

AUSILEIDE ALVES LEAL

**POTENCIAL DO RAPD E DE MICROSSATÉLITES PARA ESTIMAR
DISTÂNCIAS GENÉTICAS EM MILHO PIPOCA (*Zea mays L.*)**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AUSILEIDE ALVES LEAL

**POTENCIAL DO RAPD E DE MICROSSATÉLITES PARA ESTIMAR
DISTÂNCIAS GENÉTICAS EM MILHO PIPOCA (*Zea mays L.*)**

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

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
DEZEMBRO – 2008

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

AGRADECIMENTO

A Deus pela vida.

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

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

À coordenação e aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar este curso.

Aos colegas de curso pela convivência e aprendizado.

A Ivone Batista de Oliveira Eloi e Viviane Cordovez da Cunha pela valorosa contribuição para a realização dos experimentos

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

Ao meu pai José “Bruno” que tão cedo partiu e a minha mãe Maria Augusta pelo amor e presença constantes.

Ao meu esposo Brás Henrique pelo amor e companheirismo e aos nossos filhos Gabriela e Henrique por iluminarem nossas vidas.

Aos familiares pelo amor e carinho a mim dedicados, em especial a minha irmã Ausilene, ao cunhado Gilberto e a sobrinha Lara.

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

BIOGRAFIA

Ausileide Alves Leal, filha de José Alves Leal e Maria Augusta de Souza Leal, nasceu em Tupã, São Paulo, aos dez dias do mês de dezembro de 1967. Em 1989, concluiu a graduação em Ciências Biológicas, com Licenciatura Plena em Biologia, pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Adamantina, São Paulo. Em 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, no Curso de Mestrado, orientada pela professora Dra. Claudete Aparecida Mangolin. Atua como professora na Rede de Educação Pública Estadual, em Maringá.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Milho pipoca	04
2.1.1. Histórico	04
2.1.2. Características da planta e do grão	05
2.2. Melhoramento genético do milho pipoca	06
2.3. Heterose e diversidade genética	09
2.4. Marcadores moleculares	11
2.4.1. Marcadores RAPD	14
2.4.2. Marcadores SSR (Seqüências Simples Repetidas) ou microsatélites ..	16
2.4.3. Associação entre diferentes marcadores moleculares	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Material genético e experimentos de campo	23
3.2. Extração do DNA	24
3.3. Quantificação do DNA	26
3.4. Amplificação do DNA com <i>primers</i> para RAPD	26
3.4.1. Padronização das reações de amplificação com <i>primers</i> de RAPD	26
3.4.2. Seleção de <i>primers</i>	26
3.4.3. Amplificação do DNA	27
3.5. Amplificação do DNA com <i>primers</i> para microsatélites ou SSR	27
3.5.1. Seleção de <i>primers</i>	27
3.5.2. Amplificação do DNA	28
3.6. Análise dos dados obtidos	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

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

A proposta do presente trabalho foi utilizar os marcadores moleculares RAPD e *loci SSRs*, para estimar e caracterizar a divergência genética entre 10 linhagens endogâmicas S₇ de milho pipoca, e avaliar a consistência das informações obtidas com o emprego destes dois marcadores. O aproveitamento de *primers* para RAPD foi de 10,84%. Com os nove *primers* selecionados foram produzidos 126 fragmentos amplificados; destes 22 foram monomórficos e 104 foram polimórficos conferindo um polimorfismo de 82,54% para as 10 linhagens avaliadas. Dentre os 51 pares de *primers* de microssatélites testados, 14 foram selecionados conferindo um aproveitamento de 27,4%. O polimorfismo para as 10 linhagens, avaliado com os 14 *primers* de microssatélites foi de 52,76%. O número de alelos por *locus* de microssatélites para as 10 linhagens de milho pipoca variou de dois a cinco, com um total de 47 alelos para todos os primers usados. O número médio de alelos por *locus* foi 3,36. O polimorfismo de DNA detectado para estas linhagens de milho pipoca analisadas no presente estudo pode ser considerado alto, uma vez que usando os 9 *primers* para amplificar seqüências aleatórias, a proporção de seqüências polimórficas foi igual a 82,54%, e usando os 14 *primers* para *loci SSR* foi possível estimar um valor de heterozigidade média esperada igual a 52,76%, um déficit de heterozigotos igual a apenas 4,5%, e uma diferenciação entre as linhagens de 73,49%. O valor de correlação de Pearson foi de 0,5453 demonstrando que a associação entre os marcadores é positiva. Os dendrogramas construídos com os agrupamentos dos genótipos avaliados em função das distâncias genéticas, estimadas a partir da análise dos *loci SSR* e das seqüências de RAPD, mostraram agrupamentos similares formando dois grandes grupos para os genótipos P1 e P9. Desta forma, apesar das indicações de que os microssatélites correspondem a marcadores moleculares mais informativos do que as análises de RAPD, as análises das 10 linhagens de milho pipoca no presente estudo, indicaram que ambas as técnicas

