenvolvidos para milho comum e testados para milho pipoca, 36 não amplificaram nos 8 genótipos de milho pipoca (Viçosa M-21, SE-013, IAC-112, Chile, UNB-2, Laranjeiras do Sul, Argentina e Zélia). A falta de amplificação se deve ao fato de que os primers desenvolvidos para os locos SSR de milho comum não conseguiram ser complementados com os segmentos de DNA do genoma de milho pipoca. Assim, para o milho pipoca, foi obtido um aproveitamento de 64% dos primers desenvolvidos para milho comum.

Dos 64 primers de microssatélites que amplificaram o DNA de milho pipoca, 26 foram considerados polimórficos, conferindo um polimorfismo de 41%

para os 8 genótipos. Neste trabalho, foram utilizados 15 desses primers para avaliar a variabilidade genética em milho pipoca. Estes foram escolhidos, pois os produtos da amplificação foram facilmente revelados como diferentes alelos em gel de agarose Metaphor. Estes primers, suas seqüências, repetições flanqueadas, número de alelos e localizações nos cromossomos estão apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Sequências dos primers de microssatélite, repetição da sequência microssatélite, nº de alelos detectados para cada primer e localização destes nos cromossomos, usados na estimativa da diversidade genética de 8 variedades de milho pipoca

Locos	Seqüência de Nucleotídeos	Repetição	Número de Alelos	Cromossomo
BNLG1063				
Forward	GGAGACAACCCCGACGAC	(AG)42	4	2
Reverse	GGTACCAGAGCCACAGATCC			
UMC1071				
Forward	GGAAGACACGAGAGACACCGTAG	(TACGA)5	4	1
Reverse	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT			
UMC1653				
Forward	GAGACATGGCAGACTCACTGACA	(GAAA)24	5	6
Reverse	GCCGCCACGTACATCTATC			
UMC2262				
Forward	TCTGTTCTGGGATTCTTCTTCAGTC	(CATCT)5	4	3
Reverse	CGTTCCTGGTACCTGTCTATAA			
UMC2281				
Forward	CAATGATTGGAGCCTAACCCCT	(GTCC)5	4	4
Reverse	ATGATGATCTGCAGAGCCTAGTCC			
BNLG1083				
Forward	ACAGTCTGTTGGGGAACAGG	(AG)29	5	1
Reverse	CAACGCTGGTTTGTCTGTTTA			
UMC2350				
Forward	AGTAGCGACTCCTCTGCGTGAG	(GGCCGT)4	2	10
Reverse	CGAATCGAGGATGGTTTGTTTTT			
UMC1736				
Forward	CCATCCACCACTAGAAAGAGAGGA	(GCAT)6	3	2
Reverse	TTAATCGATCGAGAGGTGCTTTTC			
UMC1077				
Forward	CAGCCACAGTGAGGCACATC	(CA)15(CGCA)12	4	10
Reverse	CAGAGACTCTCCATTATCCCTCCA			
UMC2226				
Forward	TGCTGTGCAGTTCTTGCTTCTTAC	(TGG)6	5	1
Reverse	AGCTTCACGCTCTTCTAGACCAAA			
UMC2343				
Forward	TCATCTTCCCCACAAATTTTCATT	(TGTGTGTG)4	4	9
Reverse	GACTGACAACCTCAGATTCACCCA			
UMC2115				
Forward	CTGTCTGTCTACCCAACCCAACAG	(TGCCA)5	3	5
Reverse	GGGGATAGGCGTGTGTATGTACTG			
UMC2116				
Forward	GTCACTGCACGATCCATCACAT	(GCGACT)4	3	1
Reverse	CTCAGCTACAGGAGCGAAGAGG			

Quadro 4, cont...

UMC2047				
Forward	GACAGACATTTCCTCGCTACCTGAT	(GACT)4	3	1
Reverse	CTGCTAGCTACCAAACATTCCGAT			
UMC1664				
Forward	AATTGTTTACTGCGCTGAAACTCC	(AACA)6	3	1
Reverse	CCTCTTTGCCTGTACCGTGTATTC			

Com estes 15 primers, foram identificados 57 alelos e o número de alelos por loco nos genótipos variou de 2 a 5, com um número médio de alelos por loco polimórfico de 3,7 (Figura 2 e Quadro 5).

Quadro 5 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as 8 variedades de milho pipoca obtidos com cada um dos 15 primers de microssatélites. Número de alelos observados (na), número efetivo de alelos (ne), heterozigosidade média observada (H_o) e heterozigosidade média esperada de Nei (H_e)

Locos	na	ne	H_o	H_e
BNLG1063	4,0000	2,3505	0,1594	0,5746
UMC1653	5,0000	1,4936	0,2464	0,3305
UMC1071	4,0000	2,1231	0,4928	0,5290
UMC2262	4,0000	3,1985	0,4348	0,6874
UMC2281	4,0000	3,1540	0,7246	0,6829
BNLG1083	5,0000	2,5981	0,2319	0,6151
UMC2350	2,0000	1,8304	0,1159	0,4537
UMC1736	3,0000	1,9094	0,2174	0,4763
UMC1077	4,0000	3,4689	0,3188	0,7117
UMC2226	5,0000	4,2189	0,6232	0,7630
UMC2343	4,0000	3,5306	0,2029	0,7168
UMC2115	3,0000	2,4155	0,5217	0,5860
UMC2116	3,0000	2,3669	0,4928	0,5775
UMC2047	3,0000	2,4855	0,2754	0,5977
UMC1664	3,0000	2,2274	0,8261	0,5510
Média	3,7333	2,6248	0,3923	0,5902

