

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

AUSILEIDE ALVES LEAL

**Potencial do RAPD e de microssatélites para estimar distâncias
genéticas em milho pipoca (*Zea mays L.*)**

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO - 2008

AUSILEIDE ALVES LEAL

Potencial do RAPD e de microssatélites para estimar distâncias genéticas em 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 obtenção do Título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ - BRASIL
DEZEMBRO - 20088

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

L435p Leal, Ausileide Alves
Potencial do RAPD e de microssatélites para estimar distâncias genéticas em milho pipoca (*Zea mays* L.) / Ausileide Alves Leal. -- Maringá, 2008.
ix, 68 f. : il. figs., quadros

Orientadora : Prof.^a Dr.^a Claudete Aparecida Mangolin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, 2008.

1. Milho-pipoca (*Zea mays* L.) - Divergência genética - Microssatélites (marcador molecular). 2. Milho-pipoca (*Zea mays* L.) - Divergência genética - RAPD (marcador molecular). 3. Milho-pipoca (*Zea mays* L.) - Distância genética. 4. Milho-pipoca (*Zea mays* L.) - Marcador molecular. 5. Milho-pipoca (*Zea mays* L.) - Melhoramento genético. I. Mangolin, Claudete Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 21.ed. 635.6777

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas presentes em minha vida e que comigo compartilham os sonhos, as dúvidas, as certezas e as alegrias.

Em especial, dedico ao meu pai, José “Bruno”, que tão cedo partiu, e à minha mãe, Maria Augusta, pelo amor e presença constantes.

Com enorme carinho, dedico ao meu esposo, Brás Henrique, pelo amor e companheirismo, e aos nossos filhos, Gabriela e Henrique, por iluminarem nossas vidas, com momentos de alegrias inesquecíveis.

À minha irmã, Ausilene, ao cunhado, Gilberto, e à sobrinha, Lara.

AGRADECIMENTO

A Deus pela vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar este curso.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, pela orientação, pelos ensinamentos e pela parceria para a realização deste trabalho.

Às professoras doutoras Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela co-orientação.

Aos colegas de curso pela convivência e aprendizado.

À Ivone Batista de Oliveira Eloi e à Viviane Cordovez da Cunha, pela valiosa contribuição para a realização dos experimentos

Ao Freddy Luis Mora Poblete, pelo auxílio na utilização dos softwares computacionais e na análise dos dados.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ausileide Alves Leal, filha de José Alves Leal e Maria Augusta de Souza Leal, nasceu em Tupã, estado de São Paulo, aos dez dias do mês de dezembro de 1967.

Iniciou o Ensino Fundamental em 1974 e concluiu no ano de 1981, na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Graus “Profª Auda Malta”, no município de Tupã, São Paulo. Na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Graus “Joaquim Abarca”, na mesma cidade, concluiu o Ensino Médio em 1984.

Em 1989, concluiu a Graduação em Ciências Biológicas, com Licenciatura Plena em Biologia, pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Adamantina, São Paulo.

Atua como professora na Rede de Educação Pública Estadual desde 1990.

Em 2006, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Milho pipoca	4
2.2. Melhoramento genético do milho pipoca	6
2.3. Heterose e diversidade genética	8
2.4. Marcadores moleculares	10
2.4.1. Marcadores RAPD	13
2.4.2. Marcadores SSR (Sequências Simples Repetidas) ou microssatélites	15
2.4.3. Associação entre diferentes marcadores moleculares.....	17
2.5. Análise da diversidade genética	21
2.5.1. Diversidade de Nei.....	22
2.5.2. Coeficientes de similaridade	23
2.5.3. Medidas da distância genética.....	24
2.5.4. Métodos de agrupamento	25
2.5.5. Análise de componentes principais.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Material vegetal	27
3.2. Extração do DNA.....	28
3.3. Quantificação do DNA	29
3.4. Amplificação do DNA.....	30
3.4.1. Padronização das reações de amplificação.....	30
3.4.2. Amplificação do DNA com primers de RAPD.....	30
3.4.3. Amplificação do DNA com primers de microssatélites.....	31
3.5. Análise de dados	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Diversidade de Nei	40
4.2. Coeficientes de similaridade.....	40
4.3. Medidas da distância genética	42
4.4. Métodos de agrupamentos	44
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

LEAL, Ausileide Alves, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, dezembro de 2008. **Potencial do RAPD e de microssatélites para estimar distâncias genéticas em milho pipoca (*Zea mays L.*)**. Professora orientadora: Claudete Aparecida Mangolin; Professores conselheiros: Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

A proposta do presente trabalho foi utilizar os marcadores moleculares RAPD e *loci SSRs* para estimar e caracterizar a divergência genética entre 10 linhagens endogâmicas S₇ de milho pipoca e avaliar a consistência das informações obtidas com o emprego destes dois marcadores. O aproveitamento de primers para RAPD foi de 10,84%. Com os nove primers selecionados, foram produzidos 126 fragmentos amplificados; destes 22 foram monomórficos e 104 foram polimórficos conferindo um polimorfismo de 82,54% para as 10 linhagens avaliadas. Dentre os 51 pares de primers de microssatélites testados, 14 foram selecionados, conferindo um aproveitamento de 27,4%. O polimorfismo para as 10 linhagens, avaliado com os 14 primers de microssatélites, foi de 52,76%. O número de alelos por *locus* de microssatélites para as 10 linhagens de milho pipoca variou de dois a cinco, com um total de 47 alelos para todos os primers usados. O número médio de alelos por *locus* foi 3,36. O polimorfismo de DNA, detectado para as linhagens de milho pipoca analisadas no presente estudo, pode ser considerado alto, uma vez que, utilizando os 9 primers para amplificar sequências aleatórias, a proporção de sequências polimórficas foi igual a 82,54%, e utilizando os 14 primers para *loci SSR* foi possível estimar um valor de heterozigidade média esperada igual a 52,76%, um déficit de heterozigotos igual a apenas 4,5%, e uma diferenciação entre as linhagens de 73,49%. O valor de correlação de Pearson foi de 0,5453 demonstrando que a associação entre os marcadores é positiva. Os dendrogramas construídos com os agrupamentos dos genótipos avaliados em função das distâncias genéticas, estimadas a partir da análise dos *loci SSR* e das sequências de RAPD, mostraram agrupamentos similares formando dois grandes grupos. Desta forma, apesar das indicações de que os microssatélites correspondem a marcadores moleculares mais informativos do que as análises de RAPD, as análises das 10 linhagens de milho pipoca no presente estudo indicaram que ambas as técnicas podem fornecer informações consistentes e no

mesmo sentido para estudar a diversidade genética em milho pipoca, apresentando valores de diversidade e de distâncias genéticas concordantes.

Palavras-chave: Pipoca; *Zea mays* L.; marcadores moleculares.

ABSTRACT

LEAL, Ausileide Alves, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, December, 2008. **RAPD and microsatellites strength for determine the genetic distance in popcorn (*Zea mays L.*)**. Adviser Professor: Claudete Aparecida Mangolin and Committee members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Molecular markers RAPD and *SSRs loci* have been employed to estimate and characterize the genetic divergence between 10 *S*₇ endogamic popcorn strains and evaluate the consistency of information from the above-mentioned markers. Primers efficiency for RAPD reached 10.84%. One hundred and twenty-six amplified primers were produced from the nine selected primers. Since 22 and 104 were respectively monomorphic and polymorphic, an 82.54% polymorphism was established for the 10 strains evaluated. Whereas 14 out of 51 primer pairs of tested microsatellites have been selected and established a 27.4% efficiency, polymorphism for the 10 strains evaluated with 14 primers of microsatellites amounted to 52.76%. Number of alleles per microsatellite *loci* for the 10 popcorn strains ranged between 2 and 5, totaling 47 alleles for all primers used. Mean number of alleles per *locus* was 3.36. DNA polymorphism detected for analyzed popcorn strains may be high since the proportion of polymorphic sequences was 82.54% when the 9 primers to amplify randomized sequences were used. Rate of expected mean heterozygosity was 52.76% when the 14 primers of *SSR loci* were employed. This fact revealed a heterozygote deficit of a mere 4.5%, coupled to a 73.49% differentiation between strains. Since Pearson's correlation rate was 0.5453, association among markers was positive. Dendrograms made up of genotype groupings evaluation according to genetic distances and estimated from *SSR loci* analysis and RAPD sequences showed similar groupings which formed two great groups. In spite of the fact that there are indications that microsatellites correspond to molecular markers which are more informative than RAPD analyses, current analyses of 10 popcorn strains indicate that both techniques may provide consistent and unequivocal information for the study of genetic diversity in popcorn, coupled to an agreement in diversity rates and genetic distances.

Key words: Popcorn, *Zea mays*, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

O valor comercial para o grão de milho pipoca é atribuído de acordo com a capacidade de expansão (CE), que constitui seu principal parâmetro de qualidade e pode ser definida pela relação entre o volume de pipoca e o volume de grãos ou ainda a relação entre o volume de pipoca e o peso de grãos (Alexander e Greech,1977). Técnicas de melhoramento genético visam à obtenção de cultivares de milho de pipoca com alta capacidade de expansão e bons caracteres agronômicos.

Os métodos utilizados para o melhoramento genético do milho comum também podem ser aplicados para o milho pipoca, tais como métodos intra e interpopulacionais, bem como os métodos de obtenção de híbridos.

Para o melhoramento do milho pipoca, têm sido propostas 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 freqüência dos alelos favoráveis na população melhorada, sendo esta superior à original. No segundo caso, a estratégia de melhoramento visa à 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).

As informações sobre a relação genética entre os materiais destinados aos programas de melhoramento são importantes, pois possibilita que a escolha dos parentais para os cruzamentos seja realizada de forma orientada e eficiente. Para os programas de cruzamento que objetivam a produção de milho híbrido, o reconhecimento e a exploração do padrão heterótico é especialmente importante. Segundo Reif et al. (2003) e Oliveira et al. (2004) o cruzamento entre linhagens geneticamente divergentes e pertencentes a grupos heteróticos diferentes produz híbridos melhores do que quando o cruzamento é realizado entre linhagens intimamente relacionadas. Desta forma, o sucesso dos programas de produção de híbridos está associado ao conhecimento destes grupos. Quando os grupos heteróticos em uma coleção de linhagens não estão bem definidos ou estabelecidos, grupos de linhagens geneticamente similares podem ser cruzados,

originando uma descendência uniforme e similar aos parentais, frustrando a expectativa de obtenção de híbridos melhores.

A identificação de linhagens geneticamente similares pode ser baseada no uso de marcadores moleculares, sendo que estes podem ser usados para estimar a distância genética entre elas. Vários marcadores moleculares têm sido empregados para prever o vigor do híbrido. Com um número adequado de marcadores, é possível organizar uma clara estrutura de grupos heteróticos e as linhagens de origem desconhecida podem ser designadas para estabelecer novos grupos heteróticos (George et al., 2004).

Demeke et al. (1997) sugerem o uso combinado de diferentes marcadores, tais como: o polimorfismo de fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição (RFLP; *Restriction Fragment Length Polymorphism*), o polimorfismo de segmentos de DNA amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*; reações em cadeia usando polimerases) com primers aleatórios (RAPD; *Random Amplified Polymorphism DNA*), o polimorfismo de fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição e amplificados por PCR (AFLP; *Amplified Fragment Length Polymorphism*) e a análise de polimorfismos em *loci* de DNA formados por sequências simples repetidas (*loci SSR*; *Simple Sequence Repeated*) também denominados de *loci* microssatélites. A expectativa é de que alguns erros ou problemas apresentados por um marcador possam ser sobrepostos pelo uso de outros marcadores, fornecendo assim informações mais seguras sobre a diversidade genética que quando um só tipo de marcador é utilizado.

Os tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, quanto ao potencial para detectar diferenças entre indivíduos, quanto ao custo, quanto à facilidade de uso, consistência e repetibilidade dos resultados (Schulman, 2007).

Os marcadores moleculares fornecem informações diretamente sobre o material genético (DNA) dos indivíduos (ou genótipos) em estudo; revelam para uma dada região do DNA uma marca ou banda que permite comparar os indivíduos quanto à sua presença ou ausência. As bandas reveladas são codificadas pelo número 1 e as não reveladas pelo número 0. Dessa forma, os dados aos quais serão aplicados métodos estatísticos provêm dessa matriz de uns e zeros.

Métodos estatísticos de análise multivariada, tais como análise de agrupamento e análise de componentes principais, podem ser aplicados para a identificação de genótipos divergentes. Destaca-se a análise de agrupamento por não exigir pressuposição inicial quanto à distribuição de probabilidades de dados e por ser de fácil interpretação. Essa técnica é muito usada por pesquisadores na área de melhoramento genético, em estudos de divergência e estudos evolutivos. A análise de componentes principais é um método que tem por finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

A proposta do presente trabalho foi utilizar dois tipos de marcadores moleculares, RAPD e análise de *loci* SSRs, para estimar e caracterizar a divergência genética entre 10 linhagens de milho pipoca e avaliar de forma comparativa a consistência das informações obtidas com o emprego destes dois marcadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Milho pipoca

O milho pipoca é uma monocotiledônea, pertencente à Família Gramineae (Poaceae), tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie botânica *Zea mays* L. ($2n=20$) (Zinsly e Machado, 1987). Sua origem exata é desconhecida, confunde-se com a origem dos demais tipos de milho.

Existem diversas hipóteses quanto à origem do milho. Beadle (1939) considera ser o teosinte o progenitor do milho moderno. Segundo Mangelsdorf e Galinat (1964), as hipóteses mais aceitáveis são as de que o progenitor do milho atual é um ancestral silvestre do milho da América do Sul, já extinto; que o teosinte primitivo é um híbrido descendente do cruzamento entre o gênero *Tripsacum* e o milho; e que a maior fonte de divergência entre as variedades modernas de milho é devida à introgressão de germoplasma de *Tripsacum*. Para Bennetzen et al. (2001), a teoria do teosinte como ancestral do milho moderno tem sido a mais aceita.

Quanto à origem genética do milho pipoca, Erwin (1949) considera que este é originário de uma mutação do milho de endosperma duro (*flint*). Porém 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).

Em comparação ao milho comum, a planta de milho pipoca é mais susceptível às doenças e pragas, acamamento e quebramento do colmo, podridões de espigas e de grãos, necessitando ainda de cuidados especiais na colheita e secagem dos grãos, para evitar danos no pericarpo e no endosperma (Sawazaki, 2001).

A principal característica que diferencia o milho pipoca dos demais milhos é o tipo de grão, que é duro e pequeno, com pericarpo mais espesso e que, quando aquecido à temperatura de aproximadamente 180°C, estoura transformando-se em pipoca. Zinsly e Machado (1978) explicam que a capacidade que tem o milho pipoca de expandir-se é devida à resistência do seu pericarpo, associada à presença, no grão, de óleo e umidade. Segundo Silva et al. (1993),

quando aquecido, o amido do milho pipoca expande-se, aumentando gradualmente a pressão interna do grão até o momento em que este se rompe, expondo, o endosperma.

Existe uma grande variabilidade no formato, tamanho e cor dos grãos de milho pipoca, sendo as cultivares de grãos amarelos tipo pérola as que têm maior aceitação comercial (Zinsly e Machado, 1987). Em termos comerciais, o valor do grão de milho pipoca é atribuído de acordo com a capacidade de expansão (CE), que confere à pipoca melhor textura e maciez. Segundo Green e Harris (1960), os genótipos com CE menor que 25 mL.g^{-1} são considerados pobres. Se a CE está entre 25 e 30 mL.g^{-1} ela é considerada como regular. Valores entre 30 e 35 mL.g^{-1} são considerados como bons e populações de milho pipoca com CE acima de 35 mL.g^{-1} são classificadas como excelentes.

Dentre os fatores que afetam o “pipocamento” encontram-se a temperatura, teor de umidade (Alexander, 1988; Macedo, 2003) e tamanho do grão (Sawazaki, 1996), além da presença ou não de danos mecânicos e idade fisiológica dos grãos (Jugenheimer, 1976).

