

TEREZA APARECIDA DA SILVA

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE MILHO-
PIPOCA UTILIZANDO MICROSSATÉLITES EM *BULK* DE DNA
GENÔMICO

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TEREZA APARECIDA DA SILVA

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE MILHO-
PIPOCA UTILIZANDO MICROSSATÉLITES EM *BULK* DE DNA
GENÔMICO

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

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2008

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

S586d Silva, Tereza Aparecida da
Divergência genética entre genótipos de milho-pipoca
utilizando microssatélites em bulk de DNA genômico. /
Tereza Aparecida da Silva. -- Maringá, 2008.
54 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof. Dr. Ronald José Barth Pinto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Departamento de Agronomia, 2008.

1. Milho-pipoca - Divergência genética. 2. Milho-
pipoca - Microssatélites. 3. Marcador molecular - SSR.
4. Milho-pipoca - Bulks - Microssatélites - Divergência
genética. I. Pinto, Ronald José Barth, orient. II
Universidade Estadual de Maringá. Departamento de
Agronomia. III. Título.

CDD 22.ed.572.8

A minha família, dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus.

À Universidade Estadual de Maringá, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade para a realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor doutor Ronald José Barth Pinto, pela oportunidade de orientação, pelo exemplo de profissionalismo, amizade e confiança a mim prestados.

À professora Doutora Claudete Aparecida Mangolin, pelo constante auxílio nas práticas laboratoriais, carinho e amizade.

Ao professor doutor Carlos Alberto Scapim, pelo cuidado e auxílio durante a realização deste trabalho.

À professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela colaboração e amizade.

Aos meus pais, Maria Aparecida Martinez da Silva e Valdir José da Silva, pelo amor, apoio sentimental e financeiro.

Ao Misael Severino Nunes Carvalho, pela ajuda com o experimento.

À minha irmã Fernanda Aparecida da Silva e ao meu cunhado Fábio Silveira Monteiro, pela ajuda, cuidado e incentivo. Também ao meu sobrinho Fábio Silveira Monteiro Filho, por seu amor sincero e restaurador.

À minha avó Celina Silva Martinez, pelo carinho e preocupação.

À Raquel, pela ajuda com as extrações e ao Jayme, pela ajuda com os géis de poliacrilamida.

Ao Sr. José Isnar, pela ajuda com o transporte da terra e plantio das sementes.

Aos Técnicos Leila, Sérgio e Anderson pela ajuda durante a realização desse trabalho e pela amizade.

Aos colegas de Laboratório, principalmente a Ivone e a Ana Daniela.

BIOGRAFIA

Tereza Aparecida da Silva, filha de Valdir José da Silva e Maria Aparecida Martinez da Silva, nasceu em São Carlos do Ivaí, Paraná, aos vinte dias do mês de abril de 1984.

Cursou o Ensino Fundamental e médio no Colégio Estadual Paraíso do Norte, no período de 1990 a 2001.

Graduou-se em Ciências Biológicas, com habilitação em Licenciatura Plena e Bacharelado, em março de 2006, pela Universidade Paranaense (UNIPAR).

Em março de 2006, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Estadual de Maringá - PR.

ÍNDICE

LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Características do milho-pipoca.....	4
2.2. Cultivo e consumo do milho-pipoca.....	6
2.3. Melhoramento genético do milho-pipoca.....	8
2.3.1. Diversidade genética e heterose.....	11
2.3.2. Uso de marcadores moleculares para estimar a diversidade genética.....	12
2.3.3. Utilização de bulks.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Genótipos utilizados.....	17
3.2. Extração do DNA.....	20
3.3. Quantificação do DNA.....	21
3.4. Amplificação do DNA.....	21
3.5. Análise genética e estatística.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Seleção de <i>primers</i>	26
4.2. Dissimilaridades e distâncias genéticas.....	27
4.3. Métodos de agrupamento.....	31
4.4. Ajuste entre o dendrograma e a matriz de distâncias.....	35
4.5. Projeção das distâncias no plano e no espaço.....	38
4.6. Relação entre os agrupamentos e a genealogia das variedades.....	41
4.7. Agrupamentos e utilização do germoplasma.....	44
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genótipos de milho-pipoca avaliados.....	17
Quadro 2 - Concentrações dos reagentes estoques utilizados nas reações de amplificação	22
Quadro 3 - Seqüência do programa utilizado para amplificação do DNA	23
Quadro 4 - Sequências dos <i>primers</i> de microssatélites, nº de alelos detectados por cada <i>primer</i> e localização destes nos cromossomos, usados na estimacão da diversidade genética nas 25 variedades de milho-pipoca	28
Quadro 5 - Matriz de distâncias genéticas entre as 25 variedades de milho-pipoca, obtidas com a utilização de 23 <i>primers</i>	29
Quadro 6 - Formação dos grupos com a aplicação do método de Tocher para as 25 variedades de milho-pipoca	35
Quadro 7 - Formação dos grupos com a aplicação do método de Tocher modificado para as 25 variedades de milho-pipoca	35
Quadro 8 - Estágios de agrupamento, genótipos de referência (X e Y) de cada agrupamento, distâncias genéticas e nível de corte utilizados na quantificação da correlação cofenética relativa ao método do vizinho mais próximo.....	37
Quadro 9 - Estágios de agrupamento, genótipos de referência (X e Y) de cada agrupamento, distâncias genéticas e nível de corte utilizados na quantificação da correlação cofenética relativa ao método do vizinho mais distante.....	37
Quadro 10 - Estágios de agrupamento, genótipos de referência (X e Y) de cada agrupamento, distâncias genéticas e nível de corte utilizados na quantificação da correlação cofenética relativa ao método da média das distâncias	38
Quadro 11 - Projeção de distância a duas dimensões sem transformação.....	39
Quadro 12 - Projeção de distância a duas dimensões com transformação de dados ($x \rightarrow x^2$)	39
Quadro 13 - Projeção de distância a três dimensões sem rotação e com transformação de dados ($x \rightarrow x^2$)	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificar o DNA extraído das diferentes variedades de milho-pipoca.....	26
Figura 2 - Agrupamentos obtidos a partir do método do vizinho mais próximo para as 25 variedades de milho-pipoca.....	32
Figura 3 - Agrupamentos obtidos a partir do método do vizinho mais distante para as 25 variedades de milho-pipoca.....	33
Figura 4 - Agrupamentos obtidos a partir do método UPGMA para as 25 variedades de milho-pipoca.....	34
Figura 5 - Análise bidimensional com transformação de dados ($x \rightarrow x^2$) para as 25 variedades de milho-pipoca.....	40
Figura 6 - Gráfico derivado da análise tridimensional com transformação de dados e sem rotação ($x \rightarrow x^2$) para as 25 variedades de milho-pipoca.....	41

RESUMO

SILVA, Tereza Aparecida da, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2008. **Divergência genética entre genótipos de milho-pipoca utilizando microssatélites em bulk de DNA genômico.** Professor Orientador: Dr. Ronald José Barth Pinto. Professores Conselheiros: Dra. Claudete Aparecida Mangolin, Dr. Carlos Alberto Scapim e Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

A divergência genética entre 25 genótipos de milho-pipoca foi estimada utilizando-se *bulks* de DNA genômico formados por 78 plantas de cada variedade. Para esta estimativa foram utilizados 23 *primers* microssatélites distribuídos em 9 cromossomos. Um total de 100 alelos distintos foram detectados entre as variedades. O número de alelos por loco variou de 2 a 7. Os índices de dissimilaridade genética foram obtidos com base na frequência de alelos comuns às populações contrastadas. A matriz de dissimilaridades permitiu a realização de análises de agrupamento pelo método de Tocher e pelos métodos do vizinho mais próximo, vizinho mais distante e UPGMA. Os coeficientes de correlação cofenética de cada agrupamento indicaram que o método UPGMA foi o mais adequado entre os modelos hierárquicos utilizados para discriminar as variedades. Os resultados obtidos pela metodologia de Tocher apontaram a presença de quatro grupos de variedades, um dos quais constituído por 21 genótipos. O número de grupos indicado pelo método UPGMA foi superior ao obtido sob a metodologia de Tocher, evidenciando vantagens práticas do método UPGMA. As diferenças entre grupos indicadas pelo método UPGMA foram parcialmente decorrentes da influência de genótipos parentais preponderantes em cada *cluster*, tais como Zélia, Ângela, IAC 112 e CMS 42. Apesar de algumas discrepâncias, grande parte dos *clusters* indicados pela análise molecular agrupou materiais de mesma origem parental. As variedades Argentina, Chile, PA-091 e PR-023 manifestaram grande dissimilaridade genética em relação às demais, razão pela qual a realização de cruzamentos dessas variedades com os demais genótipos avaliados pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de heterozigose, supondo uma estratégia voltada à seleção e exploração de heterose.

Palavras-chave: microssatélites, *bulks*, divergência genética, milho-pipoca.

ABSTRACT

SILVA, Tereza Aparecida da, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, February 2008. **genetic diversity among popcorn genotypes using microsatellites in bulks of genomic DNA**. Adviser professor: Dr. Ronald Jose Barth Pinto. Committee Members: Dra. Claudete Aparecida Mangolin, Dr. Carlos Alberto Scapim and Dra. Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

Genetic diversity of 25 popcorn genotypes was estimated using bulked DNA samples obtained of 78 plants from each variety. The procedure involved 23 microsatellite loci distributed on 9 chromosomes of maize. The total of 100 alleles were detected among the genotypes. At each locus, the number of alleles varied from 2 to 7. The genetic dissimilarity coefficients were obtained based on the ratio between the number of SSR alleles common to both varieties and the total number of SSR alleles observed for that comparison. The matrix of dissimilarity allowed to perform clustering analysis according to the Tocher's method and to the hierarchical clustering proceeds (nearest neighbour clustering, furthest neighbour clustering and unweighted pair-group method using an arithmetic average - UPGMA). The cophenetic correlation coefficients for each clustering method pointed out to the UPGMA method as the most appropriated to explain the varietal discrimination. Tocher's method separated the genotypes into four groups, one of them formed by 21 genotypes. The number of clusters indicated by the UPGMA method was higher than the one obtained according the Tocher's method, making clear the practical advantages of the UPGMA method in discriminating varieties. Differences among groups under the UPGMA procedure were partially derived from the influence of the most frequent parental genotypes in each cluster, such as Zélia, Angela, IAC 112 and CMS 42. Despite some discrepancies, most of clusters suggested by the molecular analysis included genotypes with the same basic genealogy. Varieties Argentina, Chile, PA-091 and PR-023 showed a high genetic dissimilarity in relation to the others, so their crossings with the remaining genotypes are expected to increase heterozigosity, assuming a strategy facing to selection and heterosis exploitation.

Key-words: microsatellites, bulks, genetic diversity, popcorn.

1. INTRODUÇÃO

Há indícios de que o milho foi observado pela primeira vez pelos europeus em 5 de novembro de 1492, quando Cristóvão Colombo desembarcou na costa norte da ilha de Cuba. Consta também que o navegador genovês levou grãos de milho em sua viagem de retorno à Espanha (Paterniani e Campos, 2005). A partir dessa época, o milho passou a fazer parte da dieta dos mais variados povos.

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo. Nessa condição, é natural que apresente um grande potencial para a produção de milhos especiais (Bordallo, 2005), entre eles o milho-pipoca.

O milho-pipoca é um alimento bastante apreciado no Brasil. Seu plantio comercial, no entanto, se mostra bastante modesto, principalmente devido à baixa qualidade da pipoca brasileira e ao sistema de importação, que coloca a pipoca de melhor qualidade no mercado nacional a preços baixos, desestimulando os produtores (Scapim et al., 2002).

Apesar da elevada expressão econômica, persiste ainda no Brasil a falta de informações sobre a área plantada e a produtividade das variedades nacionais de milho-pipoca em fase de melhoramento (Pípolo et al., 2002).

Entre os problemas vivenciados pelos produtores de pipoca, merecem destaque a dificuldade de se obter sementes de alta qualidade e os entraves à obtenção de cultivares com boas características agronômicas e culinárias. Essas dificuldades são motivadas pelo baixo investimento em pesquisa e pela falta de legislação que regulamenta a comercialização de grãos. Os resultados alcançados por algumas empresas que têm investido na comercialização de grãos importados de países de clima temperado levam a crer que o lançamento de novas cultivares no mercado possa contribuir significativamente para uma mudança de *status* da cultura (Pacheco et al., 1998).

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

Várias características das plantas e dos grãos de milho-pipoca devem ser aperfeiçoadas através do melhoramento genético, especialmente o rendimento de grãos, os índices de acamamento e quebramento das plantas, a resistência a doenças e pragas, a capacidade de expansão e os atributos culinários de interesse, como maciez, sabor, aroma e coloração da flor da pipoca (Alexander e Greech, 1977).

Com relação às metodologias empregadas no melhoramento, convém destacar que, exceto pelo vigor das linhagens parentais e pela correlação negativa entre rendimento e expansão, os mesmos problemas verificados na exploração prática da heterose, em milho convencional, podem ser observados na hibridação comercial em milho-pipoca. Exemplificando, a avaliação dos novos materiais deve ser realizada em vários locais e anos, sendo, portanto, cara e laboriosa. Neste contexto, o grande número de híbridos obtidos a partir de um pequeno número de genótipos superiores representa uma dificuldade a ser minimizada pelo uso de estratégias que possam incluir o uso de marcadores moleculares, através da redução do número de cruzamentos necessários, mediante o estudo prévio da distância genética entre os genitores. Da mesma forma, a correlação entre as distâncias genéticas medidas entre genótipos elite e o nível de heterose manifestado pelos híbridos permite o direcionamento dos esforços do melhoramento, no sentido de priorizar a realização dos cruzamentos mais promissores. As estimativas de divergência genética entre genótipos, obtidas por meio de marcadores moleculares, contribuem para a redução dos recursos dispendidos na realização de polinizações manuais, possibilitando a exploração de grupos heteróticos e direcionando os cruzamentos na busca de híbridos produtivos e vigorosos.