O número médio de alelos por loco nas 8 variedades de milho pipoca analisadas no presente estudo foi maior que o número de alelos descritos por Li et al. (2004) (2,7 alelos/loco) em 56 linhagens de milho pipoca, analisando 113 locos SSR, e menor que o número de alelos (5,4 alelos/loco) encontrados por Wu et al. (2004) em raças de pipoca com 61 primers SSR. Em milho comum, o número de alelos por loco SSR tem sido relativamente maior que o encontrado em milho

pipoca. Qi-Lun et al. (2008) encontraram 6,4 alelos por loco em 124 cultivares de milho comum analisando 45 locos SSR. Liu et al. (2005) detectaram uma média de 4,1 alelos, com 50 primers SSR em 38 variedades, e Li et al. (2004) detectaram, em 113 locos SSR, uma média de 3,58 em 21 linhagens de milho comum.

Quadro 6 - Frequências dos alelos nos 15 locos microssatélites nos 8 genótipos de milho pipoca

Locos	Alelos	Variedades							
		Viçosa M-21	IAC-112	SE-013	Laranj.Sul	Argentina	Chile	Zélia	UNB-02
BNLG1063	A	*****	*****	*****	0,1250	*****	*****	*****	0,3750
	B	0,7222	1,0000	*****	0,1250	1,0000	0,6111	1,0000	0,2500
	C	0,1111	*****	*****	0,1875	*****	0,3333	*****	0,2500
	D	0,1667	*****	1,0000	0,5625	*****	0,0556	*****	0,1250
UMC1653	A	0,0556	*****	0,2222	0,2500	*****	*****	*****	*****
	B	0,7222	1,0000	0,6667	0,2500	1,0000	1,0000	1,0000	0,8125
	C	0,1667	*****	0,0556	0,3125	*****	*****	*****	0,0625
	D	*****	*****	*****	0,1875	*****	*****	*****	*****
	E	0,0556	*****	0,0556	*****	*****	*****	*****	0,1250
UMC1071	A	0,5556	0,5556	0,2778	0,5000	1,0000	1,0000	0,5000	0,7500
	B	0,2778	*****	0,2222	0,1875	*****	*****	*****	*****
	C	*****	*****	0,4444	*****	*****	*****	*****	*****
	D	0,1667	0,4444	0,0556	0,3125	*****	*****	0,5000	0,2500
UMC2262	A	0,2222	0,9444	*****	0,5000	*****	0,4444	0,5000	*****
	B	*****	*****	0,6111	0,0625	*****	0,0556	*****	0,5625
	C	0,6667	0,0556	0,2222	0,3750	1,0000	0,4444	0,5000	*****
	D	0,1111	*****	0,1667	0,0625	*****	0,0556	*****	0,4375
UMC2281	A	0,8333	0,5556	0,0556	*****	0,5000	0,7778	*****	0,5000
	B	*****	*****	0,3333	0,3750	0,5000	0,2222	0,5000	0,1875
	C	0,0556	0,4444	0,6111	0,5625	*****	*****	0,5000	0,0625
	D	0,1111	*****	*****	0,0625	*****	*****	*****	0,2500
BNLG1083	A	*****	0,0556	*****	*****	*****	0,4444	*****	*****
	B	0,2222	*****	0,2222	0,1250	*****	*****	*****	*****
	C	0,6667	0,9444	0,1667	0,5000	0,7778	0,5556	*****	0,8125
	D	0,1111	*****	0,1667	0,3750	0,2222	*****	1,0000	0,1875
	E	*****	*****	0,4444	*****	*****	*****	*****	*****
UMC2350	A	0,4444	0,1111	1,0000	0,8750	1,0000	1,0000	0,0625	0,6875
	B	0,5556	0,8889	*****	0,1250	*****	*****	0,9375	0,3125
UMC1736	A	0,1111	1,0000	0,7778	0,5625	0,3333	1,0000	1,0000	0,6250
	B	0,8889	*****	0,2222	0,0625	0,6667	*****	*****	0,1250
	C	*****	*****	*****	0,3750	*****	*****	*****	0,2500
UMC1077	A	*****	*****	0,5556	0,3750	1,0000	0,5000	*****	0,3125
	B	0,7778	0,2222	0,2222	0,5000	*****	0,2778	0,0625	0,1875
	C	*****	0,7778	*****	0,0625	*****	0,2222	0,9375	0,3125
	D	0,2222	*****	0,2222	0,0625	*****	*****	*****	0,1875
UMC2226	A	0,1111	*****	0,2222	*****	0,7222	*****	*****	0,3125
	B	0,2778	0,6111	0,0556	0,5625	*****	*****	0,5000	*****
	C	0,3333	*****	0,3889	*****	*****	1,0000	*****	0,2500
	D	0,2778	0,3889	0,3333	0,0625	0,2778	*****	0,5000	0,4375
	E	*****	*****	*****	0,3750	*****	*****	*****	*****
UMC2343	A	0,2778	*****	0,6111	*****	*****	*****	*****	0,5000
	B	0,1111	1,0000	0,1111	0,4375	*****	*****	1,0000	0,1250
	C	0,3889	*****	*****	0,5625	*****	*****	*****	0,2500
	D	0,2222	*****	0,2778	*****	1,0000	1,0000	*****	0,1250

Quadro 6 Cont...