Existem poucos estudos detalhados acerca dos aspectos genéticos do milho pipoca. Contudo, tem sido registrado que a CE é um caráter poligênico de herança quantitativa que possui uma distribuição normal, mesmo em amostras separadas de espigas de uma mesma variedade (Andrade, 1995; Lima *et al.*, 2000; Macedo, 2003). Segundo Borém (2001), a maioria das características de importância agrônômica é controlada por um grande número de genes, e estes se encontram dispersos nos cromossomos da espécie. Cada um destes genes contribui com pequeno efeito positivo ou negativo para a expressão da característica. A expressão destes genes ainda está sujeita às variações de ambiente. Em consequência, é difícil conhecer o efeito de cada alelo na expressão do caráter quantitativo, isto é, o quanto cada alelo contribui para o fenótipo (Ramalho *et al.*, 2004).

Os resultados da genética quantitativa clássica e análise estatística tradicional têm mostrado que a característica de “pipocamento”, muito importante para os consumidores, é herdada quantitativamente e controlada por muitos genes (Zeigler, 2001; Li, 2007), sendo, ainda, influenciada por efeitos ambientais (Li, 2007) e pelos métodos de “pipocamento” (Dofing *et al.*, 1991; Li, 2007). O efeito individual de cada loco quantitativo pode ser determinado por meio do uso

de marcadores moleculares e, para isso, é necessário que se disponha de um mapa molecular saturado, para assim determinar quanto de um caráter quantitativo é explicado por um ou mais marcadores (Ramalho et al., 2004).

2.2. Melhoramento genético do milho pipoca

Existem algumas dificuldades adicionais no trabalho de melhoramento genético do milho pipoca quando comparado com o milho comum, pois ao agricultor interessa produtividade elevada, enquanto para o consumidor interessa alta capacidade de expansão (Scapim et al., 2002). O fato de a produtividade de grãos estar inversamente correlacionada à capacidade de expansão (Sawazaki, 1995; Coimbra et al., 2001; Miranda, 2003) dificulta o ganho de seleção simultâneo quanto às duas características no melhoramento populacional. Ao melhorista cabe, então, a tarefa de romper essa correlação negativa, oferecendo um produto intermediário e que satisfaça tanto produtores como consumidores (Zinsly e Machado, 1987).

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 à 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, 2003).

Por meio do melhoramento e do desenvolvimento de tecnologia de produção específica para o milho pipoca, conseguiu-se um aumento significativo na qualidade da pipoca nos Estados Unidos, e este fato contribuiu para a ampla aceitação dos híbridos americanos no mercado nacional, tornando o Brasil um país importador de grãos de milho pipoca (Sawazaki, 2001). Uma comparação entre os cultivares brasileiros e norte-americanos de milho pipoca tem mostrado que a qualidade da pipoca brasileira é muito inferior à da norte-americana.

No primeiro Ensaio Nacional de Milho Pipoca, conduzido no ano agrícola 1991/92, a capacidade de expansão (CE) média foi de 17,5 mLmL⁻¹ e a média do

melhor cultivar foi de 20,8 mLmL⁻¹ (Andrade, 1995). Na década de 40, a CE de híbridos e variedades comerciais nos Estados Unidos variava de 23,2 a 32,7 mLg⁻¹.

O melhoramento do milho pipoca no Brasil ainda tem sido considerado muito incipiente, porque são poucas as variedades e híbridos nacionais melhorados geneticamente, com alta produtividade e qualidade (Vilarinho et al., 2003). 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. Até o início do ano agrícola 2003/2004, o consumo nacional de milho pipoca estava em torno de 80 mil toneladas, sendo que 75% deste mercado correspondiam ao milho pipoca americano, importado principalmente da Argentina (Scapim et al., 2006). Na safra 2004/2005, segundo informações das empacotadoras, houve uma inversão no panorama nacional; com a entrada do híbrido simples modificado IAC-112 a importação brasileira foi de 20 mil toneladas (Scapim et al., 2006).

Dados da CONAB (2004) registram que, com o lançamento de novas cultivares e bons híbridos no mercado, as empresas empacotadoras incentivam e financiam a produção de milho pipoca por meio de sistema integrado com produtores, aumentando gradativamente a qualidade do produto no mercado interno. Em razão destes altos investimentos, o milho pipoca vem sendo cultivado em diversas regiões do país (Sul, Centro-Oeste e Sul da Bahia) invertendo o quadro de importações para este milho no Brasil.

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), além de iniciativas privadas como o Instituto Agrônomo de Campinas e o Centro Nacional de Milho e Sorgo da EMBRAPA. Os trabalhos baseiam-se no melhoramento intrapopulacional e no desenvolvimento de híbridos de linhagens.

O acesso e o uso da diversidade genética têm sido apresentados como a base para efetuar os cruzamentos nos programas de melhoramento genético. Em milho, um diverso conjunto de genes permite a manipulação de diferentes genótipos que tem conduzido à produção de híbridos melhorados tanto para produção, resistência a doenças e outras características de interesse agrônomo.

Muitos programas de melhoramento em milho são baseados no desenvolvimento e seleção de linhagens com o objetivo de produzir híbridos superiores. O mecanismo de desenvolvimento e seleção de linhagens para *performance per se* é fácil, mas consome tempo. Também não é possível prever a *performance* do híbrido a partir da *performance* parental, isto por causa do alto efeito de dominância para algumas características de interesse, por exemplo, para a produção de grãos (Shieh e Thseng, 2002).

Para aumentar a eficiência dos programas de cruzamentos, é importante determinar a distância genética entre os parentais e isto pode ser feito através 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).

2.3. Heterose e diversidade genética

O fenômeno da heterose foi originalmente proposto por Shull em 1909, para designar o vigor de híbrido manifestado em gerações heterozigotas que são provenientes de cruzamento entre indivíduos endogâmicos e geneticamente divergentes. De uma maneira mais simples, a heterose seria a superioridade do híbrido em relação à média dos parentais.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ação gênica responsável pela manifestação da heterose. De acordo com Crow (1948), as duas principais teorias são: (1) dominância, que explica a heterose pelo acúmulo, no híbrido, de genes dominantes oriundos de ambos os pais. Nessa teoria os alelos recessivos que são potencialmente deletérios ficariam ocultos nos heterozigotos obtidos em F1 e os prejuízos decorrentes da homozigose para esses alelos seriam evitados e, (2) sobredominância, teoria que propõe que o vigor apresentado pelas plantas F1 seja devido à elevada heterozigosidade, que a união das duas formas alélicas do heterozigoto seja superior à ação separada de qualquer um dos alelos em homozigose; a variabilidade das formas protéicas em plantas heterozigotas as tornaria mais eficientes frente à variação de condições ambientais (Springer e Stupar, 2007).

Segundo Maluf (2001), as duas teorias não são exclusivas e admite-se que os genes envolvidos tenham um grau médio de dominância diferente de zero, isto é, que a ação gênica não seja exclusivamente aditiva. De acordo com o mesmo autor, as interações inter-alélicas (epistasia) também podem explicar a heterose em alguns cruzamentos.

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).

Um dos objetivos do programa de melhoramento genético de milho pipoca, em longo prazo, é a exploração da heterose ou vigor do híbrido (Simon et al., 2004). Este método, utilizado nos Estados Unidos desde a década de 1930, foi o responsável pelo grande progresso obtido nessa cultura. Sua utilização é recente no Brasil, embora o primeiro programa de milho híbrido tenha sido iniciado em 1932 no Instituto Agrônomo (Krug et al., 1943).

A escolha e formação de populações base sobre a qual a seleção atuará é importante num programa de melhoramento cujo objetivo seja produção de híbridos. Desta forma a análise de diversidade genética visa à identificação de genitores para a formação de populações com variabilidade genética. Vários métodos são empregados com o objetivo de pré-selecionar os parentais e conseqüentemente predizer o desempenho de seus híbridos. A formação de grupos heteróticos é um método tradicionalmente empregado. Segundo Lee (1995), grupo heterótico é uma coleção de germoplasma que, quando cruzada com germoplasmas externos, geralmente de outro grupo heterótico, tendem a exibir maior grau de heterose do que quando os cruzamentos são realizados com plantas do mesmo grupo.

Como a divergência genética pode estar associada à heterose, as análises de divergência genética podem ser úteis para a predição preliminar de cruzamentos que otimizem a heterose (Miranda, 2003). Melchinger (1999) considera que a exploração máxima da heterose poderá ocorrer através de produções e avaliações de cruzamentos dialélicos entre os genótipos de cada grupo. A forma mais recentemente utilizada para predizer o desempenho de híbridos é a formação de grupos heteróticos, com o auxílio de marcadores moleculares; estes marcadores moleculares são fragmentos cromossômicos que podem ser utilizados para detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos (Borém, 2001).

Desta forma, a caracterização de um genótipo ou o cálculo da similaridade genética entre os indivíduos pode ser realizada de diferentes maneiras, podendo ser baseado em análises de genealogia, análise de caracteres morfológicos e também por meio de marcadores moleculares em nível de DNA (Kumar, 1999).

2.4. Marcadores moleculares

A diversidade genética em plantas tem sido eficientemente determinada após a introdução de métodos que avaliam o polimorfismo diretamente em nível bioquímico, com a análise de proteínas e enzimas, e em nível de ácidos nucleicos, particularmente de DNA. Isto porque as estimativas da diversidade genética são a base para os programas de cruzamentos que visam o melhoramento genético. Em milho, um grande e diverso conjunto de genes permite a manipulação dos diferentes genótipos, e isto tem garantido um melhoramento para a *performance* de híbridos, tanto em termos de produção, resistência a doenças, e também para outras características de interesse agrônômico. Os marcadores isoenzimáticos (Prince et al., 1986; Lankey et al., 1997) e os marcadores de RFLP (Lee et al., 1989; Bernardo, 1994) foram os primeiros marcadores moleculares usados nos programas de melhoramento de milho. Mais recentemente, marcadores baseados em *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tais como *Random Amplified Polymorphic DNA* ou RAPD (Williams et al., 1990) têm sido utilizados para analisar a distância genética para várias espécies de plantas (Gunter et al., 1996; Lashermes et al., 1996; Samec e Nacinec 1996; Irvin et al., 1998; Colombo et al., 2000).

Os marcadores moleculares representam ferramentas poderosas, com diversas aplicações, entre elas, estudos de evolução, domesticação de espécies, ecologia, filogenia, mapeamento genético e clonagem de genes. O uso de marcadores possibilita um amplo acesso ao genoma do organismo estudado, de maneira rápida e eficiente (Kumar, 1999).

O poder de discriminação dos fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição no método denominado RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) tem sido extensivamente estudado em milho, e tem sido estabelecido o seu uso em relação à produção e heterose (Melchinger, 1993). Entretanto uma série de inconvenientes associados com este marcador estimulou o desenvolvimento de sistemas de marcadores alternativos. Os inconvenientes impostos pelo método RFLP são a grande quantidade de DNA requerida, o alto custo e a impossibilidade de automatização da técnica. Este marcador requer laboratórios bem montados com equipamentos especializados (Pejic et al., 1998).

Os vários marcadores baseados em reações em cadeia de ampliações de segmentos de DNA usando enzimas polimerases, denominada de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem sido introduzidos com sucesso para realizar um *fingerprinting* do genoma de plantas (Welsh e McClelland, 1990; Kesseli et al., 1994; Romero-Severson et al., 2001), e para estudar a diversidade genética (Moeller e Schaal, 1999; Carvalho et al., 2004; Menkir et al., 2004). Entre eles, o polimorfismo de sequências de DNA amplificadas com primers aleatórios, denominados marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), tem sido descrito como uma metodologia sensível e eficiente para detectar variação genética (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990); estes marcadores são de fácil utilização e os resultados obtidos são fáceis de serem analisados.

Os marcadores de RAPD tem sido destacados pelo potencial em avaliar regiões de DNA que aparentemente evoluem mais rapidamente do que alguns marcadores bioquímicos tais como as isozimas (Brauner et al., 1992; Baruffi et al., 1995). Além disso, um grande conjunto de informações pode ser obtido de forma rápida e sem grandes custos. Por outro lado, o RAPD tem sido severamente criticado, pois a origem do polimorfismo não é compreendida, a homologia de bandas em reconstruções filogenéticas não pode ser suposta (Rieseberg 1996), e em muitos casos o padrão de bandas não é confiável e nem reproduzível (Jones et al., 1997; Perez et al., 1998). Apesar destas críticas, muitos pesquisadores tem

demonstrado que este marcador pode gerar informações consistentes quando comparados com resultados obtidos com outras técnicas, particularmente em análises dentro da espécie (Lerceteau et al., 1997; Clerc et al., 1998).

Segundo alguns autores (Munthall et al., 1992), o uso do mesmo conjunto de condições e parâmetros, otimizados especificamente para uma cultivar ou espécie, poderia produzir homologia para o padrão de amplificação. Penner et al. (1993) descreveram que a reprodutibilidade de resultados obtidos com RAPD pode ser obtida entre laboratórios. Desta forma, superar as limitações de RAPD e tornar este um marcador que produz resultados mais confiáveis envolve: a padronização dos parâmetros de reação, desenvolvimento de primers para o marcador SCAR, seleção dos primers mais adequados, utilização de vários primers e considerar para a análise somente os fragmentos reproduzíveis (Demeke et al., 1997).

O fato dos genomas de eucariontes serem intercalados com sequências simples repetidas de DNA estimulou o desenvolvimento de outro método para a análise molecular do genoma destes organismos. Estas sequências foram denominadas de microssatélites ou *loci SSR (Simple Sequence Repeats)* (Tautz, 1989). O polimorfismo em *loci SSR* tem sido amplamente utilizado como marcadores genéticos em mamíferos (Tautz, 1989); estas sequências ocorrem também frequentemente em genomas de plantas, apresentando uma grande variação para diferentes indivíduos e acessos (Akkaya et al. 1992; Senior e Heun 1993; Wu e Tanksley 1993; Menkir et al., 2004). Os *loci* de *SSRs* são marcadores co-dominantes e mais informativos do que os marcadores RAPD e RFLP (Russell et al., 1997). O desenvolvimento de técnicas específicas e que são passíveis de automatização, tal como a PCR, tornou este marcador mais efetivo e mais rápido do que RFLP (Mitchell et al., 1997).

Outro tipo de marcador baseado em reações em cadeia de ampliações de segmentos de DNA usando enzimas polimerases (PCR) foi denominado de *AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)*; este é um marcador multi-*loci* e foi desenvolvido por Vos et al. (1995). Os marcadores AFLP são fragmentos genômicos produzidos por enzimas de restrição e detectados após uma amplificação seletiva que produz um bom número de marcas (fragmentos amplificados). Este marcador é interessante, pois pode ser utilizado para realizar um *fingerprinting* em genomas de diferentes complexidades, incluindo o genoma

de milho (Vos et al., 1995). O AFLP tem sido empregado para identificar sequências de DNA ligada a *loci* de resistência à doenças (Becker et al., 1995; Cervera et al., 1996), para *fingerprinting* de DNA (Vos et al., 1995; Sharma et al., 1996; Laborda et al., 2005; Oliveira et al., 2004) e para estimar a relação entre polimorfismo molecular e a performance de híbridos de milho (Ajmone-Marsan et al., 1998). Kjolner et al. (2004) concluíram que apesar da análise com AFLP ser superior ao RAPD quanto à eficiência, este último pode ser utilizado como um marcador confiável em pequenos laboratórios que possuem pouca estrutura tecnológica.

Demeke et al. (1997) sugerem que o uso combinado de diferentes marcadores, tais como, RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites, 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 marcadores.

2.4.1. Marcadores RAPD

A técnica RAPD foi descrita, independentemente por dois grupos de pesquisadores, Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990), que a denominaram, respectivamente, de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), e *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction* (AP-PCR). Constituindo-se basicamente, em uma variação do protocolo da PCR, RAPD tem sido a denominação mais utilizada e envolve a amplificação simultânea de várias sequências aleatórias do genoma, utilizando um único primer (oligonucleotídeo) de sequência arbitrária para realizar esta amplificação (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al. 1990). Desta forma, são amplificadas sequências de DNA distribuídas ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência do DNA (Caixeta et al., 2006).

A partir do desenvolvimento da técnica RAPD na década de 90, esta vem sendo amplamente utilizada para estudar genética de populações, pois os produtos de DNA amplificados cobrem tanto regiões codificadoras como não codificadoras do genoma. Kazan et al. (1993); Liu et al. (1994); Rus-Kortekaas et al. (1994); Thormann et al. (1994); Albo-Elmafa e Shimada, (1995); Brummer et al. (1995) e Sun et al. (1997) usaram RAPD, tanto para examinar variações

intraespecíficas como interespecíficas para várias espécies de plantas. Stojisin et al. (1996) também usaram RAPD com o objetivo de fazer a caracterização de milhos híbridos.