Outra convergência entre o melhoramento do milho e o melhoramento do milho-pipoca refere-se à escolha das populações de interesse. As populações com maior potencial de utilização como genitoras em programas de seleção intrapopulacional devem possuir altas médias e ampla variabilidade genética quanto às características de interesse (Hallauer e Miranda Filho, 1981).

O uso de marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) no melhoramento do milho-pipoca pode constituir uma estratégia eficiente para garantir elevados padrões de pureza genética das linhagens elite e das sementes

híbridas. Além das características fenotípicas, o melhorista terá acesso a informações sobre a variabilidade genética, advindas diretamente do DNA, sendo uma ferramenta útil na seleção das plantas a serem utilizadas na produção de sementes genéticas. Trata-se de uma técnica de análise rápida, precisa e independente do ambiente (Padilha et al., 2003).

A proposta do presente estudo é avaliar a diversidade genética entre variedades de milho-pipoca, utilizando marcadores moleculares SSR, por meio de estimativas de distância ou dissimilaridade genética entre os materiais de interesse. A pesquisa faz parte das atividades desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético de milho-pipoca conduzido na Universidade Estadual de Maringá – PR. O trabalho visa contribuir para o estabelecimento de uma possível associação entre tal diversidade e a expressão de heterose para caracteres de rendimento, qualidade e expansão, mediante a identificação de grupos heteróticos a serem explorados no melhoramento da cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características do milho-pipoca

O milho é uma gramínea da família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*. É um cereal essencialmente americano, pois é neste continente que se encontram seus parentes mais próximos: teosinte e *Tripsacum*. Fora das Américas não existem fósseis nem evidências escritas, históricas ou pictóricas sobre o milho. As evidências indicam que o milho foi domesticado entre 8.000 e 10.000 anos atrás, tornando-se o principal cultivo de astecas, maias e incas (Paterniani e Campos, 2005).

A seleção natural e as atividades de seleção realizadas pelo homem, desde os mais antigos povos indígenas, conferiram ao milho comum uma grande variabilidade e uma expressiva capacidade de adaptação a diferentes condições ecológicas. Existem cerca de 300 raças de milho, caracterizadas por diversas adaptações a distintas condições climáticas e utilização em diversas finalidades (Bull e Cantarella, 1993).

A espécie *Zea mays* L. é altamente politípica, com grande variabilidade genética. Com relação ao tipo de endosperma, por exemplo, quase 40% dos milhos são amiláceos, cerca de 30% têm grãos duros cristalinos, pouco mais de 20% são dentados, aproximadamente 10% são classificados como milho-pipoca e 3% como milho doce (Paterniani e Campos, 2005).

A origem do milho-pipoca confunde-se com a dos demais tipos de milho. As descobertas arqueológicas indicam, porém, que ele teve um importante papel no desenvolvimento pré-histórico do milho no continente. Exemplificando, um dos mais primitivos exemplares de milho, descoberto em Bat Cave, Novo México, em 2500 a.C., era milho-pipoca (Zinsly e Machado, 1987).

O milho-pipoca caracteriza-se por possuir sementes pequenas e duras que estouram sob a ação do calor. Isso o torna diferente do milho comum, ainda que ambos pertençam à mesma espécie (Zinsly e Machado, 1987; Sawazaki, 2001a).

A capacidade de expansão do milho-pipoca é explicada pela resistência do pericarpo, associada à presença, no grão, de óleo e umidade. Quando aquecido à temperatura apropriada, o óleo e a umidade exercem pressão sobre o pericarpo, até que este se rompe, expondo o endosperma (Zinsly e Machado, 1987). O sucesso da exposição do endosperma depende da integridade do pericarpo, uma vez que essa estrutura deve suportar uma elevada pressão interna, na semente, até atingir a temperatura de expansão da pipoca (cerca de 180°C). Caso o pericarpo esteja trincado ou rompido, a pressão ideal poderá não ser atingida e, conseqüentemente, a pipoca não se expandirá totalmente (Luz, 2005).

Depois de estourado, o milho-pipoca oferece características de maciez e sabor que, associadas a sua capacidade de expansão, justificam a sua utilização. Assim, uma variedade poderá ser comercializada quando apresentar uma capacidade de expansão superior a 15 (Zinsly e Machado, 1987).

A capacidade de expansão (CE) é calculada pela relação entre o volume de pipoca obtido e o volume de grãos utilizados (Ruffato et al., 2000). A expansão é a principal característica considerada na avaliação da qualidade de milho-pipoca (Ruffato et al., 2000; Miranda et al., 2003; Seifert et al., 2006).

A CE do milho-pipoca está condicionada tanto a fatores genéticos quanto a não-genéticos, como as condições de desenvolvimento em campo, de colheita e do pré-processamento (Ruffato et al., 2000).

As estimativas da herdabilidade da CE variam de 50% a 90%. O grande papel desempenhado pela variabilidade genética dentro da variabilidade fenotípica observada tende a ampliar as possibilidades de obtenção de ganhos de CE por meio da seleção (Alexander e Greech, 1977).

A umidade da semente é um dos fatores que mais influenciam a capacidade de expansão. A umidade associada à máxima CE depende da população e do método adotado para a sua determinação (Luz, 2005). Para Sawazaki (2001b), a umidade ideal dos grãos para a comercialização deve estar em torno de 13,5%, o que proporciona alta CE. Quanto à secagem, processos rápidos e com altas temperaturas causam o trincamento do endosperma, depreciando a qualidade e CE

da pipoca. Portanto, os processos de secagem lenta com baixas temperaturas (< 35°C) são mais indicados.

O armazenamento dos grãos é outro fator importante para a qualidade da pipoca. A armazenagem realizada após a secagem contribui para uniformizar a umidade dos grãos, proporcionando maior CE. Assim, a temperatura e a umidade relativa do ambiente (silo ou armazém) devem ser em torno de 23°C e 75%, respectivamente. Zinsly e Machado (1987) ressaltaram que, ao contrário da perda de poder germinativo após dois ou três anos de armazenamento, a capacidade de expansão sob condições favoráveis de armazenamento, é mantida por um período de 20 a 25 anos.

Outro aspecto relacionado à qualidade da pipoca é o pericarpo quebradiço da pipoca estourada. Esse aspecto proporciona menores resíduos de casca após a ingestão. Para a agroindústria, a produtividade de grãos e outras características correlacionadas são secundárias em relação à qualidade e à quantidade da pipoca (Miranda et al., 2003).

O maior número de variedades de milho-pipoca encontra-se na América Latina. A variabilidade nos grãos entre variedades é grande, tanto em coloração como na forma e tamanho. As cores branca e amarela são as mais comuns. Quando comparado ao milho comum, o tamanho das sementes do milho-pipoca é bastante reduzido. Em geral, suas variedades caracterizam-se por apresentar uma planta mais frágil, menor, de colmo mais fino e menor número de folhas. Em relação ao milho comum, o milho-pipoca têm maior prolificidade, maior susceptibilidade ao acamamento, quebramento, doenças e, conseqüentemente, menor rendimento de grãos (Zinsly e Machado, 1987).

2.2. Cultivo e consumo do milho-pipoca

Por ocasião da descoberta da América, o milho já era cultivado pelos seus habitantes desde o Canadá até a Argentina. Consta que o primeiro contato dos europeus com o milho ocorreu no dia 5 de novembro de 1492, quando Colombo aqui chegou pela primeira vez (Paterniani e Campos, 2005).

O milho (*Zea mays* L.) é a espécie mais cultivada atualmente no mundo, tanto em área cultivada como em tonelagem de produção. É uma cultura de grande e diversificada utilização na sociedade moderna e um dos produtos agrícolas de mais ampla distribuição mundial, tanto na produção quanto no consumo. Devido a sua grande adaptabilidade a diversos ambientes, seu cultivo se estende por aproximadamente 70 países, perfazendo uma área superior a 100 milhões de hectares (Prianda, 2003).

Entre as espécies originárias das Américas, o milho é, certamente, a de maior importância econômica e social em nível mundial, em termos de área semeada e produção de grãos. No Brasil, o milho é cultivado em todos os Estados da federação e na maioria das propriedades agrícolas (Vilarinho, 2006).

Devido à importância do milho nos variados âmbitos da alimentação, o interesse na produção deste cereal vem crescendo a cada ano. A possibilidade de utilização de praticamente todas as partes da planta para fins alimentícios diretos ou indiretos faz do milho um dos cereais mais versáteis em termos de aproveitamento e diversidade de produtos (Prianda, 2003). O milho-pipoca, no entanto, é exclusivamente utilizado para consumo humano (Sawasaki, 1986).

A cultura do milho-pipoca no Brasil vem recebendo ultimamente maior atenção pelos melhoristas e produtores, devido ao aumento de consumo, principalmente em razão da chegada de milho-pipoca importado dos Estados Unidos, para uso em fornos de microondas. Como o mercado de produtos agrícolas é um fator determinante nos rumos da agricultura, seu cultivo tende a expandir-se ainda mais em razão desse crescente consumo (Matta e Viana, 2001).

O consumo nacional de milho-pipoca estava em torno de 80 mil toneladas em 2001. Deste total, 75% correspondia ao milho-pipoca americano, importado principalmente da Argentina (Sawasaki, 2001a).

O mercado de milho-pipoca tem passado por diversas mudanças nos últimos anos (Luz, 2005). A primeira mudança foi a introdução do sistema de parceria entre produtores e empresas empacotadoras. Tais empresas fornecem as sementes e garantem a compra do produto, desde que o mesmo alcance determinado

padrão de qualidade. Desta forma, a importação de apenas 20 mil toneladas indicou uma grande redução da dependência de sementes importadas. Outro fator que também contribuiu para a redução da importação foi o lançamento comercial do híbrido simples modificado IAC-112. Contudo, apesar desses avanços, o número de cultivares no Brasil é ainda bastante reduzido (Sawazaki, 2001a).

Um dos maiores problemas enfrentados pelos produtores de milho-pipoca é a falta de opção devida à escassez, no mercado, de cultivares que reúnam boas características agronômicas e um alto índice de expansão (Seifert et al., 2006). O uso de híbridos americanos ou de gerações avançadas é de alto risco, pois requer a orientação de técnicos experientes com a cultura. Esse risco decorre da maior suscetibilidade do milho-pipoca a doenças e pragas, acamamento e quebraimento do colmo e podridão de grãos, além de um cuidado especial na colheita e secagem dos grãos para evitar danos no pericarpo e endosperma (Sawazaki, 2001a).

No Brasil, apenas sete cultivares híbridas de milho-pipoca estão registradas no SNPC (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares), das quais seis são de acesso restrito aos produtores parceiros das empresas detentoras de sementes (Sawazaki, 2001a).

Como o número reduzido de cultivares é limitante à expansão da cultura no Brasil, é necessário que novos programas de melhoramento sejam iniciados por empresas públicas ou privadas. (Scapim et al., 2002). O valor comercial do milho-pipoca é maior que do milho normal, o que justifica, inclusive, a aplicação de recursos federais nos programas de melhoramento vegetal (Sawazaki, 2001a).

2.3. Melhoramento genético do milho-pipoca

Por ser uma das culturas de maior importância econômica no mundo, o milho é uma das espécies vegetais mais estudadas. Os programas de melhoramento estão constantemente buscando novos procedimentos para a obtenção de variedades mais produtivas e economicamente rentáveis (Prianda, 2003).

Utilizado desde há muito pelos indígenas, como fonte de alimento e por estar muito ligado à tradição popular, o milho-pipoca desperta a atenção dos melhoristas, visando o desenvolvimento de variedades aperfeiçoadas que atendam a

demanda e às exigências em qualidade por parte do mercado consumidor (Zinsly e Machado, 1987).

Como o melhoramento de milho-pipoca no Brasil ainda é muito incipiente, são poucas as variedades e híbridos nacionais com alta produtividade e qualidade. Considerando as dimensões continentais do Brasil, é indispensável um número relativamente grande de materiais selecionados para uma maior oferta de variedades e híbridos adaptados às diversas regiões do país, garantindo alta produtividade e qualidade aos agricultores de alta, média e baixa tecnologia (Vilarinho et al., 2003).

A qualidade da pipoca brasileira é geralmente inferior à qualidade da pipoca norte americana. No primeiro Ensaio Nacional de Milho-Pipoca, desenvolvido no ano agrícola 1991/92, a CE média foi de 17,5 mL.mL⁻¹ e a média da melhor cultivar foi de 20,8 mL.mL⁻¹. Na década de 40, a CE de híbridos e variedades comerciais nos Estados Unidos já variava de 23,2 a 32,7 mL.g⁻¹ (Simon et al., 2004). Todas as variedades não melhoradas caracterizam-se por apresentar baixa capacidade de expansão, entre 8 e 12 (Zinsly e Machado, 1987).

No melhoramento do milho-pipoca, devem ser levados em consideração não só a produtividade e os caracteres agrônômicos, como também aspectos relacionados à qualidade da pipoca, como textura e maciez. Ao agricultor interessa produtividade elevada e os demais atributos de boa população de milho normal; já o consumidor busca uma alta capacidade de expansão, que confere à pipoca melhor textura e maciez (Vendruscolo et al., 2001; Scapim et al., 2002).

O milho-pipoca apresenta algumas dificuldades adicionais no trabalho de melhoramento, quando comparado ao milho comum (Zinsly e Machado, 1987). O melhorista precisa estar consciente que deve satisfazer tanto o produtor quanto o consumidor. Neste sentido, o conhecimento das associações entre caracteres de interesse no melhoramento de milho-pipoca é de fundamental importância na obtenção de genótipos melhorados (Pípolo et al., 2002). Exemplificando, a capacidade de expansão é negativamente correlacionada com a produtividade. Ao melhorista cabe, então, a tarefa de contornar o problema, oferecendo um produto intermediário que satisfaça produtores e consumidores. Deve ser destacado que a

correlação negativa entre as duas principais características de interesse econômico dificulta o melhoramento, mas não o impossibilita (Granate et al., 2002).