UMC2115	A	0,2222	0,5556	0,2222	0,5625	0,5556	0,6667	0,3750	0,4375
	B	*****	*****	0,0556	0,1875	*****	*****	0,3750	0,2500
	C	0,7778	0,4444	0,7222	0,2500	0,4444	0,3333	0,2500	0,3125
UMC2116	A	0,1111	0,8333	0,8333	0,6875	*****	0,5000	0,6250	0,5625
	B	0,8333	*****	0,1667	0,1875	0,7222	0,5000	0,3125	0,3125
	C	0,0556	0,1667	*****	0,1250	0,2778		0,0625	0,1250
UMC2047	A	0,1111	0,5000	0,2222	0,5625	*****	*****	1,0000	0,5625
	B	0,7778	0,1111	0,5556	0,2500	1,0000	1,0000	*****	0,2500
	C	0,1111	0,3889	0,2222	0,1875	*****	*****	*****	0,1875
UMC1664	A	0,5556	0,5000	0,5000	0,5625	0,5556	1,0000	0,5000	0,5000
	B	0,2778	0,1667	0,1111	0,1250	*****	*****	*****	0,1875
	C	0,1667	0,3333	0,3889	0,3125	0,4444	*****	0,5000	0,3125

Os valores para a proporção de locos SSR polimórficos e os valores para as estimativas da proporção de heterozigotos observada (H_o) e esperada (H_e), para cada variedade, estão relacionados no Quadro 7.

Quadro 7 - Parâmetros de diversidade genética avaliados para as 8 variedades de milho pipoca: tamanho da amostra (**N**), número de locos polimórficos **N(pl)**, porcentagem de alelos polimórficos (**%P**), número médio de alelos observados (**na**), número efetivo de alelos (**ne**), heterozigosidade média observada (**H_o**) e heterozigosidade média esperada de Nei (**H_e**)

Variedades	N	N(pl)	%P	na	Ne	Ho	He
Viçosa M-21	09	15	100,00	2,9333	2,0065	0,3852	0,4539
IAC-112	09	11	73,33	1,8667	1,5477	0,4148	0,2790
SE-013	09	13	86,67	2,8667	2,1301	0,3852	0,4650
Laranj. Sul	08	15	100,00	3,1333	2,3607	0,4833	0,5547
Argentina	09	7	46,67	1,4667	1,3746	0,2889	0,2053
Chile	09	7	46,67	1,7333	1,5002	0,2074	0,2346
Zélia	08	9	60,00	1,7333	1,5471	0,4417	0,2599
UNB-02	08	15	100,00	3,0000	2,4322	0,5667	0,5521

As variedades Viçosa M-21, Laranjeiras do Sul, e UNB-2 apresentaram a maior proporção de locos polimórficos (100% de locos polimórficos), apresentando variação alélica em todos os locos microssatélites analisados (Quadro 6). No conjunto de todos os 8 genótipos, a proporção média de locos polimórficos foi de 76,66%. Esta proporção de locos polimórficos nas variedades Viçosa M-21, SE-013, IAC-112, Chile, UNB-2, Laranjeiras do Sul, Argentina e Zélia foi maior que a

registrada para linhagens de milho pipoca. Liu et al. (2003) encontraram 54% de locos polimórficos em 7 linhagens e Dandolini et al. (2008) registraram 50% de polimorfismo em 10 linhagens, analisando 14 locos SSR. Em milho comum, a proporção de locos polimórficos registrada na literatura tem sido bem maior que o valor encontrado nos 15 locos SSR das 8 variedades de milho pipoca. Qi-Lun et al. (2008) obtiveram 96,8% de locos polimórficos em 124 cultivares de milho comum, utilizando 45 locos SSR em amostras de *bulk* simples.

Desta forma, a média de alelos por loco e o polimorfismo obtido nos 15 locos SSR avaliados em 8 genótipos de milho pipoca foi menor quando comparado com os valores registrados na literatura para cultivares e linhagens de milho comum. 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 essa menor diversidade genética. 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 locos SSR de linhagens e populações de polinização aberta de milho comum, de outras espécies do gênero *Zea*, e de milhos com características especiais tais como o milho pipoca e milho doce, o milho pipoca tem apresentado um número de alelos por loco menor e valores de heterozigidade média também menor do que os verificados para o milho comum (Liu et al., 2003).

Os primers UMC2281, UMC2115, UMC2116 revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados no presente estudo (Quadro 6), podendo, portanto, ser apontados e considerados como efetivos e promissores para detectar polimorfismos em variedades de polinização aberta de milho pipoca.

A heterozigidade média observada variou entre 0,2074 e 0,5667 (Quadro 7). As variedades UNB-02 e Laranjeiras do Sul apresentaram a maior proporção de plantas heterozigotas ($H_o = 0,5667$ e $0,4833$, respectivamente) e a maior proporção de heterozigotos esperado também foi verificado nas variedades Laranjeiras do Sul

e UNB-02 ($H_e = 0,5547$ e $0,5521$ respectivamente). A alta heterozigosidade na variedade UNB-02 pode ser explicada pelo fato de ser uma variedade de polinização aberta e originada de cruzamentos divergentes entre um composto indígena com uma população americana. Estas variedades com heterozigosidade alta, assim como as variedades com excesso de heterozigotos observados (IAC-112, Argentina, Zélia e UNB-02) podem ser consideradas como promissoras para seleção continuada de progênies. A manutenção de diversidade genética durante a formação de progênies é importante para o progresso de seleção, porque ela aumenta as possibilidades de seleção em médio e longo prazo.