podem fornecer informações consistentes e no mesmo sentido para estudar a diversidade genética em milho pipoca, apresentando valores de diversidade e de distâncias genéticas concordantes.

Palavras chave: Pipoca, *Zea mays* L., Marcadores moleculares

ABSTRACT

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

Molecular markers RAPD and *SSRs loci* have been employed to estimate and characterize the genetic divergence between 10 S_7 endogamic popcorn strains and evaluate the consistency of information from the above-mentioned markers. Primers efficiency for RAPD reached 10.84%. One hundred and twenty-six amplified primers were produced from the nine selected primers. Since 22 and 104 were respectively monomorphic and polymorphic, an 82.54% polymorphism was established for the 10 strains evaluated. Whereas 14 out of 51 primer pairs of tested microsatellites have been selected and established a 27.4% efficiency, polymorphism for the 10 strains evaluated with 14 primers of microsatellites amounted to 52.76%. Number of alleles per microsatellite *locus* for the 10 popcorn strains ranged between 2 and 5, totaling 47 alleles for all primers used. Mean number of alleles per *locus* was 3.36. DNA polymorphism detected for analyzed popcorn strains may be high since the proportion of polymorphic sequences was 82.54% when the 9 primers to amplify randomized sequences were used. Rate of expected mean heterozygosity was 52.76% when the 14 primers of *SSR loci* were employed. This fact revealed a heterozygote deficit of a mere 4.5%, coupled to a 73.49% differentiation between strains. Since Pearson's correlation rate was 0.5453, association among markers was positive. Dendrograms made up of genotype groupings evaluation according to genetic distances and estimated from *SSR loci* analysis and RAPD sequences showed similar groupings which formed two great groups for genotypes P1 and P9. In spite of the fact that there are indications that microsatellites correspond to molecular markers which are more informative than RAPD analyses, current analyses of 10 popcorn strains indicate that both techniques may provide consistent and unequivocal information for the study of genetic diversity in popcorn, coupled to an agreement in diversity rates and genetic distances.

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

1. INTRODUÇÃO

O valor comercial para o grão de milho pipoca é dado de acordo com sua capacidade de expansão (CE), que reflete sua qualidade, como maciez e textura da pipoca. De acordo com Alexander e Greech (1977), a capacidade de expansão é definida pela razão entre o volume dos grãos antes de serem submetidos ao calor e o volume de pipoca, após o “pipocamento”, ou ainda, pela relação entre o volume de pipoca e o peso dos grãos. Para o melhoramento genético do milho pipoca, os programas de melhoramento têm proposto duas alternativas que podem ser conduzidas de forma conjunta: a obtenção de populações melhoradas e a obtenção de híbridos. No primeiro caso, a utilização adequada de métodos de seleção possibilita o aumento gradativo da frequência dos alelos favoráveis na população melhorada, sendo esta superior à original. No segundo caso, a estratégia de melhoramento visa à obtenção de linhagens endogâmicas que, quando em combinações adequadas, produzirão híbridos superiores em relação às populações de origem dessas linhagens (Paterniani e Miranda Filho, 1978; Vilarinho et al., 2003).