No melhoramento de milho-pipoca, diferentes germoplasmas têm sido utilizados para aumentar o valor das características de interesse comercial. Em países de clima temperado, têm-se utilizado cruzamentos do milho-pipoca com milho duro, seguidos por seleção exclusivamente voltada ao aumento da capacidade de expansão. Além desses cruzamentos, também são realizados retrocruzamentos sucessivos do milho-pipoca com linhagens elite de milho comum (Miranda et al., 2003).

Apesar das diferenças fenotípicas entre o milho-pipoca e o milho comum, a maioria dos métodos de melhoramento aplicáveis ao milho comum pode ser utilizada para o milho-pipoca. Isso significa que, no melhoramento de milho-pipoca, são também empregados os métodos intra e interpopulacionais, bem como os métodos de obtenção de híbridos (Zinsly e Machado, 1987). Assim, o melhoramento genético do milho possui duas alternativas que podem ser conduzidas de forma conjunta: a obtenção de populações melhoradas e a obtenção de híbridos (Vilarinho et al., 2003).

O conhecimento do germoplasma disponível é um dos requisitos mais importantes para o melhoramento de qualquer cultura. O germoplasma em questão engloba tanto os materiais genéticos não melhorados contidos em bancos de germoplasma, como os materiais melhorados, disponíveis especialmente em instituições públicas. Desta forma, o sucesso de um programa de melhoramento de milho visando a obtenção de híbridos está intimamente ligado à identificação da população mais promissora para a extração de linhagens (Lima et al., 2000). Por outro lado, embora seja importante um conhecimento atualizado sobre populações e variedades de polinização livre, os materiais comerciais também são empregados nos programas de melhoramento, uma vez que a autofecundação de cultivares híbridas pode gerar linhagens destinadas à síntese de novas variedades de milho híbrido.

2.3.1. Diversidade genética e heterose

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

As análises de divergência genética visam a identificação de genitores para a formação de populações com variabilidade genética e conseqüente ganho genético em ciclos sucessivos de seleção. 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 et al., 2003).

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

A avaliação da divergência genética é muito utilizada pelos melhoristas de milho para a seleção de parentais. Esse enfoque visa selecionar os materiais mais promissores, diminuindo os gastos e o tempo necessário para a realização de várias combinações híbridas, muitas vezes desnecessárias. Os esforços são concentrados nas combinações entre os materiais mais divergentes (Rinaldi et al., 2007).

No contexto de diversidade genética, os dados obtidos experimentalmente são utilizados para estimar parâmetros genéticos. Em geral, as estimativas de diversidade genética em uma amostra populacional baseiam-se em dois níveis de variação: o número de alelos dos locos analisados e a frequência desses alelos na população. Com base nessas estimativas, diferentes parâmetros podem ser calculados, possibilitando uma maior compreensão da diversidade populacional (Ferreira, 2004).

A caracterização molecular da diversidade genética do germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na identificação e na seleção dos genitores para estabelecer o programa de melhoramento (Pinheiro, 2003). Essa

caracterização permite a identificação de grupos heteróticos, isto é, populações cujos materiais derivados de cruzamentos apresentam, em média, níveis significantes de heterose.

2.3.2. Uso de marcadores moleculares para estimar a diversidade genética

O aumento do potencial de produtividade da maioria das espécies agrônômicas vem ocorrendo de forma consistente desde o século XX. Recentemente, a diversidade de procedimentos científicos utilizados no melhoramento de plantas foi expandida com o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos, de biologia molecular e celular e da citogenética (Borém e Miranda, 2005).

O estabelecimento, a manutenção e o melhoramento de grupos heteróticos vêm merecendo destaque entre as estratégias de melhoramento voltadas à obtenção de linhagens e híbridos. O uso de marcadores tem sido de grande importância, tornando-se mais conhecido e utilizado nos procedimentos de identificação de genótipos favoráveis contidos em populações heterogêneas (Paterniani e Campos, 2005).

A identificação de genitores com alta divergência tem sido objetivo de muitos trabalhos de melhoramento. Uma vez realizada a hibridação, busca-se, na progênie, os recombinantes cujos genótipos superiores sejam adaptados ao ambiente. Assim, a caracterização de germoplasma é necessária para disponibilizar informações sobre fontes de germoplasma aptas a serem utilizadas no futuro. Por outro lado, essa caracterização é igualmente importante para manter a diversidade da espécie, ou seja, para prevenir a redução dos recursos genéticos fundamentais ao sucesso da produção agrícola (Ganga, 2004). A informação sobre a diversidade genética pode evitar as redundâncias ou misturas de genótipos em estudos e programas de conservação de germoplasma (Pinheiro, 2003).

Como já comentado, a exploração da heterose é uma estratégia frequentemente utilizada no melhoramento de alógamas. Consiste na produção de híbridos superiores a partir de linhas puras que se combinam apropriadamente. Considerando a morfologia dos órgãos reprodutivos do milho, o número de

sementes obtidas em cada autofecundação e a relativa facilidade de treinamento de pessoal para a execução desse trabalho, o número de linhagens que se pode obter é muito grande. As maiores limitações serão encontradas posteriormente à obtenção das linhagens, durante a avaliação dos híbridos e a análise de sua utilização (Paterniani e Campos, 2005). De fato, um dos maiores entraves à exploração comercial da heterose está na avaliação da capacidade combinatória das linhagens, pois se trata de uma etapa trabalhosa, demorada e de alto custo (Serafini et al., 2001).

Os marcadores de DNA podem auxiliar indiretamente na predição do desempenho dos híbridos, pois permitem a obtenção de estimativas de distância genética. Tais estimativas são importantes pela suposição de que uma maior dissimilaridade entre as linhagens, do ponto de vista molecular, corresponde a uma maior probabilidade de geração de híbridos superiores (Serafini et al., 2001).

Com o rápido aperfeiçoamento das técnicas moleculares, fundamentadas na amplificação de fragmentos de DNA, grandes avanços têm sido alcançados na área dos marcadores de DNA (Padilha et al., 2003). Os marcadores moleculares têm sido empregados extensivamente e com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade existente entre os indivíduos. Com o desenvolvimento dessas ferramentas para as análises genéticas, tornou-se possível examinar com maiores detalhes a origem evolucionária dos genomas vegetais, bem como acessar o grau de variabilidade genética relatado em grupos de plantas (Borém e Miranda, 2005; Beckmann, 2006).

Os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: marcadores obtidos por hibridização e marcadores obtidos por amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os marcadores minissatélites, também conhecidos como VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já os marcadores revelados por amplificação incluem os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*),

SSR (*Simple Sequence Repeats*, mais tarde denominadas microssatélites) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis apresentam ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo de grande potencial para avaliação da diversidade genética, com aplicações filogenéticas e evolutivas (Dias, 1998).

Durante a avaliação de genótipos por meio dos marcadores moleculares, a presença de bandas comuns a todos sugere a ocorrência de semelhanças genéticas entre tais genótipos. Obviamente, a presença de bandas não comuns aos materiais analisados é um indício de diferenças genéticas entre os mesmos (Dias, 1998). Uma vez obtidas as estimativas de distância genética, os resultados são codificados de forma a gerar uma matriz de similaridade que pode ser graficamente interpretada por meio de análise de agrupamento ou multivariada (Guimarães e Moreira, 2005).

Os marcadores moleculares podem ser usados para a obtenção de inferências sobre o potencial heterótico interpopulacional, contribuindo para a seleção das populações que poderão ser utilizadas tanto para o seu melhoramento *per si* como para o desenvolvimento de híbridos a partir da condução de métodos interpopulacionais, particularmente os de seleção recorrente recíproca, capitalizando os efeitos aditivos e de dominância (Borém e Miranda, 2005; Paterniani e Campos, 2005).

Os métodos de seleção recorrente recíproca visam melhorar duas populações simultaneamente, por meio de modificações de suas frequências gênicas, resguardada a individualidade de cada uma. Na medida em que uma população é utilizada como testadora da outra, tais métodos conferem muitas vezes um aumento na resposta heterótica entre ambas, tanto em híbridos interpopulacionais como em linhas puras. Desta forma, aumenta a probabilidade de obtenção de linhagens que, intercruzadas, constituem híbridos superiores em rendimento e outros atributos de interesse agrônomico (Pinto, 1995; Borém e Miranda, 2005; Paterniani e Campos, 2005).

A técnica de marcadores microssatélites ou SSR (*Seqüências Simples Repetidas*), uma das alternativas mais utilizadas atualmente, consiste na análise de

segmentos de seqüência repetida de DNA que são amplificados utilizando-se pares de *primers* específicos. Tais segmentos encontram-se distribuídos aleatoriamente no genoma (Padilha et al., 2003). Para a amplificação de regiões repetitivas do tipo microssatélite, é necessário utilizar um par de *primers* específicos que possua homologia com uma região única no genoma, e que flanqueie uma seqüência que contenha no máximo seis pares de bases que se repetem um determinado número de vezes, em ‘*tandem*’. O número de repetições pode variar, dependendo do indivíduo (Freitas, 2005).

A técnica de microssatélites é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, sendo ainda facilmente automatizada. Esses marcadores possuem características de multialelismo e co-dominância, apresentando um elevado conteúdo de informação genética por loco. A característica de co-dominância permite que sejam detectadas as diferentes contribuições parentais nas progênies. Outra vantagem dos microssatélites é que eles requerem uma pequena quantidade de DNA, sendo, portanto, extraídos de qualquer material biológico, como sementes ou plântulas em diferentes fases do desenvolvimento, permitindo uma avaliação precoce e eficiente (Padilha et al., 2003; Guimarães e Moreira, 2005).

Os marcadores SSR constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares atualmente disponíveis. Muito freqüentes e distribuídos ao acaso, os microssatélites permitem a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Todas estas características reunidas fazem com que marcadores baseados em SSR sejam ideais para o mapeamento genético e físico de genomas, bem como para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.3.3. Utilização de bulks

A utilização de *bulks* de DNA vem ocorrendo de forma sistemática, principalmente pela economia de tempo, de mão-de-obra e de recursos empregados na pesquisa, em contraposição ao esforço a ser dispendido em experimentos que incluam a genotipagem de centenas ou milhares de plantas individuais.

Kongkiatngam et al. (1996) realizaram um dos primeiros trabalhos descrevendo a aplicação de marcadores moleculares em *bulks* de DNA, ao invés de plantas individuais. Os autores utilizaram marcadores RAPD obtidos de amostras agrupadas (*bulks*), para a identificação de cultivares de trevo vermelho.

O uso de *bulks* também foi relatado para milho. Ornella et al. (2001) utilizaram 20 microssatélites para analisar e estimar o grau de relação genética entre 35 linhagens de milho provenientes do INTA, em Pergamino (Argentina). Para tanto, da mesma forma que no trabalho de Kongkiatngam et al. (1996), o DNA foliar foi extraído em *bulk*, tomando-se material oriundo de 5 a 10 plantas por linhagem.

Parentoni et al. (2001) avaliaram 28 variedades de polinização aberta de milho, utilizando marcadores RAPD. Durante a etapa de genotipagem das variedades, cada amostra varietal foi constituída por um *bulk* de DNA proveniente de 80 plântulas de cada população.

Yao et al. (2007) avaliaram 54 populações regionais de milho provenientes das províncias chinesas de Sichuan, Chongqing, Guizhou e Yunnan. Durante a preparação do material, o DNA genômico de cada população foi isolado a partir de uma amostra em *bulk* tomada de 15 plantas individuais, objetivando a análise da diversidade genética das populações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genótipos utilizados

Neste trabalho, foram analisados 25 genótipos de milho-pipoca. Os genótipos estão listados no Quadro 1. Pode ser observado que as populações constituem a grande maioria dos materiais avaliados.

Quadro 1- Genótipos de milho-pipoca avaliados

<i>Bulk</i>	Genótipo	Observação
<i>Bulk 1</i>	Jade	híbrido
<i>Bulk 2</i>	Ângela	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 3</i>	Zélia	híbrido
<i>Bulk 4</i>	Composto V1	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 5</i>	Iguatemi 2	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 6</i>	Composto V2	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 7</i>	Composto Barreto	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 8</i>	Composto Matheus	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 9</i>	P1 sintético	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 10</i>	Composto Fracaro	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 11</i>	Iguatemi I	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 12</i>	Composto Aelton	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 13</i>	PR-023	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 14</i>	IAC-112	híbrido
<i>Bulk 15</i>	IAC-112 F2	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 16</i>	Argentina	-
<i>Bulk 17</i>	UNB-2	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 18</i>	PA-091	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 19</i>	Chile	-
<i>Bulk 20</i>	Viçosa	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 21</i>	CMS-42	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 22</i>	SE-013	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 23</i>	Laranjeiras do Sul	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 24</i>	UEM – M2	variedade de polinização aberta
<i>Bulk 25</i>	IAC-125	híbrido

Os genótipos Jade e Zélia são híbridos triplos desenvolvidos pela empresa DuPont do Brasil S.A. – Divisão Pioneer Sementes, a partir de mesclas entre germoplasma temperado e germoplasma tropical.

O genótipo Angela é uma variedade de polinização aberta desenvolvida pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da EMBRAPA (Sete Lagoas, MG). Foi obtida por meio de seis ciclos de seleção recorrente aplicados ao

Composto Pipoca Branco Redondo (CMS-43), formado a partir de 33 materiais de grãos brancos e selecionado para resistência a *Puccinia* spp. e *Exserohilum turcicum*.

O composto V1 é uma variedade de polinização aberta obtida a partir da recombinação de cruzamentos entre IAC-112 e Zélia. Analogamente, o composto V2 foi obtido por cruzamento entre IAC-112, Zélia e Angela, com posterior recombinação.