Segundo Salem et al. (2007), os marcadores RAPD podem ser utilizados com diferentes finalidades para estudo de genética de plantas: a) diversidade genética, variações e relações genéticas; b) detecção, localização e/ou identificação de marcadores moleculares ligados a uma característica específica; c) detecção de híbridos; d) mapas genéticos; e) análise de variação somaclonal. Estes autores descreveram o emprego deste marcador, com diferentes finalidades, em espécies economicamente importantes como arroz, milho, trigo, sorgo, cevada, centeio e aveia.

Este marcador tem sido bastante utilizado e apresenta vantagens em relação aos demais. Entre as frequentemente citadas, pode-se destacar simplicidade e rapidez operacional, ou seja, gera um grande conjunto de dados de forma rápida e com menor trabalho; além de não requerer isolamento de uma sonda específica, custo relativamente baixo e permitir um número ilimitado de marcadores devido à ocorrência de um número maior de anelamentos (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Binneck, et al., 2002). Outra vantagem para o uso de RAPD é que nenhuma informação prévia do genoma é necessária (Fischer et al., 2000; Klinbunga et al., 2000).

O primeiro passo para a utilização desta técnica é a seleção dos primers a serem utilizados, que deve basear-se na seguinte ordem: revelar diferenças, produzir bandas bem definidas e favorecer um padrão reproduzível (Loxdale et al., 1996; Demeke et al., 1997).

Na técnica RAPD, a detecção dos produtos de amplificação é feita, geralmente, em géis de agarose, separados por eletroforese e corados com brometo de etídio, sendo posteriormente visualizado sob luz ultravioleta (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Caixeta et al., 2006). Uma vez amplificado, o DNA pode ser usado em uma variedade de procedimentos analíticos.

Em RAPD, verifica-se o polimorfismo para as sequências de DNA amplificadas quando: a) não ocorre pareamento do primer com uma região homóloga do genoma ou este pareamento é dificultado, em consequência não há amplificação desta região e o resultado é a não formação de bandas; b) ocorre alteração do comprimento da região a ser amplificada (por duplicação, inserção ou

eliminação de nucleotídeos), resultando no aparecimento de bandas com número de pares de bases diferentes (Milach, 1998). Sendo assim, o polimorfismo é evidenciado em razão da presença ou ausência de bandas após a amplificação e separação por eletroforese em gel.

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Portanto, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD possui natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Enquanto o genótipo homocigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel, os genótipos homocigoto dominante (AA) e heterocigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, isto é, como a presença da banda no gel (Williams, et al., 1990; Carlson et al., 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1996; Milach, 1998). As bandas reveladas são codificadas pelo número 1 e as não reveladas pelo número 0. Dessa forma, os dados aos quais serão aplicados métodos estatísticos provêm dessa matriz de uns e zeros.

2.4.2. Marcadores SSR (Sequências Simples Repetidas) ou microssatélites

O genoma de eucariotos apresenta várias classes de sequências de bases repetidas e uma destas consiste de segmentos curtos que foram denominados como motivos. Estes motivos são repetições em *tandem* (repetições sequenciais) de uma, duas, três, ou até seis pares de bases nucleotídicas (pb); dentre os diversos motivos, as repetições de dinucleotídeos (dois pares de bases) são as mais abundantes. Essas sequências repetidas podem diferir no número de repetições entre os diferentes indivíduos (Schlötterer, 2000) e podem estar distribuídas aleatoriamente por meio do genoma (Jacob et al., 1991). Com o advento da técnica da PCR, as propriedades de DNA microssatélites foram convertidas em um marcador genético altamente versátil. Estes marcadores foram denominados microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989).

Segundo Shagai-Marroof et al. (1994), os microssatélites são marcadores moleculares muito usuais, pois são: 1) abundantes, 2) uniformemente distribuídos, 3) altamente polimórficos, 4) co-dominantes, 5) proporcionam rápida obtenção de resultados por PCR, 6) são relativamente simples para interpretar e 7) facilmente

acessados por outros laboratórios, pois as sequências de primers estão disponíveis na literatura especializada. Gupta et al. (1996) descreveram que o marcador microssatélite é uma técnica baseada na amplificação das sequências repetidas. As sequências de DNA que flanqueiam a região variável dos *loci SSRs* são conservadas e são utilizadas para sintetizar pares de primers (Schlötterer, 2000). O par de primers é utilizado para a amplificação dos *loci SSR*. O polimorfismo é detectado quando existe diferença no produto amplificado. Esta diferença é resultante de produtos de amplificação (sequências de bases) com variação no comprimento (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989). Após a amplificação por meio da PCR, os produtos da amplificação de *loci SSR* podem ser separados por meio de eletroforese em géis de agarose de alta resolução. Para a detecção de pequenas diferenças nos produtos de amplificação, utiliza-se preferencialmente gel de poliacrilamida corado com prata. Os resultados também podem ser analisados por autoradiografias quando os produtos dos *loci SSR* são marcados com isótopos radioativos. A amplificação de diferentes *loci SSR* pode ser realizada por meio de PCR *multiplex*. Este tipo de avaliação é possível graças ao uso de corantes fluorescentes específicos para cada par de primer usado na amplificação dos diferentes *loci SSRs* (Gupta et al., 1996). Cada fragmento produzido por meio da amplificação, separado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), ou em gel de agarose de alta resolução (Becker e Heun, 1995), representa um alelo do *locus* (Gupta et al., 1996).

A hipervariabilidade de microssatélites não é totalmente entendida, podendo ser decorrente de *crossing-over* desigual, ou devido ao deslizamento de sequências durante a replicação do DNA. Durante a replicação do DNA, a sequência de nucleotídeos nova pareia-se com a sequência de nucleotídeos molde. Se o pareamento for feito com uma repetição errada na sequência original, a DNA polimerase pode adicionar ou deletar uma ou mais cópias da repetição na nova sequência de DNA, em um processo conhecido como *slippage* (Tautz et al., 1986). Estes eventos podem resultar em variação do número de cópias da unidade básica de repetição (Schlötterer e Tautz, 1992). Evolutivamente o DNA microssatélite é muito importante como marcador em razão de sua taxa de mutação que tem sido considerada como altíssima. A suposição de alguns autores é a seguinte: é 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder

uma repetição de uma geração para a próxima, do que o gene para hemoglobina sofrer mutação em uma única base, promovendo a desordem denominada anemia falciforme, por exemplo. Além disso, um microsatélite pode retornar ao seu estado de comprimento original dentro de poucas gerações (Moxon e Wills, 1999).

O extensivo uso de microsatélites para estudos de variação genética ocorre em função da sua abundância, hipervariabilidade no comprimento de seus alelos, distribuição casual nos diversos genomas e pequena quantidade de DNA, usada para a amplificação e subsequente análise (Kun-Sheng e Tanksley, 1993). Os microsatélites ocorrem frequentemente 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). Trata-se de um marcador co-dominante, apresentando segregação mendeliana simples e, graças à sua hipervariabilidade, ele é um importante marcador para o mapeamento genético de 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 *loci SSR* é a obtenção dos primers específicos que flanqueiam as repetições. Para a obtenção destes primers, há a necessidade da construção de bibliotecas genômicas e do sequenciamento de DNA em larga escala, um investimento inicial que é alto e requer infraestrutura especializada de laboratório (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. Os marcadores microsatélites são apresentados, portanto, como ferramenta eficiente na identificação e diferenciação de indivíduos.

2.4.3. Associação entre diferentes marcadores moleculares

Na literatura especializada, são encontrados cerca de duas dezenas de trabalhos que exploram a combinação e/ou comparação dos marcadores moleculares. Hahn et al. (1995), Smith et al. (1997), Ajmone Marsan et al. (1998) e Pejic et al. (1998) comparam diferentes marcadores para estudar a diversidade genética em milho e relatam que esta comparação permite avaliar a eficiência

relativa das diferentes técnicas disponíveis. Demeke et al. (1997) sugerem que o uso combinado de diferentes marcadores moleculares, tais como, RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites podem fornecer melhores informações do que quando um só tipo de marcador é utilizado.

Sun et al. (2001) comparam o polimorfismo obtido para 28 híbridos de milho canadense por meio dos marcadores RAPD e microssatélites. Com esta comparação, obtêm diferenças entre os dois marcadores, sendo o maior nível de diversidade obtido por microssatélites em relação ao RAPD e atribuem as diferenças obtidas, em função das diferenças genéticas entre os híbridos avaliados e escolhidos e/ou em função das regiões do genoma do milho acessadas por estes dois marcadores. Estes autores registram que os dados obtidos com microssatélites vêm aumentando consideravelmente e indicam também que o nível de polimorfismo obtido com este marcador é maior do que o obtido com RFLP.

Messmer et al. (1991), Liu e Furnier (1993) e Sun et al. (1999) discutem outros fatores que afetam a correlação entre marcadores moleculares e sugerem que estas diferenças podem estar associadas com a natureza do polimorfismo genético detectado pelos diferentes tipos de marcadores e com a diferença no número de sondas ou primers utilizados. Rus-Kortekaas et al. (1994), Russell et al. (1997) e Sun et al. (1999) relatam que o nível de polimorfismo aumenta de acordo com a sequência de marcadores apresentada: isozimas < RAPD < microssatélites.

Garcia et al. (2004) avaliam a diversidade e a distância genética entre linhagens de milho tropical e concluem que as populações de milho tropical e temperado diferem geneticamente umas das outras, pois populações tropicais geralmente foram originadas de compostos com mais alta variabilidade genética. Estes autores relatam que para formar grupos heteróticos bem definidos é importante o uso de diferentes marcadores moleculares. Indicaram que todos os marcadores utilizados, exceto o RAPD, foram consistentes para estudar a diversidade em populações de milho tropical e produziram estimativas das distâncias genéticas com boa correlação.

Os autores supracitados descrevem que os marcadores que apresentaram maior número de fragmentos polimórficos foram AFLP e RFLP. A correlação genética calculada para as avaliações realizadas com estes dois

marcadores foi alta. Justificam esta alta correlação pelo fato dos dois marcadores apresentarem princípios técnicos similares, ambos avaliam sítios de restrição do genoma. Consideram que RFLP parece ser o marcador mais “robusto” (eficiente) em termos de quantidade de polimorfismo avaliado, apesar de na prática ele ser uma técnica muito trabalhosa. Segundo estes autores o sistema AFLP apresenta bom nível de precisão para estimativas de distância genética e predição de cruzamentos. Os resultados obtidos com AFLP foram altamente correlacionados com os resultados obtidos com RFLP, sendo que o primeiro é um sistema mais rápido e que não requer prévio conhecimento de sequências de DNA. Em estudos anteriores, Russell et al. (1997); Pejic et al. (1998) também consideram AFLP como marcador eficiente, capaz de produzir um grande número de bandas em cada ensaio, indicando que pode ser aplicado para qualquer espécie de planta, sem que haja prévio conhecimento da sequência de DNA.

Sendo assim, os autores sugerem AFLP por considerarem a melhor opção para avaliar a diversidade e estimar a relação genética entre linhagens de milho tropical, apresentando bom nível de precisão para estimativas de distância genética e predição de cruzamentos. Também foi descrito neste trabalho que os marcadores SSRs foram promissores em termos de polimorfismo e conteúdo de informações revelada, mas que este marcador pode apresentar alguns custos iniciais adicionais associado com o desenvolvimento de primers.

Em função das características dos marcadores AFLP e SSR, estes foram utilizados em vários estudos para estimar a diversidade genética em diferentes espécies, tais como: cana-de-açúcar (Lima et al., 2002), trigo (Plaschke et al., 1995; Manifesto et al., 2001), algodão (Liu et al., 2000; Abdalla et al., 2001), soja (Priolli et al., 2002) e sorgo (Smith et al., 2000; Ghebru et al., 2002).

Laborda et al. (2005) utilizam AFLP e SSR para estudar linhagens de milho tropical. Consideram que, embora apresentem diferentes aspectos genéticos, ambos são técnicas muito reproduzíveis e os resultados obtidos por estes dois marcadores são na maioria das vezes correlacionados. Em seu estudo, em um só gel de AFLP detectam 98 bandas com uma taxa de 89% de polimorfismo. Ao testar 109 *loci* de microssatélites, somente 37 foram aproveitados. Justificam o baixo aproveitamento em função dos primers terem sido desenvolvidos para linhagens de milho temperado e terem sido usados para estudar linhagens tropicais. Em contraste com a eficiência dos ensaios

empregando AFLP, os ensaios com SSR detectam um só *locus* por vez no gel. Entretanto, possui o potencial para detectar múltiplos alelos em um só *locus*. Segundo os autores, esta característica torna SSR mais apropriado para muitos estudos de diversidade. Consideram também que para microssatélites existe uma pequena diferença entre os alelos, havendo, muitas vezes, a necessidade de separá-los em géis de poliacrilamida em vez de em géis de agarose.

Henderson e Petes (1992) discutem que o valor de PIC para microssatélite muitas vezes pode ser baixo. Segundo estes autores, o valor de PIC revela não somente a presença dos muitos alelos, mas também as suas frequências. Valor baixo para PIC pode retratar a presença de alelos raros, isto é aqueles que estão em baixa frequência. Para Sênior et al. (1998), a presença de alelos raros para microssatélites pode ser explicada em função da alta taxa de mutação descrita para este marcador, ou mesmo pela introdução de germoplasma exótico.

Considerando as diferenças descritas para os diferentes tipos de marcadores, Manifesto et al. (2001) descrevem que, quando os resultados obtidos com SSR e AFLP para trigo foram comparados, uma baixa correlação ($r= 0,27$) foi encontrada. Já os estudos realizados por Pejic et al. (1998) e Barbosa et al. (2003) apontam para uma correlação alta para os resultados obtidos por estes dois marcadores. Provavelmente as discordâncias nos resultados obtidos para as análises de linhagens, realizadas por um tipo ou outro de marcador, é um reflexo do nível de diversidade para o material analisado e também pelos diferentes níveis de variação estimados por cada tipo de marcador. De acordo com Li et al. (2001), a inconsistência entre diferentes marcadores, especialmente para linhagens, é resultante do fato que marcadores avaliam diferentes fontes de variações do DNA, e que estas podem evoluir por diferentes vias. As mutações avaliadas por AFLP são menos frequentes que as avaliadas por SSR. Portanto, os resultados obtidos pelo primeiro marcador revelam mais alto valor de similaridade, podendo resultar em grupos mais consistentes. Marcadores SSRs maximizam as diferenças entre linhagens, pois podem avaliar a diversidade de outra forma que AFLP, medindo as diferenças em micro-nível.

Laborda et al. (2005) descrevem que os marcadores AFLP, que obtêm menor polimorfismo, são mais apropriados para análises de *pedigree* do que marcadores microssatélites. Com marcadores SSR, é possível detectar pequenas

diferenças. O alto nível de polimorfismo obtido por este marcador o torna inadequado para estabelecer a relação de *pedigree* entre cultivares, sendo mais usual para a análise da variabilidade genética, devido aos eventos de *slippage* e *crossing-over* desigual, que levam à formação de múltiplos alelos; cada linhagem pode ser agrupada em diferentes categorias tornando-o adequado para estudar a real variabilidade genética entre genótipos e distinguí-los com o propósito de cruzamentos. Estes autores relatam que todos os tipos de marcadores são capazes de revelar a diversidade genética, mas, em função das diferentes formas com que estes marcadores estimam esta diversidade, alguns podem subestimar a divergência genética exibida pelos genótipos.

2.5. Análise da diversidade genética

Atualmente diferentes métodos estão disponíveis para analisar a diversidade genética em acessos de germoplasmas, linhagens e populações. Esses métodos são baseados em informação de progenitores, relativos a dados morfológicos, desempenho agrônômico, dados bioquímicos e moleculares (DNA). A utilização de cada método depende da fonte de dados que se pretende analisar a diversidade genética.

Em geral, diferentes métodos geram diferentes tipos de informação. Portanto, a escolha do método para estudar a diversidade genética depende do objetivo do experimento, níveis de resolução requerida, disponibilidade de recursos, infraestrutura tecnológica, restrição operacional e tempo.