As variedades Argentina e Chile apresentaram a menor heterozigosidade média observada ($H_o = 0,2889$ e $0,2074$, respectivamente), pois 8 dos 15 locos analisados estão em homozigose na variedade Argentina (UMC1063, UMC1653, UMC1071, UMC2262, UMC2350, UMC1077, UMC2343, UMC2047) e na variedade Chile (UMC1653, UMC1071, UMC2350, UMC1736, UMC2226, UMC2343, UMC2047, UMC1664), apresentando alelos diferentes em apenas 7 locos (46,67% de locos polimórfico).

Os valores de F_{IS} obtidos (Quadro 8) revelam o déficit de heterozigotos nos 15 locos analisados ($F_{IS} = -0,0563$). O valor baixo e negativo indica um excesso de 5,6% de plantas heterozigotas nas 8 variedades analisadas. O fato da maioria das variedades serem híbridas (Zélia e IAC-112) ou variedades de polinização aberta (Viçosa M-21, UNB-2, SE-013 e Laranjeira do Sul) pode explicar o alto nível de heterozigosidade média encontrada nas 8 populações analisadas. Apesar de o total de déficit de heterozigotos nos 15 locos analisados nas 8 variedades indicar um excesso de heterozigotos, valores altos de déficit de heterozigotos foram verificado nos locos BNLG1063, BNLG1083, UMC2350 e UMC2343 ($F_{IS} = 0,4230$; $0,4004$; $0,3518$; e $0,3100$; respectivamente). Esses valores altos, que indicam um excesso de homozigotos em alguns locos, apontam para tendência de fixação de determinados alelos nos referidos locos. Esta tendência para fixação de alelos pode ser observada nas variedades Argentina e Chile, de genealogias desconhecidas. As variedades Zélia e IAC-112, apesar de serem híbridas, também apresentam tendência para fixação de alelos em 6 e 4 loco, respectivamente (Quadro 6). Os locos com déficit

de heterozigotos (BNLG1063, BNLG1083, UMC2350 e UMC2343) (Quadro 5) podem estar sendo alvo da seleção direcionada juntamente com os locos para características agronômicas de interesse em determinadas variedades. De acordo com esta hipótese, os locos BNLG1063, BNLG1083, UMC2350 e UMC2343, poderiam estar ligados com locos para características quantitativas. Este é um aspecto que merece ser investigado futuramente.

O valor positivo e alto para o coeficiente F_{IT} ($F_{IT} = 0,3307$) (Quadro 8) reflete a endogamia global determinada por cruzamentos não causais presente nas 8 variedades de milho pipoca e provavelmente deve ser resultado de eventos de auto-polinização em processos de seleção.

Quadro 8 - Parâmetros de diversidade genética para os primers avaliados nos 8 genótipos de milho pipoca. Número de indivíduos amostrados (**N**), déficit de heterozigotos (**F_{IS}**), coeficiente de endogamia (**F_{IT}**), proporção da diversidade gênica entre os primers testados (**F_{ST}**), fluxo gênico estimado (**Nm**) de $F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$

Locos	N	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}	Nm
BNLG1063	69	0,4230	0,7159	0,5077	0,2424
UMC1653	69	0,0035	0,2611	0,2585	0,7170
UMC1071	69	-0,2240	0,0635	0,2349	0,8144
UMC2262	69	-0,0643	0,3560	0,3949	0,3831
UMC2281	69	-0,5196	- 0,0592	0,3030	0,5752
BNLG1083	69	0,4004	0,6306	0,3840	0,4010
UMC2350	69	0,3518	0,7414	0,6010	0,1660
UMC1736	69	0,1159	0,5225	0,4599	0,2936
UMC1077	69	0,2313	0,5466	0,4102	0,3594
UMC2226	69	-0,2695	0,1749	0,3500	0,4642
UMC2343	69	0,3100	0,7125	0,5833	0,1786
UMC2115	69	-0,0312	0,1067	0,1338	1,6191
UMC2116	69	-0,2115	0,1324	0,2839	0,6306
UMC2047	69	0,1936	0,5438	0,4343	0,3256
UMC1664	69	-0,6778	- 0,5051	0,1029	2,1798
Total	69	-0,0563	0,3307	0,3664	0,4324

As diferentes frequências dos alelos e os valores altos e baixos para as heterozigosidades observada e esperada nas diferentes variedades determinaram uma diferenciação genética muito alta entre as 8 variedades. De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} superiores a 0,25 indicam divergência interpopulacional

muito alta e valores de F_{ST} no intervalo 0,15 – 0,25 indicam divergência interpopulacional alta. Apenas em 2 locos, os valores de F_{ST} foram inferiores a 0,15 (UMC2115, UMC1664). Desta forma, é possível concluir que as 8 variedades de milho pipoca analisadas no presente estudo são altamente diferenciadas para os 15 locos SSR analisados, formando populações geneticamente estruturadas. A maior diferenciação genética foi evidente no loco UMC2350 ($F_{ST} = 0,6010$; Quadro 8). Esse primer é, portanto, o mais adequado para ser usado para diferenciar as 8 variedades no que refere a frequência diferencial dos alelos desse loco. A alta diferenciação genética observada entre os 8 genótipos de milho pipoca ($F_{ST} = 0,3664$) propõe que os eventos casuais de recombinações genéticas na geração das variedades e/ou eventos de recombinações somáticas em cada variedade devem ser os agentes responsáveis pelos níveis, maior e menor, de variabilidade genética estimada.