O genótipo Iguatemi 1 é um composto formado por cruzamentos envolvendo as linhagens S₅ de Zélia, CMS-42, CMS-43, UEM-J1, RS-20, um genótipo americano e um material comercial denominado Catedral. O genótipo Iguatemi 2 é um composto formado pelo cruzamento de linhagens S₅ de Zélia, IAC-112, CMS-42, CMS-43, UEM-J1, Viçosa e RS-20 com um genótipo americano e um material comercial denominado Catedral.

O composto Barreto foi obtido por cruzamento de cinco linhagens elite extraídas de Zélia, com cinco linhagens da população local UEM-J1, esta última oriunda de um produtor rural e, portanto, de genealogia desconhecida.

O composto Matheus originou-se do cruzamento de oito populações de grãos brancos (PR-038, PR-079, RR-046, SC-016, PR-017, Angela, SC-002 e PR-009). Com exceção de Angela, todos os materiais são gerações avançadas de híbridos americanos.

O genótipo P1 sintético originou-se do cruzamento de linhagens extraídas de um híbrido americano, de genealogia desconhecida, com linhagens obtidas do IAC-112.

O Composto Fracaro foi originado do cruzamento de híbridos *topcross* entre Angela, IAC-112 e Zélia com linhagens S₂ provenientes de CMS-43.

O composto Aelton foi obtido a partir do cruzamento de 5 linhagens elite S₄ obtidas de Zélia.

O genótipo PR-023 é uma população de polinização livre obtida de gerações avançadas de um híbrido americano de genealogia desconhecida.

O genótipo IAC-112 é um híbrido simples modificado desenvolvido por Eduardo Sawazaki no Instituto Agrônomo de Campinas, oriundo de combinação

de linhagens da variedade SAM com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani e Viçosa Amarelo. O genótipo IAC-112 F2 é a própria geração F₂ deste mesmo híbrido. Da mesma forma, o genótipo IAC-125 é um híbrido *topcross* também proveniente do Instituto Agronômico de Campinas.

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

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

O genótipo PA-091 é fruto de geração avançada de um híbrido americano, fornecido pela profa. Valéria Carpentieri Pipolo, da UEL.

O genótipo Chile é um material de genealogia desconhecida.

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

A variedade CMS-42, denominada Composto Pipoca Amarelo Redondo, foi desenvolvida pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da EMBRAPA (Sete Lagoas, MG), com base em 25 materiais de grãos amarelos.

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

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

Da mesma forma que Laranjeiras do Sul, a variedade UEM-M2 também é material de produtor, com genealogia desconhecida.

3.2. Extração do DNA

Para a extração de DNA das amostras e formação dos *bulks*, foram coletadas 0,150g de folhas de 78 plantas de cada genótipo. As plantas tinham cerca de 15 dias no momento das coletas. O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994), com pequenas modificações.

A extração foi realizada em tubo *eppendorf* (2 mL), contendo tecido vegetal previamente pulverizado com nitrogênio líquido e 800 µl de tampão de extração CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 0,5M pH 8,0; CTAB 1% e 140 mM de β-mercaptoetanol), previamente preparado. Os tubos foram agitados para homogeneização e incubados em banho-maria a 65°C durante 1h, realizando-se agitações suaves a cada 5 minutos. Após serem removidos do banho, quando atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1, com inversão suave durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 13000 r.p.m. sob temperatura ambiente. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), com agitação suave durante 5 minutos. Após uma nova centrifugação a 13000 r.p.m. durante 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante coletado foi transferido para tubo *eppendorf* limpo. Para precipitar o DNA, foram adicionados 470 µl de isopropanol gelado, misturando-se levemente por inversão por 1 minuto. As amostras foram mantidas *over-night* a -20°C para uma melhor precipitação.

Após a etapa descrita acima, efetuou-se uma centrifugação a 13.000 r.p.m. por 5 minutos, em temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 800 µL de etanol 70% gelado, misturando-se levemente por inversão por 1 minuto, seguindo-se uma nova centrifugação a 13.000 r.p.m. por 5 minutos, em temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante e feita a secagem do *pellet* de DNA, foram adicionados 400 µL de TE (1M TRIS/HCl e 0,5M EDTA), mantendo-se o material *over-night* a 4°C.

Após 24 horas, foram adicionados 2 µL de RNase a 10ng/µL, e mantido a temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, foram adicionados 200 µL de

fenol mais 200 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), realizando-se agitação durante 5 minutos e centrifugando a 13.000 r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um *ependorf* limpo, adicionando 400 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguindo-se uma agitação durante 5 minutos e centrifugando-se a 13.000 r.p.m. por 5 minutos sob temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para tubos *ependorf* limpos, adicionando-se 250 μ L de isopropanol e 25 μ L de NaCl 5M, os quais foram misturados por inversões suaves por 1 minuto, mantendo-se essa mistura *over-night* a -20°C .

Após o período acima descrito, foi realizada uma centrifugação a 13.000 r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 μ L de etanol 70% gelado, misturando-se por inversão por 1 minuto. Após efetuar uma nova centrifugação a 13.000 r.p.m. por 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi seco e ressuspenso em 50 μ L de TE. O DNA foi então estocado a 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. O gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290*, utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

3.4. Amplificação do DNA

Para a escolha dos marcadores polimórficos, foram avaliados 100 microssátelites já mapeados em milho comum. Todos os microssátelites utilizados foram obtidos a partir do *site Maize BD* acessado em <http://www.agron.missouri.edu>.

A PCR foi preparada em microplacas de 0,2 mL, usando um termociclador Techne TC-512. Para a amplificação do DNA e escolha dos *primers* foram

utilizados: 25 ng de DNA de duas amostras, com 2,0 μL de tampão de reação 10X, com 2,0 mM de MgCl_2 , com 0,1 μM de cada dNTP, com 1 U de Taq-DNA Polimerase, e 0,2 μM dos *primers* F e R específicos em um volume final de 20 μL (Quadro 2).

Quadro 2 - Concentrações dos reagentes estoques e utilizados nas reações de amplificação

Reagentes	Concentração estoque dos reagentes	Concentração final dos reagentes/reação	$\mu\text{L}/20\mu\text{L}$ de reação
H_2O			12.1
Tampão	10 X	1 X	2
MgCl_2	25 mM	2,0 mM	1.6
DNTPs	2,5 mM/cada	0,1 mM/cada	0.8
<i>Primer</i> (F)	10 μM	0,2 μM	0.4
<i>Primer</i> (R)	10 μM	0,2 μM	0.4
Taq-DNA Polimerase	5 U/ μL	1 U	0.2
DNA	25ng	2.5
Total			20 μL

Considerando o grupo inicial de 100 microssatélites, foram selecionados 23 *primers*: *umc* 2293, *umc* 2196, *umc* 2262, *umc* 2245, *umc* 2281, *umc* 1336, *umc* 2292, *umc* 1071, *umc* 1736, *umc* 1636, *umc* 2343, *bnlg* 1063, *umc* 1241, *umc* 1292, *bnlg* 2295, *umc* 2080, *umc* 1664, *umc* 2116, *bnlg* 1083, *umc* 1077, *umc* 1363, *umc* 1590 e *mmc* 0501.

Para a amplificação dos microssatélites, inicialmente foi utilizado o programa *Touchdown PCR* (Don et al., 1991) (Quadro 3). No entanto, para os *primers* *umc* 1664, *umc* 2116 e *umc* 2245 foi utilizado programa com temperatura de anelamento específica em 50° C. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose MS-8 (4%) e gel de poliacrilamida (10%). Para o gel de agarose foi usado tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). O gel foi preparado com 50% agarose MS-8 e 50% agarose normal. A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 60 volts durante 4,5 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290, utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para o gel de poliacrilamida (10%) foi usado tampão TBE

1x. Foi preparado um gel desnaturante com uréia 6M, Tampão TBE 1x, poliacrilamida 40% (acrilamida e bisacrilamida), persulfato de amônio 10% e TEMED. A eletroforese foi realizada sob uma diferença de potencial de 325 V, durante aproximadamente 3,5 horas. Os géis foram corados com nitrato de prata (0,1%), seguindo a metodologia descrita por Sanguinetti et al. (1994), com algumas modificações. Foram utilizadas para esta coloração três soluções. A primeira solução foi a de fixação, composta por água destilada, etanol absoluto (10%) e ácido acético glacial (0,5%). A segunda foi a de impregnação, contendo água destilada e nitrato de prata (0,1%), e a terceira, a reveladora, contendo água destilada, hidróxido de sódio (3%) e formaldeído (0,22%). Após a revelação, a reação foi interrompida adicionando a solução fixadora.

Quadro 3 - Seqüência do programa utilizado para amplificação do DNA

Passo	Etapa	Temperatura	Touchdown
1	Desnaturação inicial	94°C	1 Min.
2	Desnaturação	94°C	1 Min.
3	Anelamento	65°C (-1°C/ciclo)	1 Min.
4	Extensão	72°C	2 Min.
5	Desnaturação	94°C	1 Min.
6	Anelamento	65°C (-1°C/ciclo)	1 Min.
7	Extensão	72°C	2 Min.
	Volta ao passo 2-9		
8	vezes	—	—
9	Desnaturação	94°C	1 Min.
10	Anelamento	55°C	1 Min.
11	Extensão	72°C	2 Min.
	Volta ao passo 9-17		
12	vezes	—	—
13	Extensão final	72°C	2 Min.
14	Imersão	100C	—

3.5. Análise genética e estatística

Para a análise dos resultados, cada fragmento de DNA amplificado e identificado como uma banda no gel eletroforético foi considerado como um fenótipo distinto e independente dos demais.

O cálculo da distância genética entre duas populações (I e J) foi estimado de acordo com Yao (2007), a partir do índice de similaridade genética obtido pela expressão:

$$GS = 2 \frac{N_{ij}}{N_i + N_j}$$

em que N_{ij} é o número de alelos comuns a ambas as populações para determinado *primer*, N_i é o número total de alelos SSR na população i e N_j o número total de alelos na população j. A dissimilaridade entre pares de itens foi portanto estimada por:

$$D_{ij} = 1 - GS = 1 - \left\{ 2 \left[\frac{N_{ij}}{N_i + N_j} \right] \right\}$$

Com base nas distâncias, foi construída uma matriz de valores D_{ij} , a qual deu origem às análises subseqüentes calculadas com o auxílio do aplicativo Genes versão 4.1 (Cruz, 2006 a,b,c).

Os dendrogramas destinados à análise de agrupamento (*cluster*) foram obtidos a partir dos valores detectados para as distâncias genéticas.

Foram utilizados no presente trabalho alguns métodos de uso generalizado em Biologia, conhecidos como métodos hierárquicos aglomerativos: método da ligação simples ou vizinho mais próximo; método da ligação completa ou vizinho mais distante e método das médias das distâncias (UPGMA), abreviatura inglesa de *unweighted pair-group method using an arithmetic average*. Os métodos hierárquicos impõem uma estrutura de dados que obedece ao princípio intuitivo de agrupamento natural, no qual uma região de alta densidade de pontos é delimitada por regiões de baixa densidade. Os métodos hierárquicos aglomerativos têm em

comum sua ligação direta com a matriz das distâncias genéticas, dispensando o retorno à matriz dos dados originais. Dias (1998) expõe detalhes sobre os cálculos necessários à utilização dos métodos mencionados acima.

A mesma matriz de distâncias genéticas foi utilizada para a divisão dos genótipos em grupos definidos pelo método de otimização de Tocher. O método de otimização de Tocher, apresentado em Cruz & Carneiro (2006), constitui um sistema de agrupamento simultâneo que realiza de uma só vez a separação dos genótipos em grupos. No Brasil, o método de Tocher vem sendo amplamente empregado no estudo da divergência genética entre acessos (Marchioro et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Karasawa et al., 2005; Souza et al., 2005). Este método utiliza um único critério de agrupamento e possui a particularidade de considerar a distância média dentro dos grupos sempre menor que a distância média entre grupos (Vasconcelos et al., 2007).

Foi realizada também a representação gráfica da projeção das distâncias no plano e no espaço, a duas e três dimensões (Cruz, 2006 a,b,c).

Para a avaliação dos métodos de agrupamento, foi utilizado o coeficiente de correlação cofenética (Rohlf e Sokal, 1981), que considera o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de distância D. Os coeficientes cofenéticos foram calculados conforme indicado por Dias (1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de *primers*

No presente trabalho, o método para a extração de DNA descrito por Hoisington et al. (1994) foi adequado para extrair o DNA genômico dos *bulks* formados a partir de folhas jovens de 78 plantas de cada um dos 25 genótipos de milho-pipoca selecionados para o referido estudo.

A quantificação do DNA genômico das folhas das progênes foi realizada pela comparação visual da intensidade das bandas de DNA do fago λ , em gel de agarose, com as bandas das amostras, indicando que a quantidade de DNA variou de 25 a 100 ng/ μ L (Figura 1).

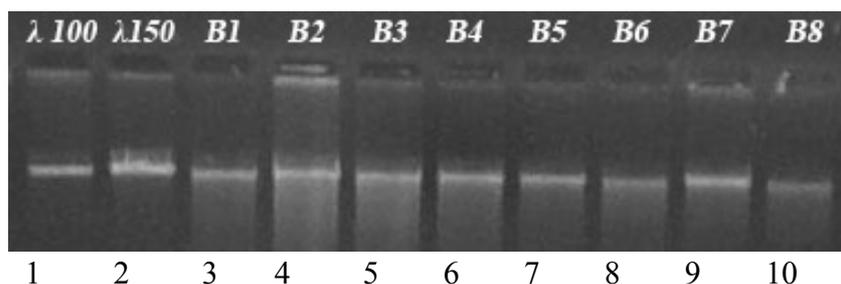


Figura 1- Gel de agarose 0,8% utilizado para quantificar o DNA extraído das diferentes variedades de milho-pipoca. As amostras de 3 a 10 são DNAs extraídos das diferentes variedades. Amostras 1 e 2 são DNAs de Fago λ com 100 e 150 ng.