Os marcadores moleculares são ferramentas que podem ser utilizadas para medir e quantificar a variabilidade genética e diagnosticar a estrutura de uma determinada população. As medidas de variabilidade mais utilizadas são: número médio de alelos por locos, proporção de locos polimórficos e a diversidade genética de Nei (Nei,1973). A estrutura genética entre populações a partir de dados de marcadores genéticos pode ser realizada pela estatística F de Wright (F_{IT} , F_{ST} , F_{IS}), utilizada para medir o grau de fixação gênica em uma população.

Para a análise de divergência genética com o uso de marcadores moleculares, frequentemente, são utilizadas técnicas multivariadas, como a análise de agrupamento e a análise de componentes principais.

A análise de agrupamento (*cluster analysis*) tem por finalidade reunir, por algum critério de classificação, os genitores em grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Alternativamente, as técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo, ainda, dividir um grupo original de observações em vários grupos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (Cruz, 1990). É realizada através de duas etapas: a primeira é gerar uma matriz de distância (de similaridade ou dissimilaridade) entre os indivíduos e a segunda, aplicar um algoritmo de agrupamento na matriz que identifica e reúne grupos homogêneos.

A análise de componentes principais consiste em transformar um conjunto original de variáveis em outro conjunto de dimensão equivalente, mas com propriedades importantes, que sejam de interesse em estudos de melhoramento. Além disso, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação em termos de variação total contida nos dados originais (Cruz, 1990).

Segundo Cruz & Regazzi (1997), a viabilidade de utilização dos componentes principais em estudos de divergência genética depende da possibilidade de resumir o conjunto de variáveis originais em poucos componentes, o que significa ter uma boa aproximação do comportamento dos indivíduos, oriundos de um espaço n-dimensional (n= número de caracteres estudados), em um espaço bi ou tridimensional.

2.5.1. Diversidade de Nei

O índice de diversidade de Nei (1973) utiliza frequências gênicas (frequências de alelos) para a partição hierárquica da diversidade em seus componentes entre e dentro das unidades experimentais (Alfenas, 2006). A unidade pode ser a espécie ou uma população grande constituída por várias subpopulações ou demes.

Vários níveis hierárquicos podem ser admitidos e os componentes da diversidade total podem ser calculados como:

$$H_T = 1 - \sum p_i^2$$

em que:

H_T = diversidade total da espécie, considerando um único loco; e

\bar{p}_i = frequência média do alelo i em um dado loco, na espécie como um todo (média sobre populações).

A diversidade total (H_T) é constituída por:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

em que:

H_S = componente da diversidade dentro da população; e

D_{ST} = componente entre populações, dentro da espécie considerada.

A proporção da diversidade genética atribuída ao componente entre populações é estimada por G_{ST} :

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

A diversidade total da espécie (H_T), quando se consideram vários locos, é calculada pela média aritmética dos valores estimados para cada loco separadamente.

2.5.2. Coeficientes de similaridade

Em estudo de similaridade genética é necessário o estabelecimento de um coeficiente de similaridade entre dois indivíduos, sendo este o ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Krzanowsky, 1998).

Existem diversos coeficientes de similaridade que podem influenciar as análises subseqüentes de agrupamento e a ordenação dos genótipos estudados. Segundo Dias (2006), a escolha do coeficiente mais adequado está diretamente relacionada com as propriedades inerentes a cada coeficiente. Aspectos como a natureza dos dados e o tipo de análise a ser implementada são igualmente fundamentais para auxiliar na escolha.

Os coeficientes de similaridade visam representar a relação linear entre dois genótipos avaliados com base em uma matriz binária de presença:ausência,

gerada a partir de análises moleculares. Disponíveis para dados binários, baseiam-se na comparação entre o número de atributos comuns para um par de objetos e o número total de atributos envolvidos. Tais coeficientes podem ser convertidos para coeficientes de dissimilaridade; sendo a matriz de dissimilaridade para dados moleculares dicotômicos, que envolve a presença (1) e a ausência (0) de bandas, obtida por meio do complemento aritmético de um índice de similaridade ($d_{gij} = 1 - s_{gij}$). A similaridade (s_{gij}) é uma medida estabelecida entre um genótipo (i) e outro (j), sendo expressa em valores que variam entre 0 e 1 (Cruz & Carneiro, 2003). Segundo esses autores, as estimativas de dissimilaridade quantificam e informam sobre o grau de semelhança ou de diferença entre dois quaisquer genótipos. Entretanto, se o número de estimativas obtidas for grande, o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual daquelas estimativas se torna impraticável. Assim, para realizar esta tarefa, faz-se uso de métodos de agrupamento ou de projeções de distâncias em gráficos bidimensionais, em que cada coordenada é obtida a partir da medida de dissimilaridade escolhida.

Entre os numerosos coeficientes de similaridade propostos na literatura, o coeficiente de Jaccard é apontado por DIAS (2006) como amplamente utilizado em estudos de biologia e o mais adequado para comparar populações dentro de uma mesma espécie.

2.5.3. Medidas da distância genética

A distância modificada de Rogers tem como base a distância euclidiana, utilizando-se também de estimativas de freqüências alélicas. No entanto, é de mais fácil aplicabilidade do que a distância euclidiana, pois os seus valores situam-se no intervalo de 0 e 1, constituindo uma medida métrica de fácil interpretação, ao contrário da distância euclidiana, nos quais os valores variam de 0 a $\sqrt{2}$. Se p_i e q_i correspondem às freqüências do alelo i no loco j, nas respectivas populações P e Q, e tomando m como o número de locos contendo os alelos estudados, a distância entre as populações P e Q (d_{PQ}) se estima por:

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

Outra vantagem da distância de Rogers é a possibilidade de comparação de duas ou mais medidas de Rogers, uma vez que o número de locos envolvidos é levado em conta no cálculo da distância.

2.5.4. Métodos de agrupamento

Dias (2006) aponta que a literatura revela numerosos métodos de agrupamento para a utilização nas mais diversas áreas e que o princípio geral de todos estes métodos tem sido o de maximizar a similaridade dentro dos grupos e a dissimilaridade entre eles.

Para Cruz & Carneiro (2003), os métodos de agrupamento se distinguem pelo tipo de resultado a ser fornecido e pelas diferentes formas de definir a proximidade entre um indivíduo e um grupo já formado ou entre dois grupos quaisquer. Em todos os casos, não se conhece, *a priori*, o número de grupos a serem estabelecidos e diferentes métodos proporcionam diferentes resultados.

Os métodos de agrupamento mais utilizados em programas de melhoramento genéticos de plantas têm sido os hierárquicos e os de otimização. Nos métodos hierárquicos, os genitores são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma, e nos de otimização é realizada a partição do conjunto de genitores em subgrupos mutuamente exclusivos por meio da maximização ou minimização de uma medida preestabelecida (Cruz & Regazzi, 1997).

Os métodos hierárquicos aglomerativos mais utilizados têm sido o método do vizinho mais próximo, o método do vizinho mais distante e o método das médias das distâncias. O que há de comum entre todos os três métodos de agrupamento é que eles operam sobre a matriz de distância, dispensando o retorno à matriz de dados originais (Dias, 2006). Vários tipos de agrupamentos hierárquicos foram descritos por Cruz & Carneiro (2003), destacando-se o método das médias das distâncias, Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA), que utiliza como critério para a formação dos grupos, a média das distâncias entre os pares de itens que formam cada grupo. A análise de agrupamento permite a construção de um dendrograma, identificando-se os grupos homogêneos.

Entre os métodos de otimização, o mais comumente empregado nas pesquisas genéticas é o método de otimização de Tocher (Cruz & Regazzi, 1997). Esse método requer a obtenção da matriz de dissimilaridades, sobre a qual será identificado o par de indivíduos mais similares. Estes indivíduos formarão o grupo inicial e a partir daí avalia-se a possibilidade de inclusão de novos indivíduos ao grupo, adotando o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo seja menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos.

A entrada de um indivíduo em um grupo aumenta o valor médio da distância dentro do grupo. Assim, pode-se tomar a decisão de incluir um indivíduo em um grupo por meio da comparação entre o acréscimo do valor médio da distância dentro do grupo e um nível máximo permitido, que pode ser estabelecido arbitrariamente ou, como tem sido usado, empregando o valor máximo da medida de dissimilaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada indivíduo (Cruz e Regazzi, 2001).

2.5.5. Análise de componentes principais

Segundo Dias (2006), a análise de componentes principais (*principal components analysis* – PCA) é uma técnica multivariada, que assim como a análise de agrupamento, consiste na redução da dimensionalidade espacial dos dados, ou seja, transforma um conjunto original de variáveis oriundas de um espaço multidimensional em outro conjunto equivalente, porém limitado ao espaço bi ou tridimensional.

O estresse é um parâmetro que determina a qualidade do ajuste da projeção gráfica, sendo os níveis de estresse classificados em 40%, 20%, 10%, 5% e 0% e considerado, respectivamente, ruim, moderado, bom, excelente e perfeito, segundo sugestões de Kruskal (1964).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram avaliadas dez linhagens endogâmicas S₇ de milho pipoca, ou seja, linhagens na sétima geração de autofecundações, desenvolvidas na Fazenda Experimental de Iguatemi, sob responsabilidade do Professor Dr. Carlos Alberto Scapim. As linhagens *Yellow Pearl Popcorns* I e II derivam de um composto americano; as linhagens Zélia I e II foram obtidas a partir do híbrido triplo da *Pioneer*; a linhagem Curagua é originária de população Curagua do Chile; as linhagens IAC112 I e II foram obtidas a partir do híbrido triplo modificado IAC 112; as linhagens Avati Pichinga I e II derivadas da raça Avati Pichinga do Paraguai; a linhagem Pisankalla derivada da raça Avati Pichinga Boliviana (Quadro 1).

Quadro 1 - Linhagens de milho pipoca avaliadas com RAPD e SSR e suas respectivas origens

Linhagens	Origem das Linhagens
1 Yellow Pear Popcorn I	Derivada de um composto Americano
2 Zélia I	Derivada do híbrido triplo da Pioneer
3 Curagua	Derivada da população Curagua do Chile
4 Zélia II	Derivada do híbrido triplo da Pioneer
5 Yellow Pear Popcorn II	Derivado de um composto Americano
6 IAC 112 I	Derivada do híbrido triplo modificado IAC 112
7 IAC 112 II	Derivada do híbrido triplo modificado IAC 112
8 Avati Pichinga I	Derivada da raça Avati Pichinga do Paraguai
9 Pisankalla	Derivada da raça Avati Pichinga Boliviana
10 Avati Pichinga II	Derivada da raça Avati Pichinga do Paraguai

Os experimentos de laboratório foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais da Universidade Estadual de Maringá - PR.

Inicialmente foram germinadas, em pequenos balaios plásticos contendo solo, aproximadamente 15 sementes de cada uma das 10 linhagens, para

produzirem as folhas que foram utilizadas para a extração de DNA. Após 10 a 15 dias do plantio realizou-se a extração de DNA de folhas de 10 plântulas de milho pipoca de cada linhagem, totalizando 100 amostras. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado e com base na quantificação foram selecionadas amostras para análise por meio de RAPD. Quando da análise por meio de microssatélites, repetiu-se essas mesmas etapas, ou seja, 15 outras sementes de cada uma das 10 linhagens foram germinadas, em seguida, o DNA foi extraído, quantificado e selecionado.

3.2. Extração do DNA

A extração de DNA de folhas das plântulas de milho pipoca seguiu o método CTAB descrito por Hoisington et al. (1994) com pequenas modificações.

Cerca de 300 mg de folhas jovens, coletadas após 10 a 15 dias do plantio de 10 plantas de cada linhagem de milho pipoca, totalizando 100 amostras, foram pulverizadas separadamente com nitrogênio líquido, o tecido vegetal foi transferido para microtubos de 2 mL onde foi adicionado 800 µL de tampão de extração CTAB contendo Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 5M pH 8,0; CTAB 1% e 140mmol/L de β-mercaptoetanol, previamente preparado. Após homogeneização, os microtubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a 65°C, agitando-se, suavemente, a cada 5 minutos. Posteriormente, esperou-se aproximadamente 5 minutos para que as amostras alcançassem a temperatura ambiente e foi adicionado 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1. Os tubos foram agitados durante 5 minutos para homogeneização das amostras.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 r.p.m, em temperatura ambiente, durante 5 minutos. A fase aquosa (fase superior) foi transferida com o auxílio de uma micropipeta para microtubos de 1,5 mL e novamente foi adicionado 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) agitando suavemente durante 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 r.p.m em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e a estes foram adicionados 300 µL de isopropanol gelado para precipitar o DNA. O conteúdo dos microtubos foi misturado por inversão durante 1 minuto e as amostras foram mantidas *overnight* em -20°C para que o precipitado tornasse evidente. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação a

12.000 r.p.m por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 800 µL de etanol 70% gelado a cada microtubo, que foi agitado levemente por inversão durante 2 minutos e novamente centrifugado a 12.000 r.p.m em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi deixado secar; depois de seco, foram adicionados 400 µL de TE (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5 M pH 8,0) e mantido *overnight* a 4°C.

Após o período *overnight*, foi adicionado 4 µL de RNase na concentração de 10 ng/µL a cada microtubo e estes foram deixados em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), procedendo suave agitação durante 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um microtubo novo, adicionou-se 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) procedendo a agitação durante 5 minutos; as amostras foram centrifugadas a 13.000 r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para microtubo novo e para precipitar o DNA foram adicionados 250 µL de isopropanol gelado e 25 µL de NaCl 5 M; a solução foi misturada por inversões suaves por 1 minuto e cada amostra foi mantida *over-night* a -20°C.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 r.p.m por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado e agitado por inversão durante 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 r.p.m por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco e ressuspendido em 100 µL de TE. As amostras foram estocadas em 4°C.

3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi feita por análise em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0 - Hoisington et al., 1994) usando soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas (50, 100, 150 ng). Após eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL, observado em transiluminador (*Ultraviolet*

Transilluminador High Performance - Edas 290) e a imagem capturada utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

Com base na quantificação foram selecionadas amostras de DNA para análise por meio de RAPD e microssatélites.

3.4. Amplificação do DNA

3.4.1. Padronização das reações de amplificação

Para a padronização das condições de amplificação utilizando os primers de RAPD foram selecionadas aleatoriamente 4 amostras. Para a obtenção de fragmentos de DNA amplificados utilizou-se o primer OPA-04, pois este apresentou boa amplificação em testes anteriores. Foram testadas as concentrações de DNA e de $MgCl_2$. Para padronizar as concentrações de DNA foram testadas as concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 ng enquanto para padronizar as concentrações de $MgCl_2$ foram testadas as concentrações de 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mmol/L.

Esta padronização é necessária para que reprodutibilidade seja obtida com o emprego deste marcador. Demeke et al. (1997) descrevem e discutem a padronização de uma série de parâmetros experimentais que são necessários para melhorar os resultados obtidos com RAPD.

Uma vez que as melhores condições de amplificação para RAPD foram estabelecidas, estas foram utilizadas para as reações de seleção dos primers e para as posteriores amplificações do DNA das amostras das 10 linhagens.

Para a padronização das condições de amplificação utilizando os primers de SSR, foram testados 25, 30 e 50 ng de DNA de duas amostras. As amostras utilizadas para a seleção dos microssatélites foram tomadas de forma casual.

3.4.2. Amplificação do DNA com primers de RAPD

Para as reações de amplificação com primers de RAPD, de cada linhagem, foram selecionados 5 indivíduos dos 10 submetidos aos procedimentos de extração de DNA. Foram testados oitenta e três primers da Operon

Technologies, provenientes dos Kits A (1 a 20), Kit B (1 a 20), Kit C (1 a 20), Kit F (5, 9, 13), Kit I (5), Kit L (11), Kit M (1 a 10) e Kit P (2, 4, 7 a 11 e 17).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Techne TC-512, conforme o protocolo original descrito por Williams et al. (1990) com pequenas modificações. Foram padronizadas para um volume final de 20 μL contendo 0,3 $\mu\text{mol/L}$ de primers, 1 unidade de Taq-DNA polimerase (Invitrogen), 2,0 μL de tampão de reação 10X (Invitrogen), 0,1 mmol/L de cada dNTP, 2,5 mmol/L de MgCl_2 , 15 ng de DNA genômico e água mili-Q autoclavada q.s.p. Os ciclos de amplificação consistiram de uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C; seguidos por 45 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 35°C; e 2 minutos a 72°C, seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

As amostras amplificadas foram submetidos à migração eletroforética em gel de agarose 1,7% em tampão de corrida TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA), utilizando o marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (*Transilluminador High Performance* - Edas 290) e fotografados utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

3.4.3. Amplificação do DNA com primers de microssatélites

Para as reações de amplificação com primers de SSR, de cada linhagem, foram selecionados 7 indivíduos dos 10 submetidos aos procedimentos de extração de DNA. A escolha dos marcadores polimórficos foi feita testando 51 primers de SSR. As sequências dos primers SSR foram obtidas no endereço eletrônico <http://www.maizegdb.org/ssr.php>, a partir do banco de dados do Genoma Milho.