Todos os métodos de melhoramento aplicáveis ao milho comum podem ser utilizados também para o milho pipoca; podem ser utilizados métodos intra e interpopulacionais, bem como os métodos de obtenção de híbridos. As informações sobre a relação genética entre os materiais destinados aos programas de melhoramento são importantes, pois a partir destas informações a escolha dos parentais para os cruzamentos destes programas será realizada de forma orientada e eficiente. Isto é especialmente importante para os programas de cruzamento para produção de milho híbrido, onde o reconhecimento e a exploração do padrão heterótico é fundamental para explorar a heterose. Reif et al. (2003) e Oliveira et al. (2004) predizem que o cruzamento entre linhagens geneticamente divergentes e pertencentes a grupos heteróticos diferentes produz híbridos melhores do que quando o cruzamento é realizado entre linhagens intimamente relacionadas. Desta forma, o sucesso dos programas de produção de

híbridos está associado com o conhecimento destes grupos. Quando os grupos heteróticos em uma coleção de linhagens não estão bem definidos ou estabelecidos, grupos de linhagens geneticamente similares podem ser cruzadas originando uma descendência uniforme e similar aos parentais, frustrando assim, a expectativa de obtenção de híbridos melhores.

A identificação de linhagens geneticamente similares pode ser baseada no uso de marcadores moleculares, estes podem ser usados para estimar a distância genética entre elas. Melchinger (1999) considera que neste caso, a exploração máxima da heterose poderá ocorrer através de produções e avaliações de cruzamentos dialélicos entre os genótipos de cada grupo. Em particular os polimorfismos baseados nos segmentos de DNA têm sido considerados como ferramentas poderosas, usadas para avaliar a similaridade genética entre os estoques de linhagens (Lee, 1995). Desta forma, para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, a medida da distância genética entre as linhagens tem sido avaliada através de marcadores moleculares.

Vários marcadores moleculares, que podem ser empregados para caracterizar linhagens em nível de DNA, têm sido utilizados para predizer o vigor do híbrido. Com um número adequado de marcadores, é possível organizar uma clara estrutura de grupos heteróticos, e as linhagens de origem desconhecida podem ser designadas para estabelecer novos grupos heteróticos (George et al., 2004). Demeke et al. (1997) sugerem que o uso combinado de diferentes marcadores tais como o polimorfismo de fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição (RFLP; *Restriction Fragment Length Polymorphism*), o polimorfismo de segmentos de DNA amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*; reações em cadeia usando polimerases) com *primers* aleatórios (RAPD; *Random Amplified Polymorphism DNA*), o polimorfismo de fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição e amplificados por PCR (AFLP; *Amplified Fragment Length Polymorphism*), e a análise de polimorfismos em *locus* de DNA formados por seqüências simples repetidas (*locus SSR*; *Simple Sequence Repeated*) também denominados de *locus* microssatélites, podem fornecer informações mais seguras sobre a diversidade genética, do que quando um só tipo de marcador é utilizado. A expectativa é de que alguns erros ou problemas apresentados por um marcador podem ser sobrepostos pelo uso de outros marcadores. Os tipos diferentes de marcadores moleculares hoje disponíveis

diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto ao potencial para detectar diferenças entre indivíduos, quanto ao custo, facilidade de uso, consistência, e repetibilidade dos resultados (Schulman, 2007). Assim a proposta do presente trabalho foi utilizar dois tipos de marcadores moleculares, RAPD e análise de *loci SSRs*, para estimar e caracterizar a divergência genética entre 10 linhagens de milho pipoca, e avaliar de forma comparativa a consistência das informações obtidas com o emprego destes dois marcadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Milho pipoca

2.1.1. Histórico

O milho pipoca é uma monocotiledônea, pertencente à Família Gramineae (Poaceae), tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie botânica *Zea mays* L. ($2n=20$) (Zinsly e Machado 1987). Sua origem exata é desconhecida, confunde-se com a origem dos demais tipos de milho. Acredita-se que muito antes da chegada do explorador Cristovão Colombo no continente Americano, os índios comiam pipoca. Zinsly e Machado (1987) registraram em seu artigo que a prática de aquecer e estourar o milho era mais comum entre as tribos da América do Sul e Central, do que entre as tribos da América do Norte.