A utilização do programa Touchdown PCR (Don et al., 1991) foi adequada para as condições de anelamento da maioria dos 100 pares de *primers* testados. Para 10 *primers* foi necessária uma fixação da temperatura de anelamento em 50° C.

A seleção dos microssatélites foi feita utilizando-se duas amostras de DNA das progênes, escolhidas ao acaso, e analisadas em gel de agarose MS8 para verificar a complementaridade e reprodutibilidade dos *primers*. Dos 100 *primers* testados, 41 foram polimórficos e 59 monomórficos. Entre os 41 polimórficos, 23 *primers* foram selecionados para investigar a variabilidade genética nos 25 *bulks*

das populações estudadas. A seleção dos *primers* baseou-se na maior definição das bandas no gel e na presença de alelos diferentes (Quadro 4).

Entre os 23 *primers* utilizados, *umc1336*, *umc2245*, *umc2262* e *mmc0501* foram os que mais contribuíram para a matriz de dissimilaridade. Já os *primers umc1292* e *umc2196* foram os menos polimórficos. Não houve relação aparente entre a contribuição informativa desses *primers* com o cromossomo associado a cada um. Os 23 *primers* microssatélites distribuídos em 9 cromossomos permitiram a detecção de um total de 100 alelos entre as variedades. O número de alelos por locos variou de 2 a 7, sendo o maior número de alelos detectado no *primer bnlg 1083*.

Na amplificação, a concentração adotada para as reações foi de 25 ng de DNA/20 μ L. Esta concentração foi empregada pela análise preliminar da quantificação.

4.2. Dissimilaridades e distâncias genéticas

A comparação dos distintos padrões eletroforéticos obtidos através de marcadores microssatélites permitiu a obtenção de coeficientes de similaridade genética interpopulacional (GS). Como já mencionado no item 3.5, os coeficientes de dissimilaridade genética foram obtidos por complementação de GS.

Considerando que as estimativas de dissimilaridade estarão cumprindo, neste trabalho, função análoga à desempenhada pela distância de Rogers (1972) em trabalhos semelhantes, as dissimilaridades mencionadas serão referidas, a partir de agora, como distâncias genéticas. A matriz de distâncias encontra-se no Quadro 5.

A forma como as medidas de dissimilaridade foram obtidas pode ter exercido uma influência sobre a matriz de distâncias. Como já mencionado, a utilização de *bulks* de DNA vem ocorrendo de forma sistemática (Kongkiatngam et al., 1996; Ornella et al., 2001; Parentoni et al., 2001; Yao et al., 2007), e se justifica pela economia de tempo, mão-de-obra e recursos empregados na pesquisa, em contraposição ao esforço a ser dispendido em trabalhos que incluam a genotipagem de centenas ou milhares de plantas individuais.

Quadro 4 - Sequências dos *primers* de microssatélites, nº de alelos detectados por cada *primer* e localização destes nos cromossomos, usados na estimação da diversidade genética nas 25 variedades de milho-pipoca

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos	Nº alelos	Cromossomo
<i>umc</i> 2293	Forward AAAGAACAGACGCGATCCAATC Reverse ATGTTCCGTTTATTATTTGCCCG	3	5
<i>umc</i> 2196	Forward ATCCTCTCCCATCTCTCGGTCT Reverse CCTAGACCAGCTTGGTGACTCAG	2	6
<i>umc</i> 2262	Forward TCTGTTTCGGGATTCTTCTTCAGTC Reverse CGTTCCTGGTACCCTGTCTATAA	4	3
<i>umc</i> 2245	Forward GCCCTGTTATTGGAACAGTTTACG Reverse CGTCGTCTTCGACATGTACTTCAC	4	2
<i>umc</i> 2281	Forward CAATGATTGGAGCCTAACCCCT Reverse ATGATGATCTGCAGAGCCTAGTCC	4	4
<i>umc</i> 1336	Forward GTACAAATGATAAGCAAGGGGCAG Reverse CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTTGG	4	10
<i>umc</i> 2292	Forward AGCAGAAGAGGACAAACCAGATTC Reverse ACTTCCGGCATGTCTTGTGTTT	4	5
<i>umc</i> 1071	Forward AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG Reverse GTGGTTGTTCGAGTTCGTCGTATT	5	1
<i>umc</i> 1736	Forward CCATCCACCACTAGAAAAGAGAGGA Reverse TTAATCGATCGAGAGGTGCTTTTC	3	2
<i>umc</i> 1636	Forward CATATCAGTCGTTTCGTCCAGCTA Reverse GTACTGGTACAGGTCGTCGCTCTT	4	9
<i>umc</i> 2343	Forward TCATCTTCCCCACAAATTTTCATT Reverse GACTGACAACCTCAGATTTACCCA	3	9
<i>bnlg</i> 1063	Forward GGAGACAACCCCCGACGAC Reverse GGTACCAGAGCCACAGATCC	5	3
<i>umc</i> 1241	Forward TGAAGCAAGTCACTGGTAAGAGCA Reverse TGACACACCCATACTTCCAACAAG	3	7
<i>umc</i> 1292	Forward GAAGTGGGGAACATGGTTAATGTC Reverse TCACGGTTCAGACAGATACAGCTC	3	1
<i>bnlg</i> 2295	Forward CGGAGGAGTGGTTCTTGAAA Reverse GGTTAGTGAAAGGGTTGCCA	6	1
<i>umc</i> 2080	Forward GCCAAGGTGGGTCTGGCTAT Reverse ACCACCTTGTCGTATCCTTCAC	4	1
<i>umc</i> 1664	Forward AATTGTTTACTGCGCTGAAACTCC Reverse CCTCTTTGCTGTACCGGTATTTC	4	1
<i>umc</i> 2116	Forward CGGTCGATATAATCTTGGCTGATT Reverse GGCAGCAGAGATCATTGTTTAAAT	5	1
<i>bnlg</i> 1083	Forward ACAGTCTGTTGGGGAACAGG Reverse CAACGCTGGTTTGTCTTTA	7	1
<i>umc</i> 1077	Forward CAGCCACAGTGAGGCACATC Reverse CAGAGACTCTCCATTATCCCTCCA	6	10
<i>umc</i> 1363	Forward TGTTTAAGTGTGGCAGAAAGCAA Reverse TCTCCCTCCCCTGTACATGAATTA	5	1
<i>umc</i> 1590	Forward CAGAGTCTGATAGTCCGAACCCAG Reverse GTAAAGCTCACAGCTTCCGACAG	6	1
<i>mmc</i> 0501	Forward TGCTGAACACTCTAAGCAATAC Reverse ATTACTTACTCGCTGCCTG	6	10

Quadro 5 - Matriz de distâncias genéticas entre as 25 variedades de milho-pipoca, obtidas com a utilização de 23 *primers*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1	0,00	0,31	0,23	0,33	0,27	0,37	0,29	0,37	0,21	0,29	0,36	0,29	0,56	0,42	0,37	0,37	0,35	0,47	0,33	0,32	0,37	0,36	0,37	0,27	0,27	
2		0,00	0,37	0,27	0,27	0,30	0,27	0,25	0,33	0,23	0,32	0,33	0,43	0,38	0,35	0,46	0,28	0,39	0,49	0,29	0,31	0,25	0,31	0,26	0,29	
3			0,00	0,28	0,31	0,23	0,29	0,36	0,13	0,27	0,27	0,21	0,56	0,36	0,36	0,36	0,33	0,51	0,36	0,28	0,35	0,36	0,35	0,23	0,27	
4				0,00	0,22	0,11	0,20	0,27	0,32	0,21	0,21	0,20	0,52	0,36	0,34	0,42	0,28	0,39	0,42	0,20	0,33	0,34	0,34	0,33	0,32	
5					0,00	0,22	0,14	0,24	0,26	0,13	0,15	0,14	0,41	0,29	0,27	0,40	0,28	0,37	0,39	0,28	0,29	0,29	0,32	0,30	0,21	
6						0,00	0,21	0,28	0,29	0,19	0,21	0,17	0,50	0,31	0,30	0,38	0,26	0,41	0,43	0,19	0,35	0,32	0,31	0,33	0,27	
7							0,00	0,18	0,27	0,16	0,14	0,12	0,44	0,23	0,16	0,39	0,28	0,37	0,42	0,28	0,27	0,38	0,28	0,28	0,17	
8								0,00	0,32	0,23	0,24	0,22	0,39	0,31	0,25	0,46	0,32	0,34	0,54	0,36	0,37	0,31	0,32	0,35	0,32	
9									0,00	0,20	0,28	0,22	0,50	0,37	0,35	0,35	0,25	0,45	0,34	0,23	0,31	0,35	0,29	0,18	0,24	
10										0,00	0,21	0,16	0,42	0,33	0,32	0,36	0,18	0,36	0,39	0,19	0,27	0,31	0,23	0,19	0,19	
11											0,00	0,12	0,47	0,23	0,25	0,42	0,30	0,41	0,37	0,29	0,30	0,35	0,35	0,31	0,25	
12												0,00	0,45	0,24	0,22	0,36	0,29	0,38	0,40	0,31	0,30	0,36	0,30	0,31	0,19	
13													0,00	0,44	0,44	0,49	0,39	0,38	0,60	0,51	0,41	0,38	0,33	0,52	0,45	
14														0,00	0,13	0,43	0,36	0,41	0,52	0,39	0,40	0,44	0,36	0,33	0,29	
15															0,00	0,40	0,34	0,39	0,54	0,41	0,33	0,40	0,37	0,37	0,25	
16																0,00	0,30	0,54	0,31	0,38	0,33	0,44	0,42	0,37	0,28	
17																	0,00	0,32	0,38	0,22	0,19	0,30	0,26	0,23	0,23	
18																		0,00	0,55	0,42	0,30	0,35	0,30	0,43	0,32	
19																			0,00	0,33	0,39	0,52	0,45	0,34	0,35	
20																				0,00	0,27	0,32	0,27	0,21	0,24	
21																					0,00	0,29	0,25	0,28	0,18	
22																						0,00	0,30	0,32	0,30	
23																								0,00	0,24	0,22
24																									0,00	0,18
25																										0,00

Obs. Os genótipos estão numerados conforme o Quadro 1.

Ao ser utilizada a estratégia dos *bulks* de DNA, somente situações de presença de alelos em uma população e ausência dos mesmos alelos em outra população, sob o mesmo *primer*, contribuem efetivamente para o cálculo das distâncias e, posteriormente, para a formação de grupos.

A falta de informações sobre as frequências gênicas e genóticas inerentes aos locos analisados pode representar uma das limitações da metodologia. Naturalmente, esta observação não se aplica aos casos em que os materiais de interesse são geneticamente uniformes, na medida em que a coincidência praticamente perfeita entre os alelos (bandas) das diferentes plantas de uma mesma linhagem ou híbrido simples dispensaria a análise individual de DNA. Quando, porém, os genótipos avaliados são de base genética ampla, as informações sobre a distribuição das frequências contribuem para uma quantificação mais precisa das distâncias intervarietais. A aplicação de metodologias consagradas, tais como a diversidade de Nei (1973), por exemplo, requer a disponibilidade dessas informações, mediante a extração e a análise do DNA individual de cada planta.

A questão esboçada acima é mais clara supondo um exemplo em que duas populações, A e B, sejam aparentemente idênticas em relação aos alelos (bandas) 1, 2 e 3 obtidas com um mesmo *primer*. Neste caso, a contribuição deste *primer* para a estimativa do índice de dissimilaridade seria nula. Contudo, isto não significaria que A e B tivessem realmente grande similaridade entre si, pois na população A poderia predominar um alelo diferente do predominante em B. Em conseqüência disso, seria admissível a ocorrência de uma subestimação da dissimilaridade entre ambas.

A menos que as frequências gênicas e/ou genóticas das populações contrastantes sejam idênticas, a redução das distâncias genéticas tende a ser assimétrica, ou seja, variar segundo o par de variedades em confronto. O transtorno pode ser relevante, no presente estudo, porque o conjunto de 25 variedades de milho-pipoca engloba tanto materiais não segregantes de base genética estreita (híbridos simples) quanto populações melhoradas (parcialmente endógamas) e não melhoradas.

Logo, uma subestimação uniformemente distribuída das distâncias genéticas não seria prejudicial à formação de grupos consistentes, mas sim a natureza assimétrica desses desvios.

4.3. Métodos de agrupamento

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

Os métodos de agrupamento se distinguem pelo tipo de resultado fornecido em consequência das diferentes formas de definir a proximidade entre indivíduos e grupos, ou entre dois grupos quaisquer.

A literatura contém numerosos métodos de agrupamento utilizados nas mais diversas áreas da ciência (Dias, 1998). O agrupamento dos genótipos avaliados em função das distâncias estimadas exige a utilização de metodologias que maximizem a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos.

É importante ressaltar que não existe um único método hierárquico plenamente aplicável a todos os tipos de dados, isto é, capaz de gerar resultados superiores aos demais (Everitt, 1993). Por isso, é desaconselhável a utilização de um único método de agrupamento, sendo de grande interesse a posterior avaliação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos.

A avaliação da eficiência de cada método de agrupamento pode ser realizada por uma regra prática que consiste em verificar qual dos métodos aglomerativos apresenta os agrupamentos comuns à maioria dos demais.

O dendrograma obtido pelo método do vizinho mais próximo (Figura 2) revelou a presença de um grupo inicial formado pelas variedades 4 (Composto V1), 6 (Composto V2), 14 (IAC-112), 15 (IAC-112 F02), 11 (Iguatemi I), 12 (Composto Aelton), 7 (Composto Barreto), 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro) e 25 (IAC-125), ao qual se incorporaram progressivamente os demais genótipos. Os genótipos mais distantes foram 16 (Argentina), 18 (PA-091), 19 (Chile) e 13 (PR-023).