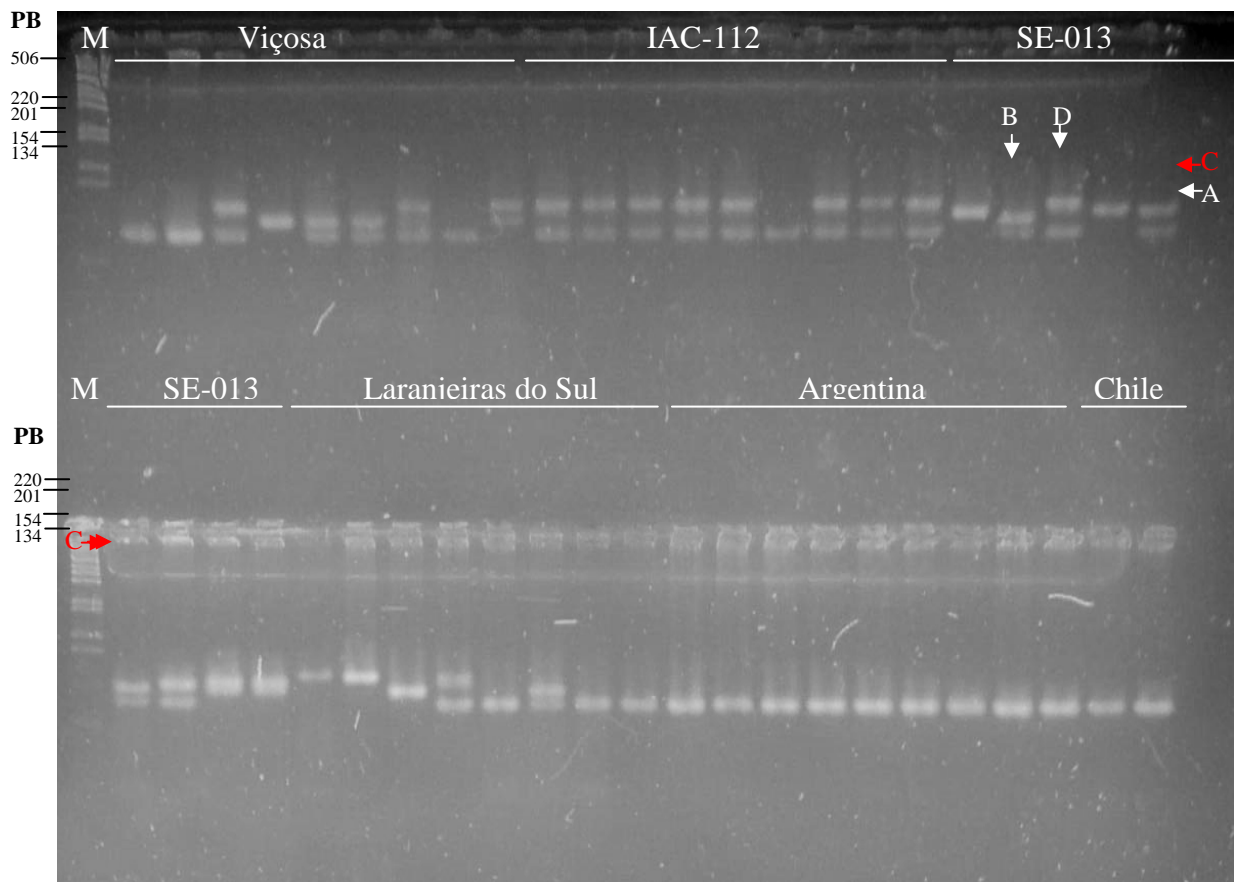


Figura 2 - Amplificação, usando o primer UMC1071 do DNA genômico nos genótipos de milho pipoca, com alelo C exclusivo da variedade SE-013. (Marcador *Laeder*1kb).

A alta diferenciação genética entre os genótipos também é observado pela presença de alelos exclusivos do genótipo. A variedade SE-013, apresentou dois alelos exclusivos, o alelo C do loco UMC1071 e o alelo E do loco BNLG1083. A variedade Laranjeiras também apresentou dois alelos exclusivos, o alelo D do loco UMC1653 e o ALELO e do loco UMC2226 (Figura 2 e Quadro 6).

Nas variedades Viçosa M-21 e SE-013, foram observados um indivíduo com fenótipo de alelo extra no loco UMC1653, formando um fenótipo de 3 bandas de DNA no gel de agarose, que reflete um quimerismo em tecidos de folhas com constituições genótípicas diferentes (Figura 2). O alelo D do loco UMC1653, se desconsiderá-lo na análise como alelo extra, apareceu também como alelo exclusivo da variedade Laranjeiras do Sul, com frequência de 0,1875.

Os alelos extras não foram considerados para a análise da diversidade genética dos 8 genótipos, mas a evidência destes parece importante para indicar, por exemplo, o potencial de estabilidade ou diversificação genética nessas populações. Embora o quimerismo possa ser considerado como tendo um efeito menor na variabilidade de milho pipoca, porque esta espécie se reproduz por cruzamentos, um terceiro alelo num loco SSR é indicativo do potencial deste loco para diversificação e variabilidade molecular. O quimerismo caracterizado por Hocquigny et al. (2004), tem sido descrito em clones de uvas (Crespan, 2004; Moncada et al., 2006) e também nos locos UMC1446, UMC1590, e UMC2343, em progênies de milho doce (Rupp et al., 2009).