As amostras foram submetidas à amplificação em termociclador Techne TC-512. Cada reação de amplificação foi preparada com 25ng de DNA genômico, 2,0 μL de tampão de reação 10X, 2,0 mmol/L de MgCl_2 , 0,1 mmol/L de cada dNTP, 1 unidade de taq-DNA polimerase (Invitrogen), 0,2 μM de primer F e R específico e água mili-Q autoclavada qsp até completar o volume de 20 μL .

Para a amplificação dos microssatélites, foi utilizado o programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991) (Quadro 2); este programa é considerado adequado para o anelamento dos primers de microssatélites.

Quadro 2 - Sequência do programa utilizado para amplificação do DNA de milho pipoca

Passo	Etapa	Temperatura	Touchdown
1	Desnaturação inicial	94 ⁰ C	1 min.
2	Desnaturação	94 ⁰ C	1 min.
3	Anelamento	65 ⁰ C (-1 ⁰ C/ciclo)	1 min.
4	Extensão	72 ⁰ C	2 min.
5	Volta ao passo 2 (9 vezes)	-	-
6	Desnaturação	94 ⁰ C	1 min.
7	Anelamento	55 ⁰ C	1 min.
8	Extensão	72 ⁰ C	2 min.
9	Volta ao passo 6 (17 vezes)	-	-
10	Extensão final	72 ⁰ C	2 min.
11	Imersão (<i>Hold</i>)	4 ⁰ C	-

Para verificar a complementaridade, reprodutibilidade e presença de polimorfismo para cada primer avaliado, as amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8), diluída e tamponada em TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 Mm EDTA). Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen). Os géis foram submetidos a um campo elétrico de 60 Volts por aproximadamente 5 horas. Após esse período, os géis foram corados com solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL.

Os padrões de bandas obtidos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (*Transilluminador High Performance* - Edas 290) e fotografados utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

3.5. Análise de dados

Cinquenta amostras de DNA de plantas de milho pipoca das 10 linhagens foram avaliadas usando os nove primers de RAPD, outras setenta amostras foram avaliadas com os quatorze primers de microssatélites e com o resultado desta

avaliação foi calculado o polimorfismo e as distâncias genéticas entre as linhagens.

A magnitude da variabilidade genética, a partir de dados resultantes da análise com marcadores microssatélites, foi avaliada por meio da porcentagem de locos polimórficos e do número de alelos por loco. O programa PopGene 32 foi utilizado para as análises estatísticas, na obtenção de dados como heterozigosidade média esperada e os coeficientes F de Wright .

A análise da divergência genética foi realizada por meio de análises multivariadas, utilizando-se técnicas de análise de agrupamento e análise de componentes principais.

Os coeficientes de similaridade mais simples relacionam-se com as variáveis dicotômicas, em que cada variável tem somente dois valores. Os marcadores RAPD, que são binários, são incluídos nessa variável. Dias (2006) aponta o coeficiente de Jaccard como o melhor para comparar populações dentro da mesma espécie, em que concordâncias são mais freqüentes.

Os resultados RAPD foram interpretados por meio de um sistema binário, obtendo-se uma matriz, onde foi conferido o valor 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas. Na análise de agrupamento foi utilizado o complemento aritmético de Jaccard como medida de dissimilaridade e o método hierárquico aglomerativo UPGMA, de modo a alocar itens em grupos semelhantes e conectar grupos homogêneos, sendo representados graficamente na forma de diagrama de árvore denominado dendograma. Essas análises foram realizadas com o auxílio do software Genes (Cruz, 1997).

Para o marcador codominante microssatélite, a distância genética entre as linhagens foi estimada pela distância modificada de Rogers (1972), a qual tem como base a distância euclidiana, a partir de estimativas de freqüências alélicas. Após a estimação da matriz de dissimilaridade, construída a partir dos coeficientes de distância genética de Rogers (1972), a análise multivariada foi empregada para agrupar os indivíduos ou populações em grupos ou subgrupos e entender a natureza da variabilidade genética entre eles.

O agrupamento, ou *cluster*, é uma técnica multivariada que visa reunir, por algum critério de classificação (populações, clones, variedades, indivíduos, procedências, progênies etc.), em vários grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos, com o uso de

medidas de dissimilaridades (Cruz & Carneiro, 2003; Cruz & Regazzi, 1997; Dias, 1998). O processo de agrupamento utiliza a dissimilaridade ou a distância entre indivíduos ou populações e a adoção de uma técnica de agrupamento visando à formação de grupos (Cruz, 1990).

O agrupamento dos genótipos avaliados baseou-se em metodologias que têm por princípio geral maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos.

Foi utilizado no presente trabalho os métodos de agrupamento mais utilizados em Programas de Melhoramento Genéticos de plantas, ou seja, o métodos hierárquicos aglomerativo - método das médias das distâncias - e o método de otimização de Tocher. O método das médias das distâncias, Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) opera diretamente sobre a matriz das distâncias genéticas e, dispensando o retorno à matriz dos dados originais, utiliza como critério para a formação dos grupos a média das distâncias entre os pares de itens que formam cada grupo. O método de Tocher é uma técnica de otimização, que agrupa os indivíduos mantendo-se o critério de que as distâncias intragrupo sejam sempre menores do que as intergrupos.

A matriz de distâncias de Rogers também foi submetida à análise de componentes principais para a projeção das distâncias em um plano tridimensional. Foi estimado o nível de estresse que mede o ajuste entre a distância na configuração tridimensional e a distância original.

Foi feita uma análise de correlação, por meio do coeficiente de correlação de Pearson, utilizando os dados de distância genética com base nos marcadores moleculares RAPD e microssatélites.

Os procedimentos analíticos mencionados foram realizados com o auxílio do aplicativo Genes (Cruz, 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação do DNA das folhas jovens das linhagens foi verificada pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA, em gel de agarose 0,8%, comparadas com as amostras de DNA do fago λ de concentração conhecida, indicando que a quantidade média de DNA genômico isolado das folhas variou de 10 a 60 ng/ μ L (Figura 1).

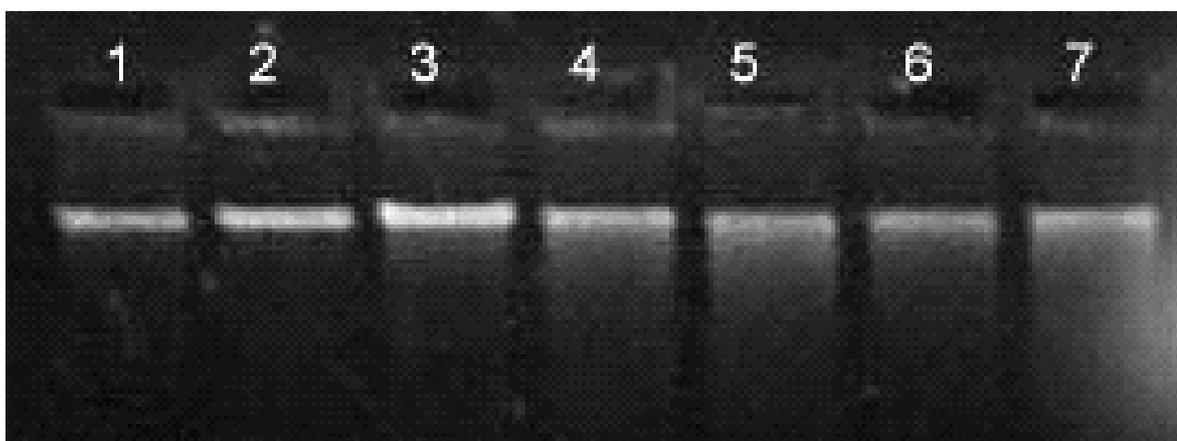


Figura 1 - Gel de agarose 0,8%, utilizado para quantificar o DNA. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de Fago λ de 50, 100, 150 ng. Amostras 4, 5, 6 e 7 são DNAs extraídos de plantas de linhagens de milho pipoca.

A padronização das condições de amplificação utilizando os primers de RAPD possibilitou que as melhores condições de amplificação fossem estabelecidas e estas foram utilizadas para as reações de seleção dos primers e para as posteriores amplificações do DNA das amostras das 10 linhagens.

Com os testes das concentrações de DNA e de $MgCl_2$ foi possível observar que a melhor concentração de DNA foi a de 15 ng e que a concentração de 2,5 mmol/L de $MgCl_2$ foi a que apresentou bandas mais definidas no gel de resolução após as amplificações (Figura 2).

Dos 83 primers de RAPD avaliados, nove amplificaram com padrão de bandas bem definidas e foram escolhidos para amplificar 50 amostras de DNAs de plantas de milho pipoca das 10 linhagens em estudo. Os primers selecionados foram: OPA-03, OPA-12, OPB-07, OPB-17, OPC-05, OPC-11, OPF-05, OPL-11 e OPM-02. O aproveitamento de primers de RAPD neste trabalho foi de 10,84%.

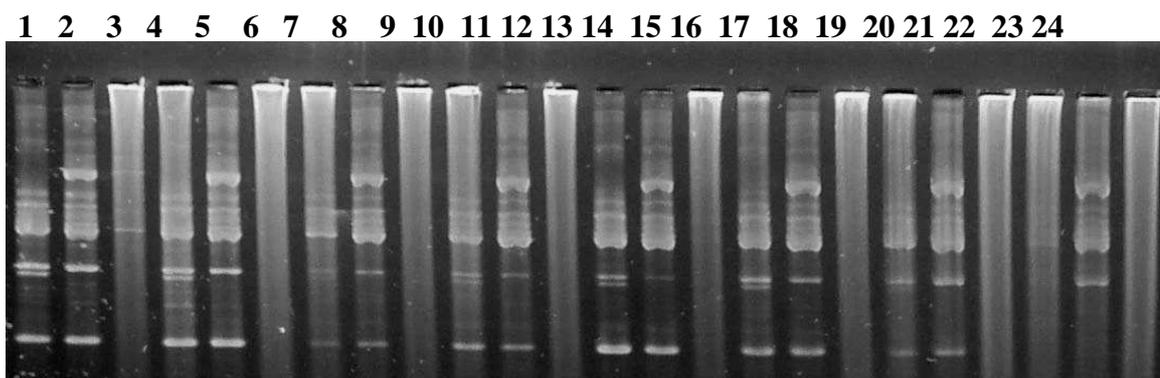


Figura 2 - As amostras de 1 a 24 foram amplificadas com o primer OPA-04. De 1 a 12 são ampliações para os testes de concentração de DNA (1, 2, 3 – 10 ng; 4, 5 e 6 – 15 ng; 7, 8 e 9 – 20 ng e 10, 11 e 12 – 25 ng). As amostras de 13 a 24 foram amplificadas com diferentes concentrações de $MgCl_2$ (13, 14 e 15 – 2,0 mmol/L; 16, 17 e 18 – 2,5 mmol/L; 19, 20 e 21 – 3,0 mmol/L e 22, 23 e 24 – 3,5 mmol/L).

A Figura 3, parte do gel de agarose utilizado para separar os fragmentos de DNA de 50 amostras, ilustra as sequências de DNA amplificadas com o primer OPM-02.

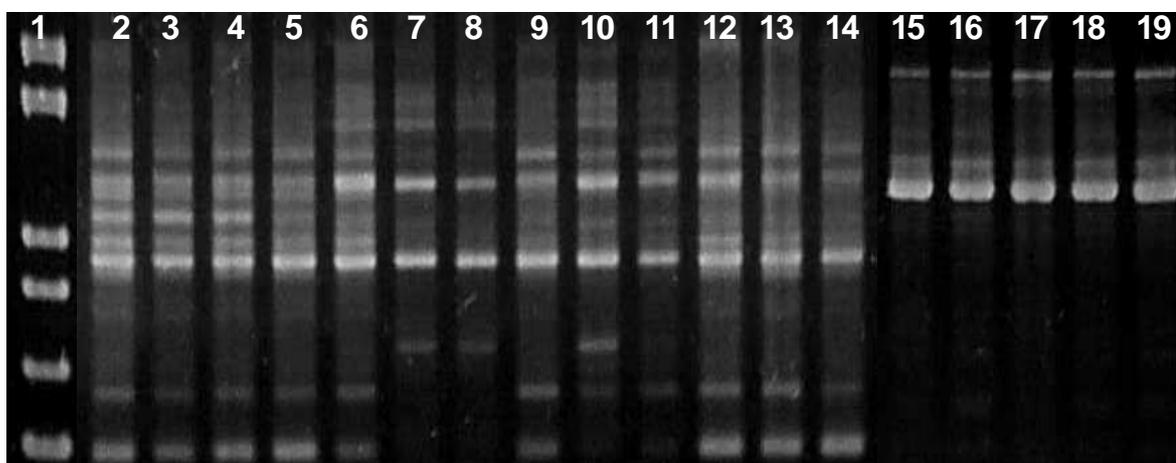


Figura 3 - Gel de agarose 1,7% utilizado para separar os fragmentos de DNA de diferentes linhagens de milho pipoca amplificados com o *primer* OPM-02. As amostras de 2 a 6 pertencem a linhagem Zélia I, as amostras de 7 a 11 pertencem a linhagem Avati Pichinga I, as amostras de 12 a 14 pertencem a linhagem Pisankalla e as amostras de 15 a 19 pertencem a linhagem Avati Pichinga II. A amostra 1 corresponde ao marcador molecular de 100 pares de base (Invitrogen).

A amplificação do DNA das 50 amostras das 10 linhagens em estudo, com os nove primers de RAPD selecionados, resultou na produção de 126 fragmentos amplificados; destes 22 foram monomórficos e 104 foram polimórficos, conferindo um polimorfismo de 82,54% para as 10 linhagens avaliadas (Quadro 3).

Quadro 3 - Número e frequência dos fragmentos monomórficos e polimórficos, obtidos para cada *primer* para RAPD utilizado para amplificar o DNA das linhagens de milho pipoca

Primers	Número total de fragmentos	Número de fragmentos monomórficos	(%)	Número de fragmentos polimórficos	(%)
OPA-03	16	02	12,50	14	87,50
OPA-12	16	04	25,00	12	75,00
OPB-07	15	01	06,67	14	93,33
OPB-17	19	03	15,79	16	84,21
OPC-05	11	04	36,36	07	63,64
OPC-11	10	02	20,00	08	80,00
OPF-05	12	04	33,33	08	66,67
OPL-11	11	01	09,09	10	90,91
OPM-02	16	01	06,25	15	93,75
Total	126	22	17,46	104	82,54

Para a amplificação com primers de microssatélites, foi adotada uma concentração de 25 ng de DNA/20 µL de reação, pois o perfil de bandas gerado foi o mesmo de quando foi usado de 25 a 50 ng de DNA, sugerindo que a concentração de DNA nesta faixa não interfere na amplificação de DNA de milho pipoca.

Dentre os 51 pares de primers testados, 14 foram selecionados, conferindo um aproveitamento de 27,4%, pois estes foram polimórficos (Quadro 4). Estes 14 primers foram utilizados para investigar a variabilidade genética para as 10 linhagens de milho pipoca. A posição destes primers no genoma, os motivos, o número de repetições por motivos e os respectivos número de alelos amplificados estão apresentados no Quadro 4.

De acordo com a amplificação dos *loci SSR*, o número de alelos por *locus* de microssatélites para as 10 linhagens de milho pipoca variou de dois a cinco, com um total de 47 alelos para todos os primers usados. O maior número de alelos foi verificado nos *loci Umc1653* e *Umc2281*, contendo cinco alelos e para os *loci Umc2227*, *Umc1636*, e *Umc2262*, foram encontrados quatro alelos (Quadro 4). O número médio de alelos por *locus* foi 3,36.