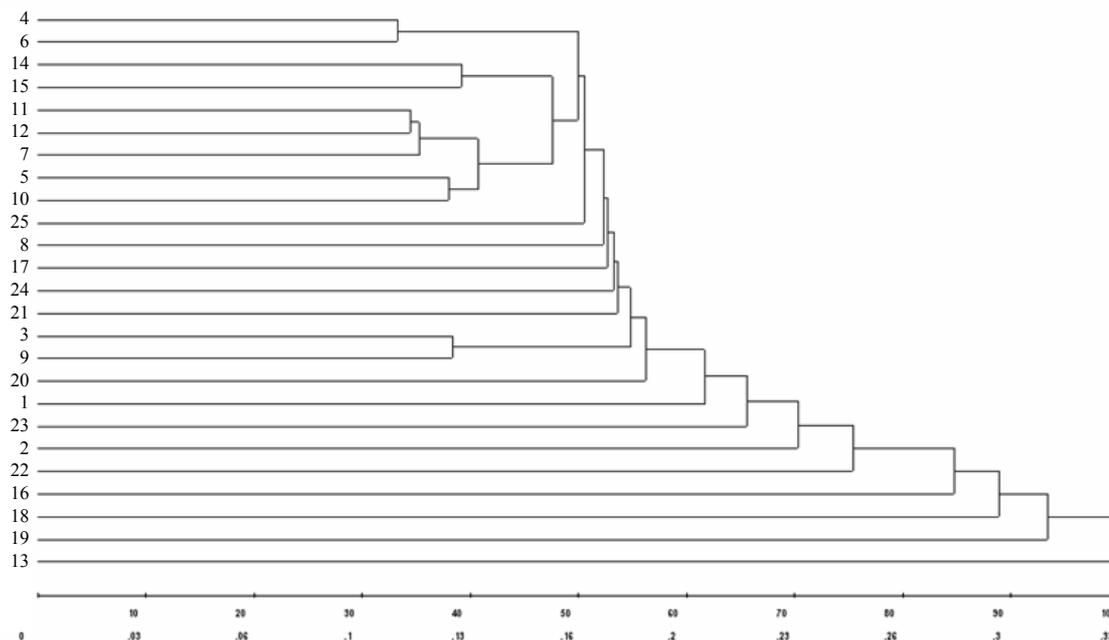


Figura 2 - Agrupamento obtido a partir do método do vizinho mais próximo para as 25 variedades de milho-pipoca.

Da mesma forma que no caso anterior, o dendrograma obtido pelo método do vizinho mais distante (Figura 3) revelou a concentração de vários genótipos no mesmo grupo inicial, integrado pelas variedades 4 (Composto V1), 6 (Composto V2), 20 (Viçosa), 2 (Angela), 22 (SE-013), 17 (UNB-2), 21 (CMS-42), 24 (UEM – M2), 25 (IAC-125) e 23 (Laranjeiras do Sul). A este grupo se integraram os genótipos 14 (IAC-112), 15 (IAC-112 F2), 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro), 11 (Iguatemi I), 12 (Composto Aelton), 7 (Composto Barreto) e 8 (Composto Matheus). No próximo nível de fusão, foram integrados os genótipos 13 (PR-023) e 18 (PA-091), e mais adiante as variedades 3 (Zélia), 9 (P1 sintético), 1 (Jade), 16 (Argentina) e 19 (Chile). Pode ser observado, portanto, que os híbridos 1 (Jade) e 3 (Zélia) e a variedade 9 (P01 sintético) formam um grupo distinto, que se une ao *cluster* integrado pelas variedades 16 (Argentina) e 19 (Chile). Esses cinco genótipos, por sua vez, constituem um *cluster* bastante afastado do grupo formado pela maioria das variedades.

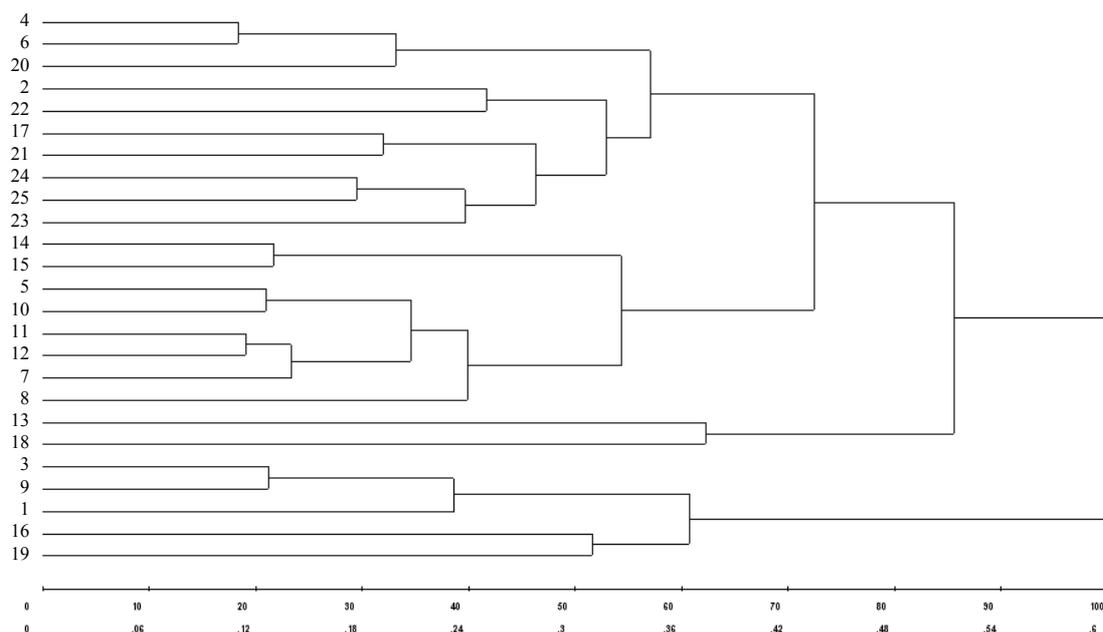


Figura 3 - Agrupamento obtido a partir do método do vizinho mais distante para as 25 variedades de milho-pipoca.

O dendrograma obtido pelo método UPGMA (Figura 4) revela a presença de um agrupamento inicial constituído pelos genótipos 4 (Composto V1), 6 (Composto V2), 20 (Viçosa), 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro), 11 (Iguatemi I), 12 (Composto Aelton), 7 (Composto Barreto) e 8 (Composto Matheus). A este grupo se incorporou um *cluster* formado pelos genótipos 17 (UNB-2), 21 (CMS-42), 24 (UEM – M2), 25 (IAC-125) e 23 (Laranjeiras do Sul). Num nível de fusão mais adiante, foram incorporados os genótipos 3 (Zélia), 9 (P1 sintético) e 1 (Jade). A seguir, foram agrupadas as variedades 2 (Angela) e 22 (SE-013), seguidas pelo *cluster* contendo 14 (IAC-112) e 15 (IAC-112 F2). Com relação aos materiais mais distantes, pode ser observada a inserção diferenciada das variedades 16 (Argentina), 19 (Chile), 13 (PR-023) e 18 (PA-091). Pode ser observado ainda que a variedade 16 (Argentina) está associada à 19 (Chile), enquanto 13 e 18 (PR-023 e PA-091, respectivamente) constituem um grupo a parte, muito afastado das demais.

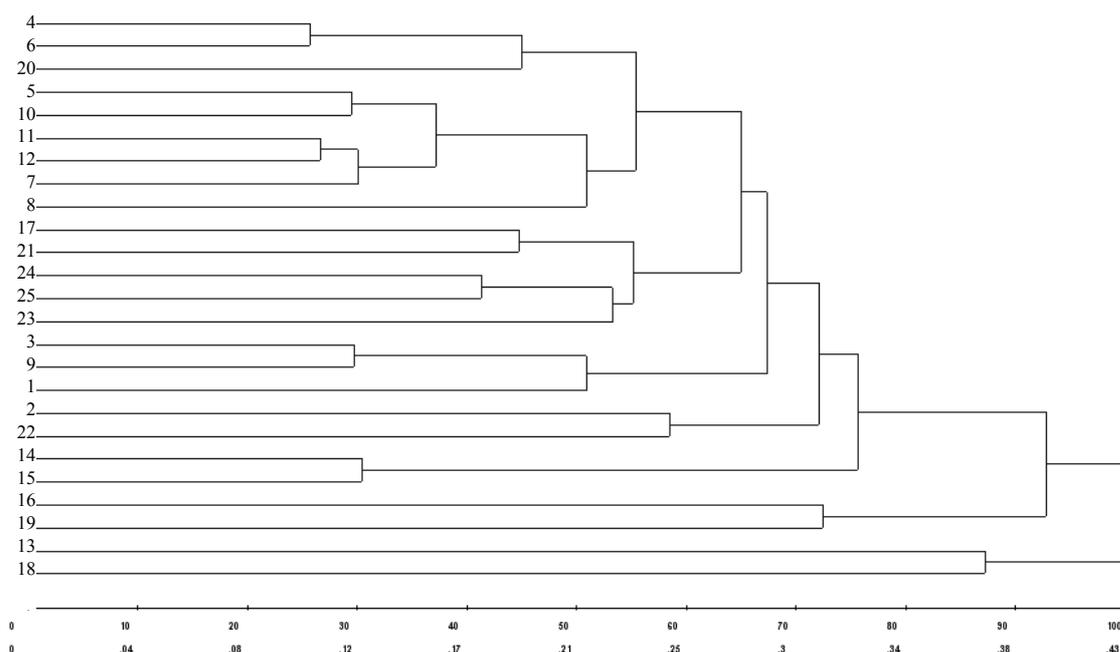


Figura 4 - Agrupamento obtido a partir do método UPGMA para as 25 variedades de milho-pipoca.

A aplicação dos métodos de Tocher e de Tocher modificado (Vasconcelos et al., 2007) encontra-se nos Quadros 6 e 7. Pode ser observada uma partição dos genótipos em quatro grupos, o primeiro dos quais compreendendo a grande maioria dos materiais (Composto V1, Composto V2, Composto Aelton, Composto Barreto, Iguatemi 1, Iguatemi 2, Composto Fracaro, IAC-125, Composto Matheus, Viçosa, P1 Sintético, UNB-2, UEM-M2, Zélia, CMS-42, Laranjeiras do Sul, Angela, IAC-112 F2, Jade, IAC-112 e SE-013). As variedades 16 (Argentina) e 19 (Chile) formam um grupo a parte, enquanto 18 (PA-091) e 13 (PR-023) estão isoladas em grupos próprios. Tais resultados também foram obtidos pela aplicação do método de Tocher modificado, salvo a fusão das variedades 13 (PR-023) e 18 (PA-091), as quais passam a integrar o mesmo *cluster*.

Quadro 6 - Formação dos grupos com a aplicação do método de Tocher para as 25 variedades de milho-pipoca

Grupo	Genótipos																								
1	4	6	12	7	11	5	10	25	8	20	9	17	24	3	21	23	2	15	1	14	22				
2	16	19																							
3	18																								
4	13																								

Quadro 7 - Formação dos grupos com a aplicação do método de Tocher modificado para as 25 variedades de milho-pipoca

Grupo	Genótipos																								
1	4	6	12	7	11	5	10	25	8	20	9	17	24	3	21	23	2	15	1	14	22				
2	16	19																							
3	18	13																							

Os resultados obtidos pela aplicação do método de Tocher foram bastante rígidos quanto à formação de grupos, pois o número de *clusters* foi pequeno e muitos materiais constituíram o mesmo agrupamento. Caso a interpretação dos resultados deste estudo dependesse apenas da informação gerada pela aplicação da metodologia de Tocher, seria plausível concluir que a maioria das variedades guarda uma similaridade genética relativamente grande entre si, a qual justifica a inclusão de tantos genótipos no mesmo grupo.

A formação simultânea de todos os agrupamentos, pelo método de Tocher, ao invés da progressiva formação de grupos, no caso dos métodos hierárquicos aglomerativos, pode ter contribuído para a detecção de um menor número de *clusters*.

4.4. Ajuste entre o dendrograma e a matriz de distâncias

A análise da genealogia das variedades estudadas demonstrou haver uma base genética frequentemente comum aos vários materiais avaliados, justificando, de certa forma, a presença de muitos genótipos dentro do *cluster* principal indicado pelo método de Tocher. No entanto, em termos práticos, a aplicação da metodologia de Tocher deixou a desejar porque a excessiva concentração de genótipos dentro do

mesmo grupo não contribuiu satisfatoriamente para a discriminação das variedades. Por isto, a partir deste ponto, será dada uma maior atenção à análise dos resultados obtidos pela aplicação dos métodos hierárquicos aglomerativos, sendo buscada a identificação do método que proporcionou o melhor ajuste entre o dendrograma e a matriz de distâncias, para melhor elucidar a relação genética entre os genótipos estudados.

Segundo Dudley (1994), o método das médias das distâncias (UPGMA) pode ser considerado superior aos métodos do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante para aplicações relacionadas ao melhoramento genético. O método UPGMA vem sendo recomendado por alguns autores (Sneath e Sokal, 1973; Romesburg, 1984).

A concordância entre os dados da matriz de distâncias e os valores de corte relativos aos respectivos dendrogramas é denominada correlação cofenética (Rohlf e Sokal, 1981).

Os Quadros 8, 9 e 10 apresentam um resumo do cálculo das correlações cofenéticas obtidas na aplicação dos métodos hierárquicos do vizinho mais próximo, do vizinho mais distante e da média de distâncias, respectivamente. Considerando as três metodologias, foi confirmada a superioridade do método UPGMA, pois seu valor cofenético (0,80) superou os demais.