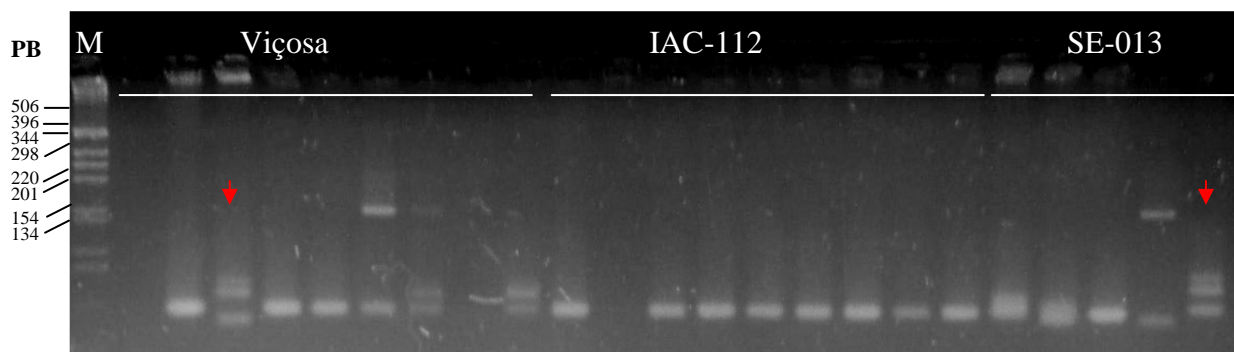


Figura 3 - Gel de agarose, mostrando a presença do alelo extra (C) para o loco UMC1653, encontrados juntamente com os alelos A e C, formando um fenótipo de 3 bandas (quimérico). O alelo C foi observado como alelo extra em uma planta da variedade Viçosa M-21 e SE-013. (Marcador *Laeder* 1kb).

O nível de divergência genética, calculado pelos coeficientes de identidade e de distância genética de Nei (1972) entre as 8 variedades nos 15 locos SSR (Quadro 9), está indicado pelos valores de identidade entre as mesmas no dendrograma da Figura 4.

Quadro 9 - Matriz de similaridade construída a partir dos coeficientes de identidade e distância genética de Nei (1972), obtidos com dados da avaliação de microssatélites para as 8 variedades de milho pipoca.

Genótipos	Viçosa M-21	IAC-112	SE-013	Laranj. Sul	Argentina	Chile	Zélia	UNB-02
Viçosa M-21	****	0,5994	0,5661	0,6003	0,7533	0,7050	0,4877	0,7024
IAC-112	0,5118	****	0,4730	0,6701	0,4681	0,5878	0,8374	0,7056
SE-013	0,5689	0,7487	****	0,7309	0,5812	0,6443	0,4605	0,7447
Laranj. Sul	0,5103	0,4004	0,3135	****	0,5398	0,6044	0,6525	0,7367
Argentina	0,2833	0,7591	0,5426	0,6166	****	0,7977	0,4449	0,6756
Chile	0,3496	0,5314	0,4396	0,5034	0,2261	****	0,4704	0,7342
Zélia	0,7180	0,1775	0,7755	0,4264	0,8100	0,7543	****	0,6234
UNB-02	0,3533	0,3487	0,2947	0,3055	0,3921	0,3089	0,4725	****

Identidade Genética de Nei (acima da diagonal) e Distância Genética (abaixo da diagonal).

O dendrograma está formado por três agrupamentos principais, nos quais as variedades estão distribuídas num intervalo de similaridades ou identidade (I) genéticas que varia de 0,4449 a 0,8374. As variedades Zélia e IAC-112 são as mais similares (I = 0,8374), enquanto as variedades Zélia e Argentina são as mais divergentes geneticamente (I = 0,4449) para os 15 locos SSR.

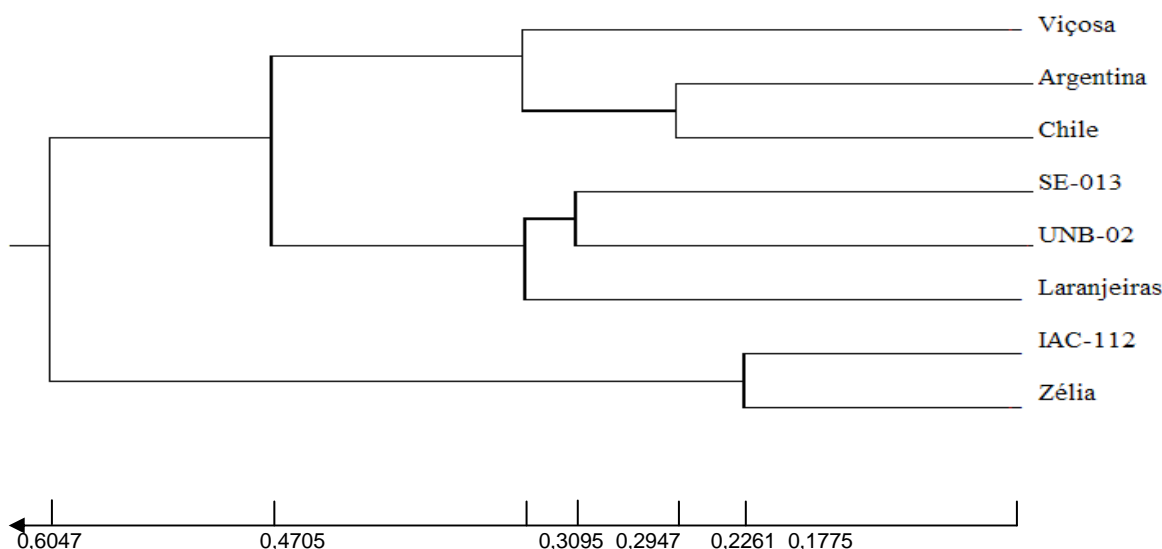


Figura 4 - Distância genética entre as 8 variedades de milho pipoca. A estimativa foi realizada por meio do método UPGMA empregando o programa POPGENE 1.32.