Quadro 4 - Sequências dos primers de microssatélite, número de alelos detectados por primer e localização destes nos cromossomos

<i>Locus</i>	Sequência de nucleotídeos	Número de Alelos	Cromossomo
<i>Umc1071</i>	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT (Reverse)	3	1
<i>Umc1071</i>	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT (Forward)		
<i>Umc1336</i>	CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTGG (Reverse)	2	10
<i>Umc1336</i>	GTACAAATGATAAGCAAGGGGCAG (Forward)		
<i>Umc1422</i>	CTCATCGCGATCTCCCAGTC (Reverse)	3	2
<i>Umc1422</i>	GAGATAAGCTTCGCCCTGTACCTC (Forward)		
<i>Umc1636</i>	GTA CTGGTACAGGTCGTCGCTCTT (Reverse)	4	9
<i>Umc1636</i>	CATATCAGTCGTTTCGTCCAGCTAA (Forward)		
<i>Umc1653</i>	GCCGCCACGTACATCTATC (Reverse)	5	6
<i>Umc1653</i>	GAGACATGGCAGACTCACTGACA (Forward)		
<i>Umc2227</i>	AGCTGAGCCTTCTCTTCTTGGCT (Reverse)	4	1
<i>Umc2227</i>	ACCTTGAGCGTGGAGTCGGT (Forward)		
<i>Umc2245</i>	CGTCGTCTTCGACATGTA CTTCAC (Reverse)	3	2
<i>Umc2245</i>	GCCCTGTTATTGGAACAGTTTACG (Forward)		
<i>Umc2262</i>	CGTTCCTGGTACCCTGTCTATAA (Reverse)	4	3
<i>Umc2262</i>	TCTGTTCCGGATTCTTCTTCAGTC (Forward)		
<i>Umc2280</i>	AAAAGAAGACGCTTTGTTTGTGTC (Reverse)	3	4
<i>Umc2280</i>	TTTTCGTCAACTTGATGTTTATGAGAGT (Forward)		
<i>Umc2281</i>	ATGATGATCTGCAGAGCCTAGTCC (Reverse)	5	4
<i>Umc2281</i>	CAATGATTGGAGCCTAACCCCT (Forward)		
<i>Umc2292</i>	ACTTCCGGCATGTCTTGTGTTT (Reverse)	3	5
<i>Umc2292</i>	AGCAGAAGAGGACAAACCAGATTC (Forward)		
<i>Umc2293</i>	ATGTTCCGTTTATTATTTGCCCG (Reverse)	3	5
<i>Umc2293</i>	AAAGAACAGACGCGATCCAATC (Forward)		
<i>Umc2343</i>	GACTGACAACTCAGATTTACCCA (Reverse)	3	9
<i>Umc2343</i>	TCATCTTCCCCACAAATTTTCATT (Forward)		
<i>Umc2350</i>	CGAATCGAGGATGGTTTGT TTTT (Reverse)	2	10
<i>Umc2350</i>	AGTAGCGACTCCTCTGCGTGAG (Forward)		
Total		47	

O polimorfismo de DNA detectado para as linhagens de milho pipoca analisadas no presente estudo pode ser considerado alto, uma vez que, utilizado os 9 primers para amplificar sequências aleatórias (marcadores RAPD), a proporção de sequências polimórficas foi igual a 82,54%, como pode ser observado no Quadro 3, apresentado anteriormente; utilizando os 14 primers de *loci* SSR, foi possível estimar um valor de heterozigosidade média esperada igual a 52,76%.

Nas Figuras 4 e 5, é possível observar diferentes alelos para os *loci* estudados.

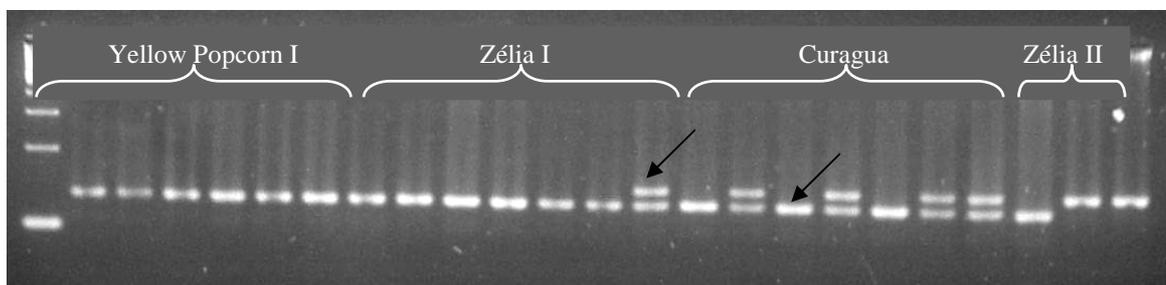


Figura 4 - Amplificação do DNA genômico de milho pipoca usando o primer 2292 (Laeder 100 pb). Sete indivíduos de cada linhagem.

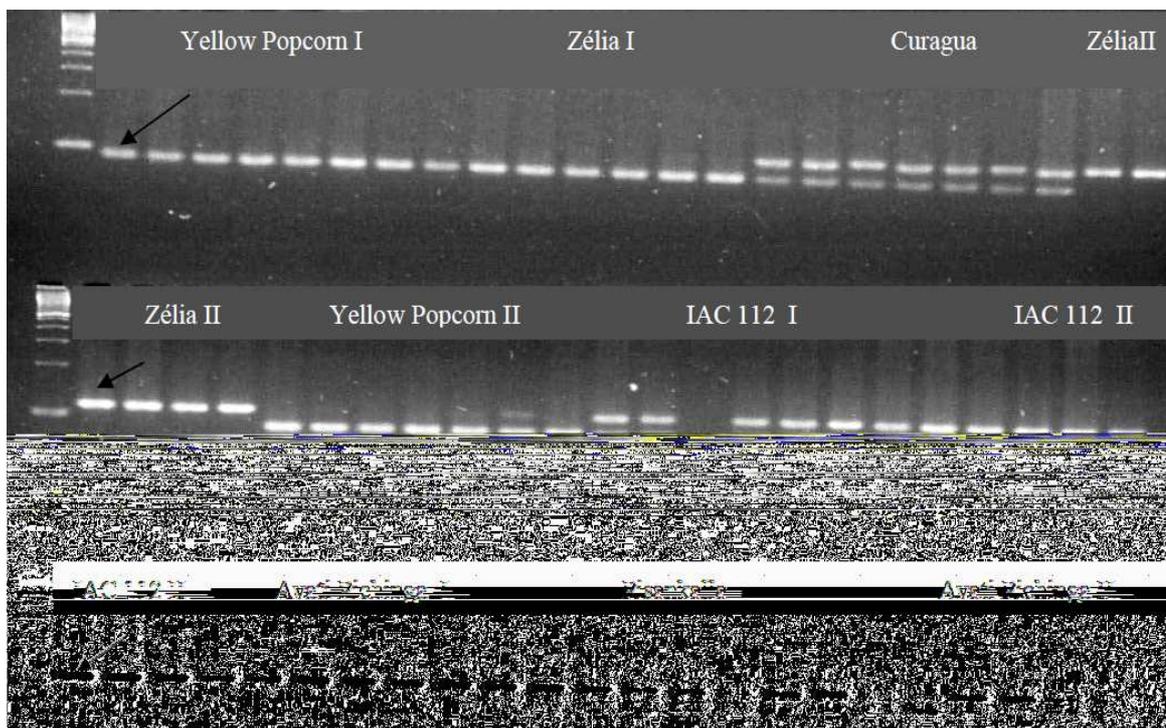


Figura 5 - Amplificação do DNA genômico das 10 linhagens de milho pipoca usando o microssatélite UMC1071. M é o marcador *Laeder* 100 pb (Invitrogen).

Os valores para os coeficientes de fixação F de Wright (Wright, 1965), estimados a partir da análise das freqüências dos alelos nos *loci* *SSR*, indicaram que o déficit de heterozigotos nas 10 linhagens corresponde a somente 4,5% ($F_{IS} = 0,045$) e que a diferenciação entre as 10 linhagens, considerando a variação nas freqüências dos diferentes alelos, corresponde a 73,49% ($F_{ST} = 0,7349$). Estes

parâmetros também são indicativos da divergência genética alta presente entre as 10 linhagens de milho pipoca.

4.1. Diversidade de Nei

O Quadro 5 apresenta os índices de diversidade genética de Nei (1973), calculados entre linhagens (DST), dentro de cada linhagem (HS), diversidade total (HT) e percentagem “entre/total” (GST), obtidos a partir da análise dos resultados originais com a amplificação dos 14 *loci* SSR e separados através de eletroforese.

Os resultados apresentados no Quadro 5 confirmam uma participação de HS em relação à HT. As linhagens Yellow Pear popcorn I, Curagua e Pisankalla, apresentaram maior participação da variabilidade dentro em relação à variabilidade desejada (entre), mesmo não sendo o nível muito elevado.

4.2. Coeficientes de similaridade

A partir do padrão de fragmentos amplificados obtidos para cada primer de RAPD foi gerada uma matriz binária, onde para a presença do fragmento foi atribuído 1 e para a ausência foi atribuído 0 (zero). Esta matriz de dados foi submetida à análise utilizando o programa GENES, empregando o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard. De acordo com a matriz de dissimilaridade construída (Quadro 6), detectou-se menor identidade genética entre as linhagens Yellow Pearl I e Avati Pichinga (0,4219); a maior identidade genética foi observada entre as linhagens Zélia I e Curagua e entre as linhagens Zélia I e Zélia II (0,2394 e 0,2411 respectivamente).

A menor identidade genética entre as linhagens Yellow Pearl I e Avati Pichinga I pode ser explicado pela origem divergente de ambas as variedades de milho pipoca; a variedade *Yellow Pearl* I foi formada a partir de um composto americano enquanto a variedade Avati Pichinga I é originária da raça Avati Pichinga do Paraguai. Por outro lado, a origem comum pode explicar a maior similaridade genética ou menor divergência genética encontrada entre as linhagens Zélia I e Zélia II, porém, não explica a similaridade genética encontrada entre as linhagens Zélia I, derivada do híbrido triplo da Pioneer e as linhagens Curagua, derivada da população Curagua do Chile.

Quadro 5 - Índices de diversidade genética de Nei (1973) calculados *entre* linhagens (D_{ST} , linha superior), *dentro* de cada linhagem (H_S , segunda linha), diversidade *total* (H_T , terceira linha) e percentagem “entre/total” (G_{ST} , 4ª linha), obtidos a partir da análise dos dados eletroforéticos originais, com 10 linhagens estudadas com 14 primers de microssatélites; sendo que 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3- Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, 6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média
1		0,0676	0,0855	0,1297	0,109	0,231	0,2577	0,2589	0,2569	0,2653	0,1846
		0,1651	0,2551	0,1503	0,2012	0,2106	0,1545	0,1724	0,2332	0,1538	0,1885
		0,2327	0,3406	0,28	0,3101	0,4417	0,4122	0,4313	0,4902	0,4191	0,3731
		29,0525	25,0936	46,3181	35,1351	52,3102	62,511	60,0338	52,4164	63,3043	47,3528
2	0,0676		0,0833	0,0799	0,1525	0,2675	0,2782	0,3486	0,2915	0,2965	0,2073
	0,1651		0,1716	0,0604	0,1177	0,1272	0,0711	0,0889	0,1498	0,0703	0,1136
	0,2327		0,2549	0,1403	0,2702	0,3947	0,3493	0,4375	0,4413	0,3668	0,3209
	29,0525		32,6662	56,9277	56,4396	67,7747	79,6557	79,6751	66,0611	80,8246	61,0086
3	0,0855	0,0833		0,0884	0,1664	0,1988	0,2321	0,2535	0,2546	0,2258	0,1765
	0,2551	0,1716		0,1574	0,2077	0,2172	0,1611	0,1789	0,2398	0,1603	0,1943
	0,3406	0,2549		0,2458	0,3741	0,416	0,3932	0,4324	0,4944	0,3861	0,3708
	25,0936	32,6662		35,9661	44,4715	47,788	59,0361	58,6178	51,4928	58,471	45,9559
4	0,1297	0,0799	0,0884		0,1583	0,3286	0,3235	0,3958	0,325	0,3568	0,2429
	0,1503	0,0604	0,1574		0,0993	0,1095	0,0491	0,0683	0,1338	0,0483	0,0974
	0,28	0,1403	0,2458		0,2576	0,4381	0,3726	0,4641	0,4588	0,4051	0,3403
	46,3181	56,9277	35,9661		61,4555	75,0052	86,8325	85,2849	70,8298	88,0841	67,4115
5	0,109	0,1525	0,1664	0,1583		0,3236	0,3724	0,346	0,3039	0,3163	0,2498
	0,2012	0,1177	0,2077	0,0993		0,1633	0,1071	0,125	0,1859	0,1064	0,1460
	0,3101	0,2702	0,3741	0,2576		0,4869	0,4796	0,471	0,4898	0,4227	0,3958
	35,1351	56,4396	44,4715	61,4555		66,4671	77,6596	73,4623	62,0536	74,8276	61,3302
6	0,231	0,2675	0,1988	0,3286	0,3236		0,0734	0,0993	0,1425	0,1082	0,1970
	0,2106	0,1272	0,2172	0,1095	0,1633		0,1166	0,1345	0,1953	0,1159	0,1545
	0,4417	0,3947	0,416	0,4381	0,4869		0,1901	0,2338	0,3378	0,2241	0,3515
	52,3102	67,7747	47,788	75,0052	66,4671		38,6385	42,4786	42,1791	48,2927	53,4371
7	0,2577	0,2782	0,2321	0,3235	0,3724	0,0734		0,1152	0,1316	0,1421	0,2140
	0,1545	0,0711	0,1611	0,0491	0,1071	0,1166		0,0784	0,1392	0,0598	0,1041
	0,4122	0,3493	0,3932	0,3726	0,4796	0,1901		0,1935	0,2708	0,2019	0,3181
	62,511	79,6557	59,0361	86,8325	77,6596	38,6385		59,5104	48,5868	70,3971	64,7586
8	0,2589	0,3486	0,2535	0,3958	0,346	0,0993	0,1152		0,1507	0,0975	0,2295
	0,1724	0,0889	0,1789	0,0683	0,125	0,1345	0,0784		0,1571	0,0776	0,1201
	0,4313	0,4375	0,4324	0,4641	0,471	0,2338	0,1935		0,3078	0,1751	0,3496
	60,0338	79,6751	58,6178	85,2849	73,4623	42,4786	59,5104		48,9639	55,6712	62,6331
9	0,2569	0,2915	0,2546	0,325	0,3039	0,1425	0,1316	0,1507		0,1279	0,2205
	0,2332	0,1498	0,2398	0,1338	0,1859	0,1953	0,1392	0,1571		0,1385	0,1747
	0,4902	0,4413	0,4944	0,4588	0,4898	0,3378	0,2708	0,3078		0,2664	0,3953
	52,4164	66,0611	51,4928	70,8298	62,0536	42,1791	48,5868	48,9639		48,0164	54,5111
10	0,2653	0,2965	0,2258	0,3568	0,3163	0,1082	0,1421	0,0975	0,1279		0,2152
	0,1538	0,0703	0,1603	0,0483	0,1064	0,1159	0,0598	0,0776	0,1385		0,1034
	0,4191	0,3668	0,3861	0,4051	0,4227	0,2241	0,2019	0,1751	0,2664		0,3186
	63,3043	80,8246	58,471	88,0841	74,8276	48,2927	70,3971	55,6712	48,0164		65,3210
Média	47,3528	61,0086	45,9559	67,4115	61,3302	53,4371	64,7586	62,6331	54,5111	65,3210	58,3720

Quadro 6 - Matriz de dissimilaridade construída a partir do complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard, sendo que 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3- Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, 6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	0,3316	0,3600	0,3159	0,3098	0,3902	0,4082	0,4219	0,3782	0,4125
2		0	0,2394	0,2411	0,3162	0,3175	0,2685	0,3731	0,2831	0,3141
3			0	0,2415	0,3220	0,3199	0,3119	0,3821	0,3399	0,3487
4				0	0,2875	0,3039	0,2972	0,3821	0,3117	0,2923
5					0	0,3465	0,3246	0,3501	0,3797	0,3275
6						0	0,2740	0,3153	0,3261	0,2745
7							0	0,2814	0,2824	0,2458
8								0	0,3288	0,2906
9									0	0,2923
10										0

Moller e Schaal (1999), utilizando RAPD para identificar a variação genética entre 15 acessos de milho nativo da América, encontraram alto nível de polimorfismo entre os acessos e os resultados revelaram forte correlação entre a relação genética e a posição geográfica dos acessos nativos americanos. Os referidos autores concluíram que análise por meio de RAPD pode ser potencialmente utilizada para organizar coleções de sementes e para entender a diferenciação genética intraespecífica.