Quadro 8 - Estágios de agrupamento, genótipos de referência (X e Y) de cada agrupamento, distâncias genéticas e nível de corte utilizados na quantificação da correlação cofenética relativa ao método do vizinho mais próximo

Estágio	Acesso x	Acesso y	Distância	Corte
1	4	6	0,111	0,1110
2	11	12	0,115	0,1130
3	7	11	0,118	0,1147
4	5	10	0,127	0,1250
5	3	9	0,128	0,1261
6	14	15	0,131	0,1313
7	5	7	0,136	0,1351
8	5	14	0,159	0,1470
9	4	5	0,167	0,1562
10	4	25	0,169	0,1631
11	4	8	0,175	0,1690
12	4	17	0,176	0,1737
13	4	24	0,178	0,1775
14	4	21	0,179	0,1805
15	3	4	0,183	0,1837
16	3	20	0,188	0,1870
17	1	3	0,206	0,1928
18	1	23	0,219	0,1997
19	1	2	0,235	0,2081
20	1	22	0,252	0,2179
21	1	16	0,283	0,2314
22	1	18	0,297	0,2445
23	1	19	0,312	0,2576
24	1	13	0,334	0,2717

Coeficiente de correlação cofenética: 0,78246

Quadro 9 - Estágios de agrupamento, genótipos de referência (X e Y) de cada agrupamento, distâncias genéticas e nível de corte utilizados na quantificação da correlação cofenética relativa ao método do vizinho mais distante

Estágio	Acesso x	Acesso y	Distância	Corte
1	4	6	0,111	0,1110
2	11	12	0,115	0,1130
3	5	10	0,127	0,1265
4	3	9	0,128	0,1305
5	14	15	0,131	0,1332
6	7	11	0,141	0,1392
7	24	25	0,178	0,1610
8	17	21	0,193	0,1774
9	4	20	0,200	0,1895
10	5	7	0,209	0,2003
11	1	3	0,233	0,2143
12	23	24	0,240	0,2259
13	5	8	0,241	0,2346
14	2	22	0,252	0,2435
15	17	23	0,280	0,2559
16	16	19	0,312	0,2721
17	2	17	0,320	0,2862
18	5	14	0,328	0,2988
19	2	4	0,345	0,3118
20	1	16	0,367	0,3259
21	13	18	0,376	0,3390
22	2	5	0,438	0,3594
23	2	13	0,517	0,3893
24	1	2	0,604	0,4282

Coeficiente de correlação cofenética: 0,61013

Quadro 10 - Estágios de agrupamento, genótipos de referência (X e Y) de cada agrupamento, distâncias genéticas e nível de corte utilizados na quantificação da correlação cofenética relativa ao método da média das distâncias

Estágio	Acesso x	Acesso y	Distância	Corte
1	4	12	0,1150	0,1130
3	5	10	0,1270	0,1265
4	3	9	0,1280	0,1305
5	7	11	0,1295	0,1329
6	14	15	0,1310	0,1348
7	5	7	0,1603	0,1486
8	24	25	0,1780	0,1637
9	17	21	0,1930	0,1773
10	4	20	0,1940	0,1862
11	1	3	0,2195	0,1999
12	5	8	0,2196	0,2092
13	23	24	0,2295	0,2184
14	17	23	0,2377	0,2270
15	4	5	0,2385	0,2339
16	2	22	0,2520	0,2416
17	4	17	0,2803	0,2529
18	1	4	0,2904	0,2637
19	1	2	0,3105	0,2758
20	16	19	0,3120	0,2859
21	1	14	0,3259	0,2963
22	13	18	0,3760	0,3127
23	1	16	0,3997	0,3299
24	1	13	0,4308	0,3489

Coefficiente de correlação cofenética: 0,803651

4.5. Projeção das distâncias no plano e no espaço

A verificação das distâncias entre os genótipos e da dispersão dos pontos que eles representam em duas ou três dimensões constitui uma etapa adicional na análise dos resultados de divergência interpopulacional.

A validade da representação gráfica da projeção das distâncias no plano e no espaço, segundo metodologia desenvolvida por Cruz e Viana (1994), depende da magnitude de uma estatística denominada estresse, introduzida por Kruskall (1964).

O estresse mede o grau de ajustamento das distâncias obtidas a partir da matriz de coordenadas de dimensão em relação à matriz de distâncias originais, entre todos os pares de itens.

O coeficiente de estresse varia de 0 a 1. Kruskall (1964) sugere uma escala na qual valores de estresse correspondentes a 0,40, 0,20, 0,10, 0,05 e 0,00 qualificam o ajustamento como ruim, moderado, bom, excelente e perfeito, respectivamente.

O Quadro 11 apresenta os dados de rebatimento no plano a duas dimensões. Embora a correlação entre os dados originais e os dados estimados tenha sido razoável (82,8%), o estresse observado na projeção em duas dimensões, sem transformação (45%), foi muito alto, indicando ajustamento precário entre a dispersão dos pontos obtida pela técnica de rebatimento no plano e matriz de distâncias originais (Quadro 5). Dada a baixa confiabilidade da dispersão, a projeção foi de pouca utilidade na interpretação dos níveis de agrupamento.

Quadro 11 - Projeção de distância a duas dimensões sem transformação

Total das distâncias originais	95,602
Total das distâncias estimadas	55,164692
Distorção (%)	42,297554
Correlação entre distâncias originais e estimadas	0,828485
Estresse (%)	45,046993

A transformação dos dados pode resultar na redução do estresse, constituindo-se, portanto, em uma estratégia para permitir a análise desejada. A elevação dos valores à segunda potência ($x \rightarrow x^2$) permitiu a obtenção de uma projeção mais apropriada (Quadro 12), pois a distorção foi reduzida de 42,3 para 1,7%, e o estresse, de 45 para 31%. Deste modo, torna-se viável a observação da disposição bidimensional dos pontos.

Quadro 12 - Projeção de distância a duas dimensões com transformação de dados ($x \rightarrow x^2$)

Total das distâncias originais	33,015700
Total das distâncias estimadas	33,591775
Distorção (%)	1,714928
Correlação entre distâncias originais e estimadas	0,81328
Estresse (%)	31,08229

A observação da disposição dos pontos (Figura 5) permite inferir que as variedades 16 (Argentina) e 19 (Chile) estão relativamente próximas entre si, mas não o suficiente para permitir a identificação de um grupo comum a ambas. Os híbridos 1 (Jade) e 3 (Zélia), e as variedades 13 (PR-023) e 19 (Chile) encontram-se

isoladas, particularmente as duas últimas, com alguma proximidade entre os híbridos da Pioneer. A aparente aproximação entre as variedades 18 (PA-091) e 22 (SE-013) não foi confirmada nem pelo dendrograma obtido pelo método UPGMA nem pelos resultados de agrupamento de Tocher.

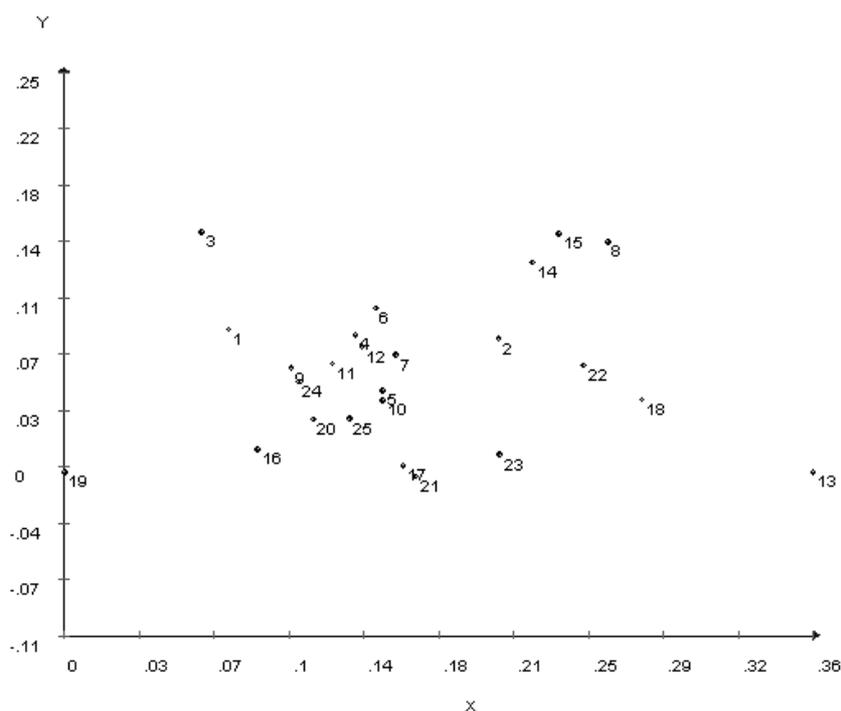


Figura 5 - Análise bidimensional com transformação de dados ($x \rightarrow x^2$) para as 25 variedades de milho-pipoca.

O acréscimo de uma dimensão à projeção bidimensional pode facilitar a interpretação da disposição dos pontos que representam os genótipos avaliados. No presente estudo, a elevação dos valores à segunda potência ($x \rightarrow x^2$) para a projeção em três dimensões permitiu ajustamento moderado do modelo (Quadro 13), com distorção de 14,3% e estresse de 35,7%.

Quadro 13 - Projeção de distância a três dimensões sem rotação e com transformação de dados ($x \rightarrow x^2$)

Total das distâncias originais	33,0157
Total das distâncias estimadas	38,528822
Distorção (%)	14,309086
Correlação entre distâncias originais e estimadas	0,830715
Estresse (%)	35,681404

A Figura 6 contém o gráfico da análise tridimensional. Pode ser observada uma aproximação entre as variedades 16 (Argentina) e 19 (Chile), ambas apartadas das demais. O mesmo pode ser verificado em relação aos genótipos 13 (PR-023) e 18 (PA-091), procedentes de materiais americanos. Por outro lado, o híbrido 3 (Zélia) encontra-se isolado de todas as outras variedades, como já detectado na projeção bidimensional.

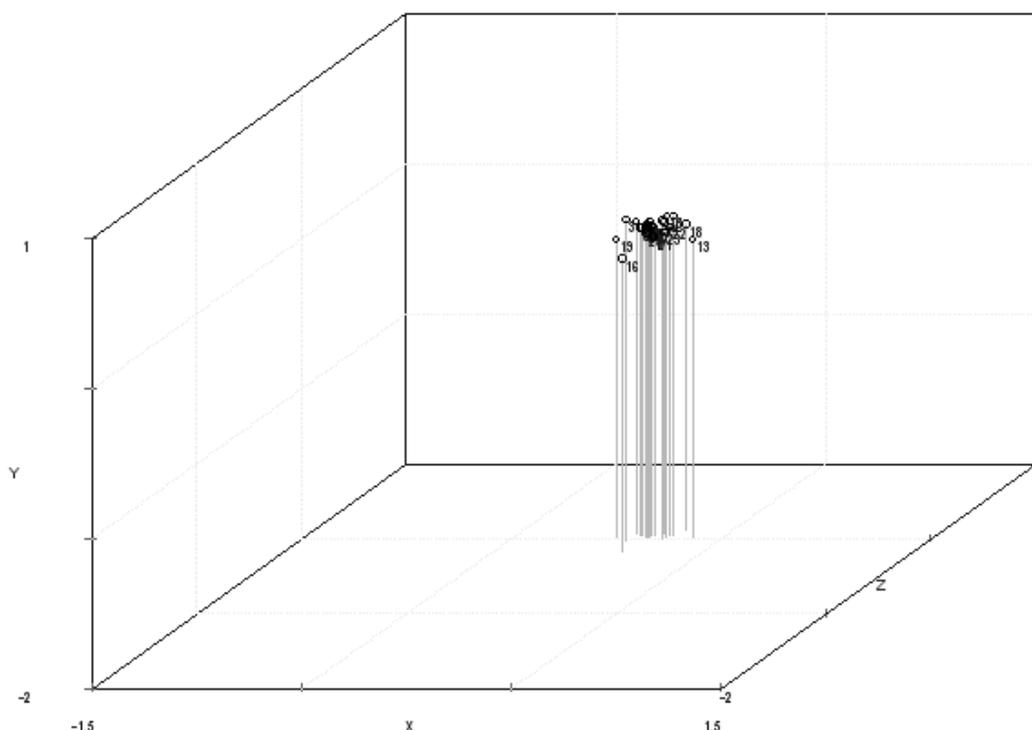


Figura 6 - Gráfico derivado da análise tridimensional com transformação de dados e sem rotação ($x \rightarrow x^2$) para as 25 variedades de milho-pipoca.

4.6. Relação entre os agrupamentos e a genealogia das variedades

A consistência e o nível de informação dos grupos de variedades podem ser avaliados em função da correspondência entre os dados moleculares e a genealogia dos materiais em estudo.

Por meio do dendrograma produzido pela aplicação do método UPGMA (Figura 4), pode ser verificado que o primeiro agrupamento envolve as variedades 4 (Composto V1) e 6 (Composto V2). O *cluster* entre ambas é justificado na medida

em que ambos os compostos apresentam em comum os parentais IAC-112 e Zélia, diferindo apenas porque o Composto V2 está relacionado com a variedade Angela.

O segundo nível de fusão corresponde à incorporação do genótipo 20 (Viçosa) ao grupo anterior. Esta fusão se justifica parcialmente, pois Viçosa é proveniente de cruzamentos entre populações locais e híbridos norte-americanos, tendo em comum com os anteriores o germoplasma de híbridos norte-americanos eventualmente presentes na genealogia de IAC-112 e Zélia.

Iguatemi 2 é um composto formado pelo cruzamento de linhagens S_5 de Zélia, IAC-112, CMS-42, CMS-43, UEM-J1, Viçosa e RS 20 com um genótipo americano e um material comercial denominado Catedral. Já o Composto Fracaro foi originado do cruzamento de híbridos *topcross* entre Angela, IAC-112 e Zélia com linhagens S_2 provenientes de CMS-43. Portanto, o agrupamento formado pelas variedades 5 (Iguatemi 2) e 10 (Composto Fracaro) é justificado porque ambos possuem três genitores em comum.