As variedades Viçosa M-21, Argentina e Chile compõem o grupo I; as variedades SE-013, UNB-01 e Laranjeiras do Sul compõem o grupo 2, apresentando maior similaridade genética; enquanto as variedades IAC-112 e Zélia formam o grupo III, com menor similaridade genética em relação as demais.

A maior similaridade encontrada entre as variedades Zélia e IAC-112 pode ser explicada pela origem dessas variedades; ambas foram lançadas quase simultaneamente e possuem em sua constituição genotípica genes de variedades Norte Americanas. A variedade híbrida Zélia foi derivada de variedades Norte Americanas e a variedade híbrida IAC-112 por combinações de variedades Norte Americanas com genótipos tropicais (Rangel et al., 2008). Além disso, embora as duas linhagens geneticamente mais similares tenham sido desenvolvidas por programas de melhoramento genético diferentes e possam ter tido processos de condução de seleção diferentes, as características agrônômicas selecionadas provavelmente devem ter sido comuns.

As variedades Viçosa M-21, UNB-2 e SE-013 também possuem genes de variedades Norte Americanas em sua constituição genotípica, mas o fato das variedades Argentina, Chile e Laranjeiras do Sul serem genealogias desconhecidas dificulta a interpretação e a justificativa da organização do dendrograma da Figura 4. Por outro lado, o resultado da organização do referido dendrograma é muito importante para informar que cruzamentos entre plantas da variedade Argentina com plantas da variedade Zélia, por exemplo, são promissores para ampliar a base genética de milho pipoca. O dendrograma é particularmente importante para posicionar e relacionar as variedades de origem desconhecida entre si e com outras variedades. A caracterização genética de cultivares de milho pipoca da Argentina (Bracco et al., 2009) tem indicado valores baixos e altos para os níveis de heterozigidade observada e esperada nas diferentes populações e tem mostrado uma alta diferenciação entre as populações de regiões diferentes. Em algumas populações, também foi descrito excesso de homozigotos, a exemplo do verificado na variedade Argentina analisada no presente estudo.

Evidências de que a domesticação e a seleção artificial para características morfológicas e agrônômicas importantes em milho possuem um efeito menor na

diversidade genética nos locos SSR foram apresentadas por alguns autores (Vigouroux et al., 2005). Assim, é possível que os locos SSR possam ser apontados como marcadores moleculares promissores e adequados para acompanhar e direcionar a seleção de características desejáveis em genótipos de milho pipoca. Desse modo, os valores estimados para a identidade genética entre as variedades (Quadro 9) podem ser úteis para direcionar cruzamentos promissores no sentido de selecionar a característica de interesse, mantendo ou ampliando a diversidade genética em locos, em princípio são considerados neutros, como os locos SSR.

5. CONCLUSÕES

- a) Os primers UMC2281, UMC2115, UMC2116 podem ser recomendados para detectar polimorfismos em variedades de polinização aberta de milho pipoca porque revelaram polimorfismo em todos os genótipos analisados e o primer UMC2350 pode ser recomendado para diferenciar genótipos de milho pipoca porque o loco UMC2350 apresentou o maior nível de diferenciação entre as variedades.
- b) As variedades UNB-02, Laranjeira do Sul, IAC-112, Argentina e Zélia são promissoras para seleção continuada de progênes em médio e longo prazo porque apresentam heterozigosidade observada alta e/ou excesso de plantas heterozigotas.
- c) A base genética das 8 variedades de milho pipoca, Viçosa M-21, IAC-112, Zélia, Laranjeiras do Sul, UNB-2, SE-03, Argentina e Chile, não é ampla, mas elas formam populações geneticamente estruturadas.
- d) As plantas das variedades Viçosa M-21, IAC-112, Laranjeiras do Sul e UNB-2, com maior proporção de locos polimórficos, e Laranjeiras do Sul com maior nível de heterozigosidade esperada, podem ser recomendadas para cruzamentos com plantas que apresentem características agronômicas desejáveis, no sentido de ampliar a base genética de genótipos de milho pipoca;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALEXANDER, D.E. Breeding special nutritional and industrial types. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (eds.). **Corn and corn improvement**. Madison: ASA, CSSA and SSSA, 1988. p. 869-880.

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

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

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

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

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

BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatélites: Allele variation and mapping. **Plant Molecular Biology**, 27:835-845, 1995.

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

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.

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

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

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

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, 32:314-333,1980.

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

CARVALHO, L.P.; LANZA, M.A.; FALLIERI, J.; SANTOS, J.W. Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:1149-1155, 2003.

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.

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

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. **Genome**, 34:66-71, 1991.

CRESPAN, M. Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:231-237, 2004.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Cultivares de milho disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2006/2007. In: **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>. Acesso em: 15, dezembro, 2008.

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

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

DEMEKE, T.; HUCL, P.; SASIKUMAR, B.; CHIBBAR, R.N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in cereal improvement. **Maydica**, 42:133-142, 1997.

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

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

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

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

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1996. 464p.

FERREIRA, M.E. **Biodiversidade: Perspectivas e oportunidades**. [2004]. Disponível em: [http://\BDT%20\[inventário%20e%20aplicações%20no%20setor%2](http://\BDT%20[inventário%20e%20aplicações%20no%20setor%2). Acesso em: 12, setembro, 2006.

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

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

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

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

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**, 35:1143-1149, 2000.