Outros autores também têm indicado o RAPD como ferramenta para determinar a extensão da variabilidade genética entre linhagens de milho e para agrupar genótipos diferentes em grupos heteróticos distintos (Lanza et al., 1997; Liu et al., 1997; Shieh e Thseng, 2002). Os resultados obtidos por Carvalho et al. (2004), estudando 81 acessos de milho, sugerem que RAPD é um marcador importante para estabelecer e manter uma coleção de germoplasma.

4.3. Medidas da distância genética

A partir da análise da freqüência dos 47 alelos nos *loci* SSR, foi calculada a divergência genética por meio da distância genética de Rogers (1972). De acordo com a matriz de dissimilaridade construída (Quadro 7), detectou-se menor identidade genética entre as linhagens Zélia II e Avati Pichinga I (0,8495). A maior identidade genética foi verificada entre as linhagens Zélia I e Zélia II (0,2092).

A linhagem Zélia II foi derivada do híbrido triplo da Pioneer e a linhagem Avati Pichinga I foi derivada da raça Avati Pichinga do Paraguai. Portanto, a menor identidade genética entre essas linhagens, estimada a partir da análise dos *loci SSR*, também pode ser justificada pela distância geográfica de origem dessas linhagens, refletindo a distância biológica entre as mesmas.

Quadro 7 - Matriz de dissimilaridade construída a partir dos coeficientes de distância genética de Rogers (1972), sendo que 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3- Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, P6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0	0,2677	0,3289	0,3618	0,3402	0,61	0,6387	0,6443	0,6501	0,6575
2		0	0,3056	0,2092	0,4046	0,6403	0,6228	0,7681	0,6945	0,6609
3			0	0,3117	0,4581	0,5374	0,6006	0,6436	0,6498	0,5657
4				0	0,3985	0,7424	0,6966	0,8495	0,7377	0,7559
5					0	0,7698	0,8359	0,7879	0,7194	0,7255
6						0	0,2194	0,3028	0,4212	0,2668
7							0	0,2861	0,3791	0,3221
8								0	0,4358	0,2649
9									0	0,3469
10										0

A comparação dos valores de distância genética, estimados a partir da análise por RAPD e dos *loci SSR*, mostrou valores diferentes.

Para o marcador RAPD, as linhagens que apresentaram maior distância genética, ou seja, menor similaridade, foram as linhagens Yellow Pearl I e Avati Pichinga I (0,4219); na análise dos microssatélites, a distância obtida entre estas mesmas linhagens foi de 0,6443.

Para o marcador microssatélite, as linhagens que apresentaram maior distância genética, foram as linhagens Zélia II e Avati Pichinga I (0,8495). Para o RAPD a distância entre estas duas linhagens foi de 0,3821.

Deste modo, os valores de distância genética entre algumas linhagens parecem ser maiores quando os *loci SSR* são utilizados, em comparação com os marcadores de RAPD.

Baruffi et al. (1995) descreveram que o polimorfismo para RAPD é maior quando comparado com o polimorfismo em *loci* específicos, como o de isozimas, devido ao fato das regiões aleatórias de DNA aparentemente evoluírem mais rapidamente que as sequências de *loci* específicos.

Embora a expressão ou neutralidade dos *loci* SSR ainda seja um aspecto controvertido, a variação ocorrida em determinados *loci* SSR das linhagens de milho pipoca pode ter conduzido a uma maior divergência genética entre as linhagens. Este aspecto pode ser evidenciado pela discrepância dos valores de distância genética obtidas com a análise por RAPD (menor distância genética) e análise de *loci* SSR (maior distância genética) entre duas linhagens.

4.4. Métodos de agrupamentos

Os métodos de agrupamentos utilizados basearam-se em metodologias que têm por princípio geral maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos.

Com a análise do polimorfismo dos marcadores RAPD para 10 linhagens foi possível a construção do agrupamento apresentado na Figura 6, representado pelo dendrograma gerado por meio do método das médias das distâncias UPGMA. No eixo vertical são assinaladas as populações. As linhas horizontais, partindo dessas populações, têm comprimentos proporcionais aos níveis de dissimilaridade. No eixo horizontal está a linha assinalando os diversos níveis de fusão.

Observando a Figura 6, conclui-se pela formação de dois grupos maiores, indicando perspectiva para a formação de 2 grupos heteróticos. Um primeiro grupo formado pelas linhagens Zélia I, Curagua, Zélia II e Yellow Pearl Popcorns II; um segundo grupo constituído pelas linhagens IAC112 I, IAC112 II, Avati Pichinga I, Pisankalla e Avati Pichinga II. A linhagem Yellow Pearl Popcorns I apresenta grande discrepância quando comparada às demais linhagens.

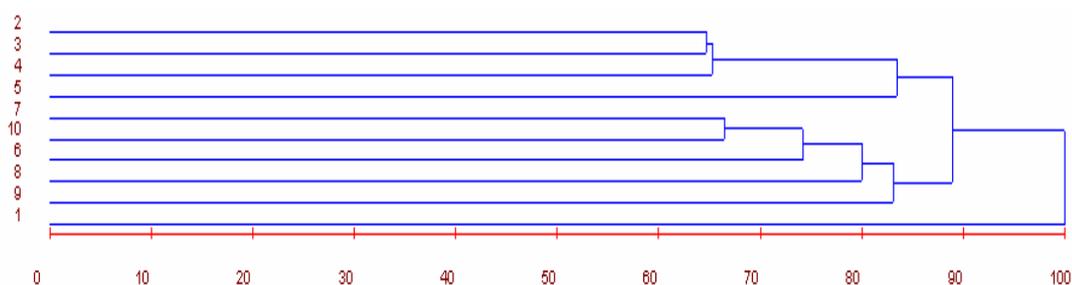


Figura 6 - Agrupamento realizado por meio do método UPGMA para as linhagens de milho pipoca. O número 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3- Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, 6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II.

Embora não tenham sido encontrados na literatura especializada estudos com milho pipoca utilizando marcadores RAPD, a organização das linhagens em dois grupos distintos parece ser indicativo da consistência do marcador RAPD para a análise e caracterização molecular de milho pipoca, estando, portanto, em consonância com os propósitos de formação de linhagens divergentes em programas de melhoramento genético.

A partir da análise dos *loci* SSR, inicialmente, utilizou-se do método das médias das distâncias UPGMA para o agrupamento dos genótipos avaliados. Por meio do dendrograma gerado (Figura 7), é possível concluir pela formação de 2 grupos. O primeiro grupo, formado pelas linhagens Yellow Pearl Popcorns I, Zélia I, Curagua, Zélia II e Yellow Pearl Popcorns II. O segundo grupo constituído pelas linhagens IAC112 I, IAC112 II, Avati Pichinga I, Pisankalla e Avati Pichinga II.

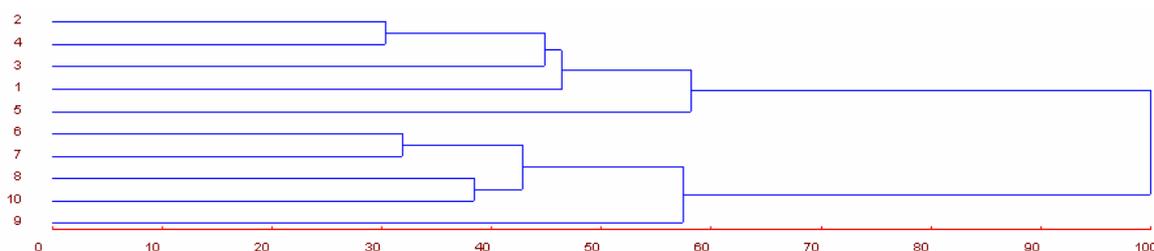


Figura 7 - Agrupamento realizado por meio do método UPGMA para as linhagens de milho pipoca. O número 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3- Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, 6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II.

A posição relativa dos genótipos disposta na projeção tridimensional (Figura 8) sugere que, dentro do grupo constituído pelas linhagens Yellow Pear Popcorn I, Zélia I, Curagua, Zélia II e Yellow Pearl Popcorns II, ocorre uma aproximação mais pronunciada entre as linhagens Yellow Pear Popcorn I e Curagua. Para o grupo 2, constituído pelas linhagens IAC112 I, IAC112 II, Avati Pichinga I, Pisankalla e Avati Pichinga II, observa-se maior aproximação entre as linhagens IAC 112 I e Avati Pichinga II. O valor do estresse associado à projeção tridimensional (0,20) é considerado moderado, de acordo com escala de Kruskal (1964).

A mesma matriz gerada pela distância de Rogers foi utilizada para a divisão dos genótipos em grupos definidos pelo método de otimização de Tocher (1952). Esse método adota o critério de que a medida das médias de

dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos.

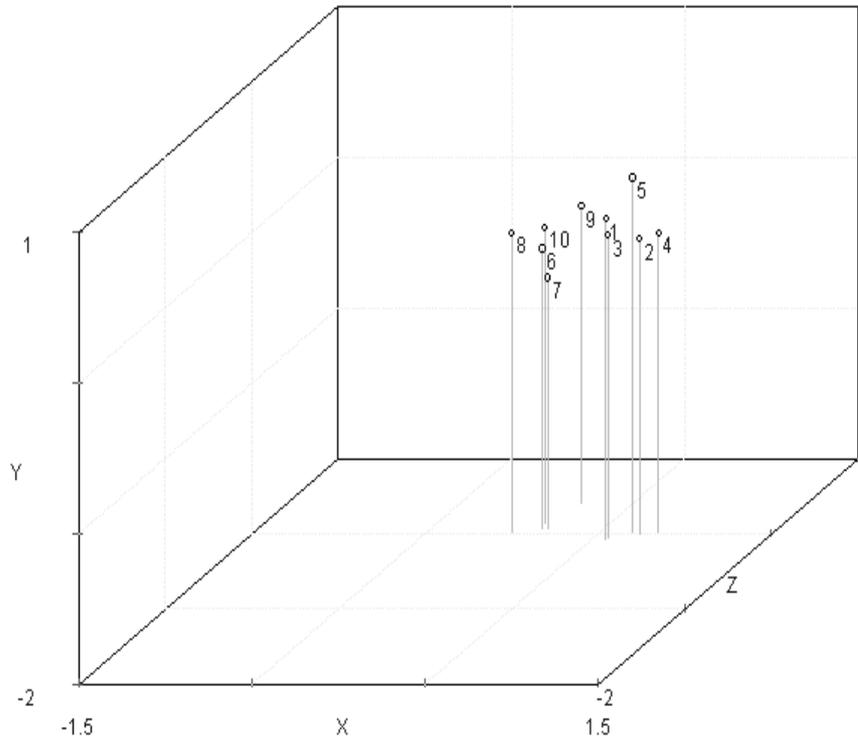


Figura 8 - Projeção de distâncias no espaço, sem transformação (raiz) e sem rotação dos dados, para as dez linhagens de milho pipoca. O número 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3-Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, 6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II.

Os resultados obtidos por meio da metodologia de Tocher revelaram a formação de quatro grupos (Quadro 8). O grupo um é formado pelas linhagens Yellow Pear Popcorn I, Zélia I, Curagua e Zélia II; o grupo dois, pelas linhagens IAC 112 I, IAC 112 II, Avati Pichinga I e Avati Pichinga II; por último, os grupos três e quatro formados pelas linhagens Pisankalla e Yellow Pear Popcorn II respectivamente.

Os métodos de agrupamento utilizados (Tocher e UPGMA) diferiram em relação ao número de grupos formado (2 e 4 respectivamente) e aos componentes de cada grupo. Segundo Dudley (1994), o método das médias das distâncias (UPGMA) pode ser considerado superior aos outros, e vem sendo recomendado por alguns autores (Sneath e Sokal, 1973; Romesburg, 1984).

Quadro 8 - Agrupamento das linhagens segundo a metodologia de Tocher, aplicada à matriz de distâncias de Rogers. O número 1 representa a linhagem Yellow Pearl Popcorns I, 2- Zélia I, 3-Curagua, 4- Zélia II, 5- Yellow Pearl Popcorns II, 6- IAC112 I, 7- IAC112 II, 8- Avati Pichinga I, 9- Pisankalla e 10- Avati Pichinga II

Limite das distâncias entre grupos	Formação dos grupos		Distância média entre grupos	
	Grupo	Linhagens	Grupos	Distância
(1) 0,2677	1	2, 4, 3, 1	1	0,2975
(2) 0,2092	2	6, 7, 8, 10	1 x 2	0,6646
(3) 0,3056	3	9	1 x 3	0,6830
(4) 0,2092	4	5	1 x 4	0,4004
(5) 0,3402			2	0,2770
(6) 0,2194			2 x 3	0,3958
(7) 0,2194			2 x 4	0,7798
(8) 0,2649			3	,
(9) 0,3469			3 x 4	0,7194
(10) 0,2649			4	,

O valor de correlação de Pearson ($r = 0,5453$) indica que existe um relativo padrão de associação entre os dois marcadores (Figura 9). A associação entre os marcadores é positiva e estatisticamente diferente de zero. O desvio padrão foi de 0,112 e intervalo de confiança Bootstrap de (95% de probabilidade): 0,315 – 0,684. O valor de correlação de Pearson é reflexo das diferenças observadas e apresentadas anteriormente entre as 10 linhagens.

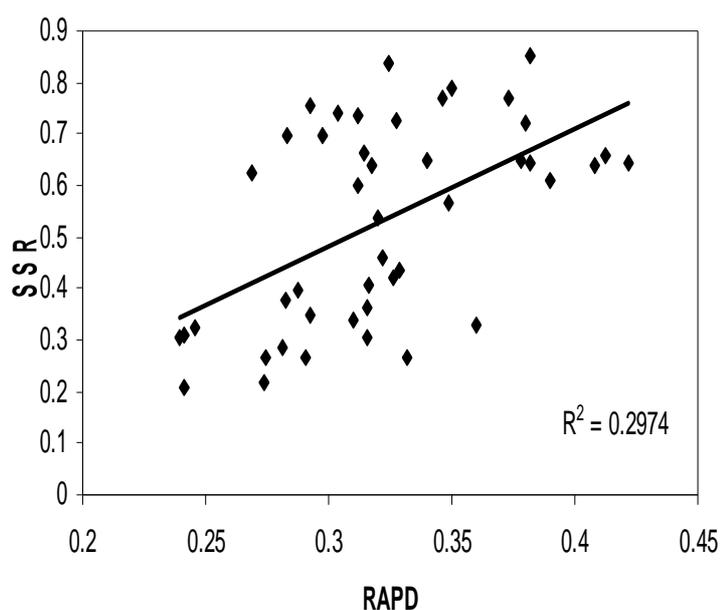


Figura 9 - Gráfico de dispersão e Correlação de Pearson (r) entre os marcadores RAPD e SSR.

A comparação de distâncias genéticas geradas por diferentes marcadores moleculares, descritas por vários autores (Hahn et al., 1995; Russell et al., 1997; Yang et al., 1996) revelaram somente moderada associação entre as distâncias genéticas calculadas com os marcadores RFLP e RAPD.

Pejic et al. (1998), para avaliar a similaridade genética entre linhagens de milho, utilizaram e compararam diferentes marcadores moleculares. Estes observaram grandes diferenças para os agrupamentos de similaridade obtidos com o emprego de RAPD, RFLP, SSR e AFLP.

Tem sido pouco frequente que os resultados obtidos com RAPD se correlacionem com os resultados obtidos com outros tipos de marcadores para milho (Hahn et al., 1995; Pejic et al., 1998; Garcia et al., 2004) e também para outras espécies (Doldi et al., 1997; Russell et al., 1997).

De acordo com Li et al. (2001), a inconsistência entre os dados obtidos por diferentes marcadores, especialmente para avaliar diferentes linhagens, resulta do fato de que os marcadores moleculares avaliam diferentes componentes de variação do DNA e estes podem evoluir de diferentes maneiras.

A comparação da eficiência entre marcadores moleculares para estudar a diversidade genética em 18 linhagens de milho tropical, realizada por Garcia et al. (2004), mostrou valor mais baixo de correlação entre os marcadores RAPD e microssatélites, sendo o valor de correlação de Pearson igual a 0,33. Os valores altos de correlações foram verificados entre os marcadores RFLP e RAPD (0,50) e entre RAPD e AFLP (0,48).