O genótipo Iguatemi 1 é um composto formado por cruzamentos envolvendo linhagens S_5 de Zélia, CMS-42, CMS-43, UEM-J1, RS-20, um genótipo americano e um material comercial denominado Catedral. O composto Aelton foi obtido a partir do cruzamento de 5 linhagens elite S_4 obtidas de Zélia. Logo, o grupo formado pela associação entre os genótipos 11 (Iguatemi 1) e 12 (Composto Aelton) se justifica por ambos terem em comum genes provenientes de Zélia. Deve ser observado, no entanto, que a identidade genética entre o Composto Aelton e Zélia é maior do que entre o Composto Aelton e Iguatemi 1, sendo mais plausível que o Composto Aelton estivesse mais associado a Zélia. Analogamente, considerando que Iguatemi 1 e Iguatemi 2 coincidem em quase todos os parentais, diferindo apenas em Viçosa e IAC-112, seria de se esperar que Iguatemi 1 estivesse mais próximo de Iguatemi 2 do que do Composto Aelton.

Outro agrupamento detectado incorporou o genótipo 7 (Composto Barreto) ao grupo anterior integrado pelos genótipos 11 (Iguatemi 1) e 12 (Composto Aelton). A fusão se justifica porque os três apresentam Zélia em comum.

A fusão dos genótipos 5 (Iguatemi 2) e 10 (Composto Fracaro) com 11 (Iguatemi 1), 12 (Composto Aelton) e 7 (Composto Barreto) se justifica pela presença de Zélia na genealogia de todos esses genótipos.

O composto Matheus originou-se do cruzamento de oito populações de grãos brancos (PR 038, PR 079, RR 046, SC 016, PR 017, Angela, SC 002 e PR 009). Com exceção de Ângela, todos esses materiais são gerações avançadas de híbridos americanos. A incorporação do genótipo 8 (Composto Matheus) ao grupo integrado pelos genótipos 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro), 11 (Iguatemi 1), 12 (Composto Aelton) e 7 (Composto Barreto) ocorreu tardiamente, possivelmente porque nenhum dos parentais do Composto Matheus coincide com a genealogia dos demais membros do grupo. Aliás, a falta de coincidência entre os parentais do Composto Matheus e a genealogia dos demais integrantes da fusão seguinte (4 (Composto V1), 6 (Composto V2) e 20 (Viçosa) com 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro), 11 (Iguatemi I), 12 (Composto Aelton), 7 (Composto Barreto) e o próprio 8 (Composto Matheus)) não permite uma plena justificação desse *cluster*.

O desconhecimento de maiores detalhes sobre a genealogia de CMS 42 dificulta a justificativa para a formação de seu grupo com UNB-2.

O *cluster* envolvendo os genótipos 24 (UEM – M2) e 25 (IAC-125) não é respaldado pela genealogia de ambos, pois, teoricamente, IAC 125 deveria estar agrupada com IAC 112 e com IAC 112 F2, mesmo porque a genealogia de UEM M2 é desconhecida. Da mesma forma, o desconhecimento da genealogia de Laranjeiras do Sul dificulta a interpretação de sua incorporação ao grupo anterior formado por UEM – M2 e IAC-125.

O agrupamento de 3 (Zélia) e 9 (P1 sintético) não se justifica, pois Zélia deveria estar no mesmo *cluster* que 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro), 11 (Iguatemi 1), 12 (Composto Aelton) e 7 (Composto Barreto), já que todas estas cinco variedades apresentam Zélia em sua genealogia. Por outro lado, a união de 3 (Zélia) e 9 (P1 sintético) com 1 (Jade) se justifica genealogicamente porque Jade e Zélia são híbridos triplos desenvolvidos pela mesma empresa, tendo possivelmente linhagens em comum na sua constituição. Na verdade, pareceria mais plausível se o *cluster* fosse formado por Zélia e Jade, para uma posterior inserção da P1 sintético.

O grupo formado por 14 (IAC 112) e 15 (IAC-112 F2) é obviamente justificado porque IAC-112 F2 é a própria geração F₂ deste mesmo híbrido.

A incorporação dos genótipos 14 (IAC 112) e 15 (IAC-112 F2) aos demais (4 (Composto V1), 6 (Composto V2), 20 (Viçosa), 5 (Iguatemi 2), 10 (Composto Fracaro), 11 (Iguatemi I), 12 (Composto Aelton), 7 (Composto Barreto), 8 (Composto Matheus), 17 (UNB-2), 21 (CMS-42), 24 (UEM – M2), 25 (IAC-125), 23 (Laranjeiras do Sul), 3 (Zélia), 9 (P1 sintético), 1 (Jade), 2 (Angela) e 22 (SE-013)) tem a sua justificativa prejudicada pela premissa de que os genótipos IAC 112 e IAC-112 F2 deveriam estar mais próximos a IAC-125.

A relação entre as variedades 16 (Argentina) e 19 (Chile) não pode ser avaliada com precisão, exceto pela via molecular, na medida em que a genealogia de ambas é desconhecida. Já o *cluster* entre os genótipos 13 (PR-023) e 18 (PA-091) pode ser justificado porque ambos são populações de polinização livre derivadas de híbridos americanos, mostrando-se bem afastadas dos demais grupos.

A observação geral da correspondência entre os agrupamentos revelados pelo dendrograma UPGMA e a genealogia das variedades em estudo permitiu concluir que grande parte dos *clusters* indicados pela análise molecular agrupou materiais de mesma origem parental.

4.7. Agrupamentos e utilização do germoplasma

Neste trabalho, a utilização de marcadores moleculares se destinou à obtenção de inferências sobre o potencial heterótico interpopulacional, na medida em que os materiais que apresentam maiores valores de distância genética entre si (e reciprocamente, os menores valores de similaridade) podem ser aproveitados em programas de seleção recorrente recíproca destinados à síntese de linhagens contrastantes que, inter cruzadas, possam gerar híbridos superiores.

A análise global dos resultados indicou que poucos genótipos constituem a base genética da maioria das variedades avaliadas, com predominância de Zélia, IAC-112, Angela e CMS-42. O acréscimo de parentais alternativos que se uniram aos supramencionados constituiu, freqüentemente, outra causa das distâncias observadas.

As variedades 13 (PR-023), 16 (Argentina), 18 (PA-091) e 19 (Chile) mostraram-se geneticamente diferenciadas das demais. Parte deste isolamento pode ser proveniente da presença de bandas exclusivas em pelo menos duas dessas variedades. Exemplificando, a variedade 13 (PR-023) apresentou dois alelos detectados pelo *primer umc1363* que não foram observados em nenhum outro genótipo. Analogamente, a variedade 18 (PA-091) apresentou um alelo exclusivo para o *primer umc 1077*.

A consistência dos resultados envolvendo as variedades divergentes (13 (PR-023), 16 (Argentina), 18 (PA-091) e 19 (Chile)) permite supor que a realização de cruzamentos interpopulacionais entre elas e os demais genótipos avaliados constitua uma alternativa promissora para a obtenção de heterozigose como estratégia voltada à exploração da heterose.

5. CONCLUSÕES

- a. A extração do DNA genômico amostrado em *bulks* populacionais seguida pela amplificação com *primers* microssatélites permitiu a identificação de diferenças genéticas entre as variedades avaliadas de milho-pipoca.
- b. O dendrograma produzido pelo método UPGMA se ajustou melhor à matriz das distâncias entre variedades do que os dendrogramas derivados dos demais métodos hierárquicos aglomerativos.
- c. O número de grupos indicado pelo método UPGMA foi superior ao obtido sob a metodologia de Tocher, evidenciando vantagens práticas do método das médias de distâncias na discriminação das variedades.
- d. Apesar de algumas discrepâncias, grande parte dos *clusters* indicados pela análise molecular agrupou materiais da mesma origem parental.
- e. As variedades Argentina, Chile, PA-091 e PR-023 manifestaram grande dissimilaridade genética em relação às demais.
- f. A realização de cruzamentos das variedades PR-023, Argentina, PA-091 e Chile com os demais genótipos avaliados pode ser uma alternativa promissora para a obtenção de heterozigose, supondo uma estratégia voltada à seleção e exploração de heterose.
- g. Considerando que a maior distância (0,60 para PR-23 x Chile) superou em aproximadamente seis vezes a menor distância (0,11 para Composto V1 e Composto V2), foi observada uma amplitude bastante apreciável da variabilidade entre os materiais, em função da dissimilaridade entre os genótipos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, E.D.; GREECH, R.G. Popcorn. In: SPRAGUE, G. F. **Corn and corn improvement**. New York: Academic Press, 1977. p. 385-386.
- BECKMANN, M.Z.; LUZ, F.J.F.; PIVETTA, K.F.L. Marcador fAFLP na identificação da diversidade genética de mini-roseiras. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 6:139-143, 2006.
- BORDALLO, P.N.; PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; GABRIEL, A.P.C. Análise dialéctica de génotipos de milho doce e comum para caracteres agronômicos e proteína total. **Horticultura Brasileira**, 23: 123-127, 2005.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. 525p.
- BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. 301p.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2006. 585p.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa: UFV, 2006a. 175p.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística versão Windows**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: UFV, 2006b. 382p.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa: UFV. 2006c. 285p.
- CRUZ, C. D.; VIANA, J.M.S. A methodology of genetic divergence analysis based on sample unit projection on two-dimensional space. **Genetics and Molecular Biology**, 17:69-73, 1994.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-475.

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

DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: SYMPOSIUM ANALYSIS OF MOLECULAR DATA. Corvallis, 1994. **Crop Science Society of America**. Corvallis: American Society for Horticultural Sciences, 1994. p.3-7.

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

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

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

FREITAS, P.D. **Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares**: manual prático marcadores microssatélites. São Carlos. 2005. 25p.

GANGA, R.M.D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E.G.M.; GRILI, G.V.G.; GONSALVES, M.M; CHAGAS, E.D.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, 26:494-498, 2004.

GOWER, J.C. Some distant properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, 53:325-338, 1966.

- GRANATE, M.J.; CRUZ, C.D.; PACHECO, C.A.P. Predição do ganho genético com diferentes índices de seleção no milho pipoca CMS-43. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:1001-1008, 2002.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p.865-895.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1981. 468 p.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p. 1994.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, 44: 223-270, 1994.
- KARASAWA, M.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.P.; SILVA, M.P.; RIVA, E.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da divergência genética entre acessos de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, 23:1000-1005, 2005.
- KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, 29:1-27, 1964.
- KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M.J.; COULMAN, B.E.; FORTIN, M.G. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. **Euphytica**, 89:355-361, 1996.
- 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.

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

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

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

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.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the States of America**, 70: 3321- 3323, 1973.

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

ORNELLA, L.; SCHLATTER, A.R.; VON HANIEL-NIETHAMMER, F.; MANIFESTO, M.M.; EYHERABIDE, G.; SUÁREZ, E.Y.; ACEVEDO, A. **Empleo de marcadores moleculares de ADN para identificar genótipos de maíz (*Zea mays* L.)**. disponível em: http://www.redbio.org/porta1/encuentros/enc_2001/ Acesso em: 08 Fevereiro, 2008.

PACHECO, C.A.P.; GAMA, E.E.G.E; GUIMARÃES, P.E.O.; SANTOS, M.X.; FERREIRA, A.S. Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e

CMS-43 de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33:1995-2001, 1998.

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

PARENTONI, S.N.; MAGALHÃES, J.V.; PACHECO, C.A.P.; SANTOS, M.X.; ABADIE, T.; GAMA, E.E.G.; GUIMARÃES, P.E.O.; MEIRELLES, W.F.; LOPES, M.A.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Heterotic groups based on yield-specific combining ability data and phylogenetic relationship determined by RAPD markers for 28 tropical maize open pollinated varieties. **Euphytica**, 121:197–208, 2001.

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

PINHEIRO, J.B.; ZUCCHI, M.I.; TELES, F.L.; ÁZARA, N.A. Diversidade genética molecular em acessos de açafrão utilizando marcadores RAPD. **Acta Scientiarum-Agronomy**, 25:195-199, 2003.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: EDUEM, 1995. 275p.

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

PRIANDA, R.L.; SOUZA, A.P. **Diversidade genética entre linhagens de milho tropical**: estudo com base em marcadores moleculares. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003. 103p. Tese (Mestrado em Genética Vegetal e Melhoramento).

RINALDI, D.A.; PÍPOLO, V.C.; GRAGE, A.C.; RUAS, C.F.; JUNIOR, N.S.F.; SOUZA, A.; SOUZA, S.G.H.; GARBUGLIO, D.D. Correlação entre heterose e

divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, 66:183-192, 2007.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: Measures of genetic similarity and genetic distance. In: **Studies in genetics**. Austin: University of Texas, 1972. p.145-153.

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

ROMESBURG, H.C. **Cluster analysis for researchers**. California: Lifetime Learning, 1984. 334p.

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

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

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17:915-919, 1994.

SAVASAKI, E.; MORAES, J.L.F.; LAGO, A.A. Influência do tamanho e umidade do grão na expansão da pipoca south american mushroom. **Bragantia**, 45:363-370, 1986.

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

SAWAZAKI, E. Tecnologia para produção de milho pipoca. **Boletim Técnico Fertilizantes**, não paginado, 2001b.

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

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

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

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.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W.R. Freeman, 1973. 573p.

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

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

VENDRUSCOLO, E.C.G.; SCAPIM, C. A.; PACHECO, C.A.P.; OLIVEIRA, V. R.; BRACCINI, A.L.; VIDIGAL, M.C.G. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho-pipoca na região centro-sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:123-130, 2001.

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

VILARINHO, A.A. **Densidade e espaçamento como fatores de produtividade na cultura do milho.** Disponível em: <http://www.cpafrf.embrapa.br/index.php/cpafrf/artigos/densidade_e_espa_amento_como_fatores_de_produtividade_na_cultura_do_milho> Acesso em: 23 Dezembro, 2007.

YAO, Q.; YANG, K.; PAN, G.; RONG, T. Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data. **Journal of Genetics and Genomics**, 34:851-860, 2007.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)