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

GREEN JUNIOR, V.E.; HARRIS JUNIOR, E.D. Popcorn quality and the measurement of popping expansion. **Proceedings of the Soil and Crop Science Society of Florida**. 30:28-41, 1960.

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. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, 70:45-54, 1996.

HALLAUER, A.R. Temperate maize and heterosis. In: COORS, J.; PANDEY, S. **Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops**. México: Madison, 1999. p. 353-361.

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

HOCQUIGNY, S.; PELSAY, F.; DUMAS, V.; KINDT, S.; HELOIR, M.C.; MERDINOGLU, D. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. **Genome**, 47:579–589, 2004.

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

INTERNATIONAL SNP MAP WORKING GROUP. A map of human genome sequence variation containing 14.2 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, 409:928–933, 2001.

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.

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

JEFFREYS, A.J.V.; WILSON, R.; THEIN S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, 314:67-73, 1985.

JUGENHEIMER, R.W. **Corn improvement, seed production and uses**. New York, John Wiley, 1976. 670p.

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

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

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

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

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

LEONELLO, L.A.F.; CAZETTA, D.A.; FORNASIERI FILHO, D. Características agronômicas e qualidade comercial de cultivares de milho pipoca em alta população. **Acta Scientiarum Agronomy**, 31:215-220, 2009.

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

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

LI, Y.L.; DONG, Y.B.; NIU, S.Z.; CUI, D.Q. QTL for popping characteristics in popcorn. **Plant Breeding**, 126:509-514, 2007.

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

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

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

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

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

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

MACEDO, E.S. **Distância genética em linhagens S4 de milho pipoca (*Zea mays* L.) evidenciada por RAPD**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 38p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; CARNEIRO, N.P.; PAICA, E. Fisiologia do milho. **Circular Técnica**, 22:65-65, 2002.

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

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

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

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

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

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

MONCADA, X.; PELSAY, F.; MERDINOGLU, D.; HINRICHSEN, P. Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. **Genome**, 49:1459–1472, 2006.

MOSS, D.W. **Isoenzymes**. London: Capman & Hall, 1982.

MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA microsatellites: agents of evolution? **Scientific American**, 280:72-77, 1999.

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

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 Sementes**, 18:2, 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.

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

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

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85:983-995, 1993.

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

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

PEIXOTO, C.M. O milho: o rei dos cereais – da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas. **Seed News**, 2: não paginado, 2002.

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

PEREIRA, M.G.; AMARAL Jr, A.T. Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 1:3-10, 2001.

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

PIPERNO, D.R.; RANERE, A.J.; HOLSTB, I.; IRIARTED, J.; DICKAUC, R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, México. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106:5019-5024, 2009

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

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2004. 472p.

RANERE, A.J.; PIPERNO, D.R.; HOLST, I.; DICKAU, R.; IRIARTE, J. The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, México. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106:5014–5018, 2009.

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

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

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

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

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

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.

RICCI, G.C.L.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M.S.; SCAPIM, C.A. Microsporogenesis in inbred line of popcorn (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Research**, 6:1013-1018, 2007.

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

ROCHA, D. **Cultivo comercial do milho pipoca ainda é limitado no Brasil** disponível em: <http://brasilatual.com.br/sistema/?p=822>. Acesso em: 29, fevereiro, 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 and General Genetics**, 246:327-333, 1995.

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

RUPP, J.V; MANGOLIN, C.A.; SCAPIM, C.A; MACHADO, M.F.P.S. Genetic Structure And Diversity Among Sweet Corn (*Su1*-Germplasm) Progenies Using SSR Markers. **Maydica**, 54:125-132, 2009.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; BIYASHEV, R.M.; YANG, G.P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R.W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91:5466-5470, 1994.

SANTOS, F.S.; AMARAL JÚNIOR, A.T. FREITAS JÚNIOR, S.P.; RANGEL, R.M.; PEREIRA, M.G. Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população de milho-pipoca UNB-2U sob seleção recorrente. **Bragantia**, 66:389-396, 2007.

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

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

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

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

SAWAZAKI, E. **Tecnologia para produção de milho pipoca**. Campinas: IAC, 2001b. não paginado (Boletim Técnico Fertilizantes).

SAWAZAKI, E.; CASTRO, J.L.; GALLO, P.B.; PATERNIAN, M.E.A.G.Z.; SILVA, R.M.; LUDERS, R.B. Potencial de híbridos temperados de milho pipoca em cruzamentos com o testador semitropical IAC 12. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 2: 61-70, 2003.

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

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

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

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

SEREAFINI, L.A.; BARROS, M.N.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Livraria e editora Agropecuária Ltda., 2001. 463p.

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

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

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

SILVA, W.J.; VIDAL, B.C.; MARTINS, M.E.Q.; VARGAS, H.; PEREIRA, A.C.; ZERBETTO, A. What makes popcorn. **Nature**, 362: 417-417, 1993.

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

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

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, 322:652-656, 1986.

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

TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena, S.D.J.; Chakraborty, R.; Epplen, J.T.; Jeffreys, A.J. **DNA fingerprinting: state of the science**. Switzerland: Birkhauser, 1993. p. 21-28.

TAVARES, R.P. **A cultura do milho**. Rio de Janeiro: Tecnoprint S. A, 1988. 129p.

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

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.

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

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23:4407-4414, 1995.

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

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 580p.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**, 15:323-354, 1951.

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

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

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

ZHAO, X.; KOCHERT, G. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeat, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General 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 and Molecular Biology**, 21:607-614. 1993.

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

ZIEGLER, K.E. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. (ed.) **Specialty corns**. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 199–234.

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