A proposição de baixa correlação de Pearson entre os marcadores RAPD e microssatélites pode ser superada frente às evidências das análises das 10 linhagens de milho pipoca, utilizando os referidos marcadores na presente investigação.

Apesar das indicações de que microssatélites correspondem a marcadores moleculares mais informativos do que RAPD (Demeke et al., 1997), os resultados obtidos com o presente estudo indicam que ambas as técnicas podem fornecer informações consistentes para estudar a diversidade genética em milho pipoca. A opção de analisar a diversidade genética na referida espécie vegetal usando marcadores RAPD, com objetivo de orientar programas de melhoramento genético, pode ser feita desde que as limitações impostas por esta técnica sejam superadas. Superar as limitações de análise de RAPD e tornar este

um marcador com resultados mais confiáveis envolve a padronização dos parâmetros de reação, a seleção dos primers mais adequados e a utilização de vários primers considerando para a análise somente os fragmentos reproduzíveis, conforme as premissas apontadas por Demeke et al. (1997).

Para as análises de RAPD nas 10 linhagens de milho pipoca houve preocupação em padronizar as melhores condições de amplificação e estes cuidados foram importantes e determinantes dos resultados consistentes obtidos com este marcador molecular.

A avaliação da distância genética entre as linhagens parentais de milho pipoca, quer seja utilizando os marcadores RAPD ou a análise dos *loci* microssatélites, foi um procedimento importante porque a expectativa, de acordo com as proposições de alguns autores (Shieg e Thseng 2002; Menkir et al., 2004), é de que a divergência genética estimada possa ser usada para predizer o vigor de híbridos produzidos a partir de determinados cruzamentos, visando, assim, aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento genético.

5. CONCLUSÕES

- a) Os diferentes valores de distâncias genéticas observadas, analisando os dados obtidos com o RAPD e com o microssatélite, é um reflexo das regiões do genoma do milho que foram investigadas por estes dois marcadores. Apesar dos diferentes valores obtidos para estes marcadores, os dendrogramas construídos identificam dois grandes grupos formados para os genótipos P1 e P9. Isso é um indicativo da consistência do marcador RAPD para a análise e caracterização molecular de milho pipoca, sendo que este pode ser utilizado com o propósito de separar as linhagens divergentes em programas de melhoramento genético.
- b) Apesar das indicações de que os microssatélites correspondem a marcadores moleculares mais informativos do que a análise de RAPD, o estudo das 10 linhagens de milho pipoca indicam que ambas as técnicas podem fornecer informações consistentes para estudar a diversidade genética em milho pipoca. Portanto, a opção de analisar a diversidade genética em milho pipoca utilizando marcadores RAPD pode ser feita, desde que as limitações impostas por esta técnica sejam superadas.
- c) A avaliação da distância genética entre as linhagens parentais de milho pipoca, seja utilizando os marcadores RAPD ou *loci* microssatélites, foi um procedimento importante, pois a divergência genética estimada poderá ser usada para prever o vigor de híbridos produzidos a partir de determinados cruzamentos, visando, assim, aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento genético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A.M.; REDDY, O.U.K.; EL-ZIK, K.M.; PEPPER, A.E. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:222-229, 2001.

ABO-ELMAFA, A.K.; SHIMADA, M.T. Intra and interspecific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:335-340, 1995.

AJMONE-MARSAN, P.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, F.; KUIPER, M.; MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 98:219-227, 1998.

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, 132:1131-1139, 1992.

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.

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

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

BARUFFI, L.; DAMAIANI, G.; GULIELMINO, C.R.; BANDI, C.; MALACRIDA, A.R.; GASPERI, G. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. **Heredity**, 74:425-437, 1995.

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

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

BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular and General Genetics**, 249:65-73, 1995.

BECKMAN, J.S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to 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.

BERNARDO, R. Prediction of single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. **Crop Science**, 34:20-25, 1994.

BINNECK, E.; NEDEL, J.L.; DELLAGOSTIN, O.A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, 24:183-196, 2002.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 500p.

BRAUNER, S.; CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. **American Journal of Botany**, 79:1436-1439, 1992.

BRUMMER, E.C.; BOUTON, J.H.; KOCHERT, G. Analysis of annual *Medicago* species using RAP markers. **Genoma**, 38:362-367, 1995.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 9-78.

CARLSON, J.E.; WHALON, M.E.; GLAUBITZ, J.C.; LUK, V.W.K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, 83:194-200, 1991.

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.

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

CERVERA, M.T.; GUSMAO, J.; STEENACKERS, M.; PELEMAN, J.; STORME, V.; VENDEN BROECK, A.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. **Theoretical and Applied Genetics**, 93:733-737, 1996.

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

CLERC, A.; MANCEAU, C.; NESME, X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64:1180-1187, 1998.

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.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 23:189-199, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Previsão e acompanhamento da safra 2002/2003**. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20, fevereiro, 2004.

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

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

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

DOFING, S.M.; D'CROZ-MASON, N.; THOMAS-COMPTON, M.A. Inheritance of expansion volume and yield in two popcorn x dentcorn crosses. **Crop Science**, 31:715-718, 1991.

DOLDI, M-L.; VOLLMANN, J.; LELLEY, T. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. **Plant Breeding**, 116:331-335, 1997.

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.

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.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits of phylogenies: an approach using the Bootstrap. **Evolution**, 39:783-798, 1985.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 1998. 220p.

FISCHER, M.; VAN KLEUNEN, M.; SCHMID, B. Genetic Allee effects on performance, plasticity, and developmental stability in a clonal plant. **Ecology Letters**, 3:530–539, 2000.

GARCIA, A.F.; BENCHIMOL, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O; SOUZA, C.L.; SOUZA, A.P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, 27:579-588, 2004.

GEORGE, M.L.C.; REGALADO, E.; LI, W.; CAO, M.; DAHLAN, M.; PABENDON, M.; WARBURTON, M.L.; XIANCHUN, X.; HOISINGTON, D. Molecular characterization of Asian maize inbred lines by multiple laboratories. **Theoretical and Applied Genetics**, 109:80-91, 2004.

GHEBRU, B.; SCHMIDT, R.; BENNETZEN, J. Genetic diversity of Eritrean sorghum landraces assessed with simple sequence repeat (SSR) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 105:229-236, 2002.

GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Races of maize: isozyme variation among races of maize in Bolivia. **Maydica**, 28:169-187, 1983.

GREEN JR., V.E.; HARRIS JR., E.D. Popcorn quality and the measurement of popping expansion. **Proceedings of the soil and Crop Science Society of Florida**, 20:28-41, 1960.

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.

HAHN, V.; BLANKENHORN, K.; SCHWALL, M.; MELCHINGER, A.E. Relationships among early European maize inbreds: III. Genetic diversity revealed with RAPD markers and comparison with RFLP and pedigree data. **Maydica**, 40:299-310, 1995.

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

HENDERSON, S.T.; PETES, T.D. Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**, 12:2749-2757, 1992.

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

IRVIN, S.V.; KAUFUSI, P.; BANKS, K.; DE LA PENHA, R.; CHO, J.J. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. **Euphytica**, 99:183-189, 1998.

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.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; VAN de WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD AFLP and SSR markers in plants network of European laboratories. **Molecular Breeding**, 3:381-390, 1997.

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

KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; CAMERON, D.F. Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes gulanensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genoma**, 36:43-49, 1993.

KESSELI, R.; OCHOA, O.; MICHELMORE, R. Variation of RFLP *loci* in *Lactuca spp.* and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). **Genome**, 34:430-436, 1994.

KJOLNER, S.; SASTAD, S.M.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*, **Molecular Ecology**, 13:81–86, 2004.

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.

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

LANKEY, K.R.; HALLAUER, A.R.; KAHLER, A.L. Allelic difference at enzyme *loci* and hybrids performance in maize. **Journal of Heredity**, 78:231-234, 1997.

LANZA, L.L.B.; SOUZA JR, C.L.; OTTOBONI, L.M.M.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. GENETIC DISTANCE OF INBRED LINES AND PREDICTION OF MAIZE SINGLE-CROSS PERFORMANCE USING RAPD MARKERS. **Theoretical and Applied Genetics**, 94:1023-1030, 1997.

LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBES, M.C.; CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, 87:59-64, 1996.

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

LEE, M.; GOLDHALK, F.B.; LAMKEY, K.R.; WODMAR, W.W. Association of restriction fragment length polymorphism among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. **Crop Science**, 29:1067-1071, 1989.

LERCETEAU, E.; ROBERT, T.; PÉTIARD, V.; CROUZILLAT, D. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:10-19, 1997.

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.L.A.; GARCIA, A.A.F.; OLIVEIRA, K.M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA JR, C.L.; SOUZA, A.P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum spp.*). **Theoretical and Applied Genetics**, 104:30-38, 2002.

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.

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, J.Y.; TAO, W.J.; LIU, D.J.; CHEN, P.D. Screening and study of RAPD markers tightly linked to wheat powdery mildew resistance gene Pm2. **Yi Chuan Xue Bao**, 27:139-145, 2000.

LIU, X.Z.; PENG, Z.B.; FU, J.H.; LI, L.C.; HUANG, C.L. Heterotic grouping of 15 maize inbreds with RAPD markers. **Scientia Agricultura Sinica**, 30:44-51, 1997.

LIU, Z.; FURNIER, G.R. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. **Theoretical and Applied Genetics**, 87:97-105, 1993.

LIU, Z.W.; JARRET, R.I.; DUNCAN, R.R.; KRESOVICH, S. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. **Genome**, 37:1011-1017, 1994.

LOXDALE, H.D.; BROOKES, C.P.; DE BARROS, P.J. Application of novel molecular markers (DNA) in agricultural entomology. In: SYMONDSON, W.O. C.; LIDDELL, J.E. **The ecology of agricultural pests: biochemical approaches**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 149-212.

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).

MALUF, W.R. Heterose e emprego de híbridos F1 em hortaliças. Hibridação no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (ed.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**, Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 326-351.

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

MANIFESTO, M.M.; SCHLATTER, A.R.; HOPP, H.E.; SUARÉZ, E.Y.; DUBCOVSKY, J. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. **Crop Science**, 41:682-690, 2001.

MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (eds.) **The genetics and exploitation of heterosis in crops**. INTERNATIONAL SYMPOSIUM CIMMYT, 1997, Madison. **Proceedings... Madison**: Crop Science Society of America, 1997 p. 99-118.

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, 1999. p. 99-118.

MELCHINGER, A.E. Use of RFLP markers for analysis of genetic relationship among breeding materials and prediction of hybrid performance. In: BUXTON, D.R. (ed.). **International Crop Science I**. Madison: CSSA, 1993. p 621-628.

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

MESSMER, M.M; MELCHINGER, A.E; LEE, M.; WOODMAN, W.L.; LEE, E.A.; LAMKEY, K.R. Genetic diversity among progenitors and elite lines from the Iowa Stiff Stalk Synthetic (BSSS) maize population: comparison of allozyme and RFLP data. **Theoretical and Applied Genetics**, 83:97-107, 1991.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

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.

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

MOELLER, D.A.; SCHAAL, B.A. Genetics relationships among native American maize accessions of the Great Plains assessed by RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:1061-1067, 1999.

MOELLER, D.A.; SCHAAL, B.A. Genetics relationships among native American maize accessions of the Great Plains assessed by RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:1061-1067, 1999.

MOELLER, D.A.; SCHAAL, B.A. Genetics relationships among native American maize accessions of the Great Plains assessed by RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:1061-1067, 1999

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

MUNTHALL, M.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY, H.J. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. **PCR Methods and Applications**, 1:274-276, 1992.

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

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.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic

similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:1248-1255, 1998.

PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, SCOLES, G; MOLNAR, S.; FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods and Applications**, 2:341-345, 1993.

PEREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMINGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, 7:1347-1357, 1998.

PLASCHKE, J.; GANAI, M.W.; RODER, M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 91:1001-1007, 1995.

PRICE, S.C.; KAHLER, A.L.; HALLAUER, A.R.; CHARMLEY, P.; GIEGEL, D.A. Relationships between performance and multilocus heterozygosity at enzyme *loci* in single-cross hybrids of maize. **Journal of Heredity**, 78:341-344, 1986.

PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, N.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**. 25:185-193, 2002.

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

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).

REIF, J.C., MELCHINGER, A.E., XIA, X.C., WARBURTON, M.L., HOISINGTON, D.A., VASAL, S.K., BECK, D., BOHN, M., FRISCH, M. Use of SSRs establishing

heterotic groups in subtropical maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:947-957, 2003.

RIESEBERG, L.H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. **Molecular Ecology**, 5:99-105, 1996.

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

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

ROMERO-SEVERSON, J.; SMITH, J.S.C.; ZIEGLE, J.; HAUSER, J.; JOE, L.; HOOKSTRA, G. Pedigree analysis and haplotype sharing within diverse groups of *Zea Mays* L. inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, 103:567-574, 2001.

RUS-KORTEKAAS, W.; SMULDEERS, M.J.M.; ARENS, P.; VOSMAN, B. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, 37:375-381, 1994.

RUSSELL, J.R.; FULLER, J.D.; MACAULAY, M.; HATZ, B.G.; JAHOOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:714-722, 1997.

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.

SALEM, H.H.; ALI, B.A.; HUANG, T.; QIN, D.; WANG, X.; XIE, Q. Use of Random Amplified Polymorphic DNA analysis for economically important food crops. **Journal of Integrative Plant Biology**, 49:1670-1680, 2007.

SAMEC, P.; NASINEC, V. The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. **Euphytica**, 89:229-234, 1996.

SAS Institute INC.SAS/STATTM SAS user's guide for windows environment. 6.11 ed. Cary: SAS Institute, 1995.

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

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

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

SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; TONET, 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.; JÚNIOR, A.T.A.; 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.

SCHOTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, 20:211-215, 1992.

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

SCHULMAN, A.H. Molecular markers to assess genetic diversity. **Euphytica**, 158:313–321, 2007.

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

SENIOR, M.L.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, 38:1088-1098, 1998.

SHARMA, S.K.; KNOX, M.R.; ELLIS, T.H.N. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 93:751-758, 1996.

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

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

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

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S.E.; KRESOVITCH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR *loci* as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparison with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:163-173, 1997.

SMITH, J.S.C.; KRESOVICH, S.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; DEAN, R.E.; WOODMAN, W.L.; LEE, M.; PORTER, K. Genetic diversity among elite sorghum

inbred lines assessed with simple sequence repeats. **Crop Science**, 40:226–232, 2000.

SPRINGER, N.M.; STUPAR, R.M. Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? **Genome Research**, 17:264-75, 2007.

STOJSIN, D.; KANNENBERG, L.W.; RAJNPREHT, J.; PAULS, P.K.; STOJSIN, R. Genetic relationships among commercial corn hybrids and parents based on RAPD analysis of pericarp and embryo DNA. **Genetika**, 28:137-150, 1996.

SUN, G.L.; WILLIAM, M.; LIU, J.; KASHA, K.; PAULS, P. Microsatellite and RAPD polymorphism in Ontario corn hybrids are related to the commercial sources and maturity ratings. **Molecular Breeding**, 7:13-24, 2001.

SUN, G.L.; DIAZ, O.; SALOMON, B.; BOTHMER, R. Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD and microsatellite markers. **Genome**, 42:420-431, 1999.

SUN, G.L.; SALOMON, B.; VON BOTHMER, R. Analysis of tetraploid *Elymus* species using wheat microsatellite markers and RAPD markers. **Genome**. 40:806-814, 1997.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, 17:6463-6471, 1989.

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

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

VILARINHO, A.A; VIANA, J.M.S.; SANTOS, J.F.; CAMARA, 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.; ROGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPE, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23:4407-4414, 1995.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. An abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **The American Journal of Human Genetics**, 44:388-396. 1989.

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

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. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19:395-399, 1965.

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

YANG, W.; DE OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J.L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: Variability in Chinese sorghums. **Crop Science**, 36:1669-1676, 1996.

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

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

ZIEGLER, K.E., ASHMAN, B. Popcorn. In: HALLAUER, A.R. (ed.) **Specialty corns**. Iowa: CRC Press, 1994. p. 189-223.

ZINSLY, J.R.; MACHADO, J. Milho-pipoca. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (eds.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 413-421.