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

A origem genética do milho pipoca também é objeto de hipóteses. Erwin (1949) considera que este milho é originário de uma mutação do milho de endosperma duro (*flint*). Por outro lado, Ziegler e Ashman (1994) acham muito improvável tal origem, devido às evidências arqueológicas e ao caráter poligênico da “pipocabilidade” (potencial do grão para estourar quando aquecido).

De fato, o que se sabe é que o milho pipoca teve importante papel no desenvolvimento pré-histórico do milho no continente. Os achados arqueológicos de 2.500 a.C. encontrados no Novo México e sudoeste dos Estados Unidos da

América, relatados por Zinsly e Machado (1987), são daquele que seria o milho mais primitivo, e este era do tipo pipoca.

2.1.2. Características da planta e do grão

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

A principal característica que diferencia o milho pipoca dos demais milhos é o tipo de grão, que neste é duro e pequeno, com pericarpo mais espesso e que, quando aquecido com cerca de 180°C, estoura transformando-se em pipoca. Esta capacidade que o milho pipoca tem de “estourar” é explicada pela resistência do pericarpo, associada à presença no grão, de óleo e umidade (Zinsly e Machado, 1987); quando aquecido, o óleo e a umidade exercem pressão sobre o pericarpo, até que este se rompa, expondo assim o endosperma.

Existe uma grande variabilidade no formato, tamanho e cor dos grãos de milho pipoca, sendo os tipos de maior aceitação comercial, aqueles com os grãos redondos, tipo pérola e com endosperma amarelo a laranja (Zinsly e Machado, 1987). Em termos comerciais, o valor do grão de milho pipoca é dado de acordo com sua capacidade de expansão (CE), que reflete sua qualidade, como maciez e textura da pipoca. A capacidade de expansão é definida pela razão entre o volume dos grãos antes de serem submetidos ao calor e o volume de pipoca, após o “pipocamento”, ou também, pela relação entre o volume de pipoca e o peso dos grãos (Alexander e Greech, 1977). O equipamento padrão de avaliação da capacidade de expansão é o pipocador da Cretors, que utiliza como amostra 250 gramas de grãos. Segundo Green e Harris (1960), os genótipos com CE menor que 25 mL.g⁻¹ são considerados pobres. Se a CE está entre 25 e 30 mL.g⁻¹ ela é considerada como regular. Valores entre 30 e 35 mL.g⁻¹ são considerados como bons, e populações de milho pipoca com CE acima de 35 mL.g⁻¹ são classificadas como excelentes.

Dentre os fatores que afetam o “pipocamento” encontram-se a temperatura, teor de umidade (Alexander, 1988; Macedo, 2003), tamanho do grão

(Sawazaki, 1996) além da presença ou não de danos mecânicos e idade fisiológica dos grãos (Jugenheimer, 1976).

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

Os resultados da genética quantitativa clássica e análise estatística tradicional têm mostrado que a característica de “pipocamento”, muito importante para os consumidores, é herdada quantitativamente, controlada por muitos genes (Zeigler, 2001; Li, 2007), e além disso, é influenciada por efeitos ambientais (Li, 2007) e pelos métodos de “pipocamento” (Dofing et al., 1991; Li, 2007). O efeito individual de cada loco quantitativo pode ser determinado através do uso de marcadores moleculares, e para isso é necessário que se disponha de um mapa molecular saturado, para assim determinar quanto de um caráter quantitativo é explicado por um ou mais marcadores (Ramalho et al., 2004).

2.2. Melhoramento genético do milho pipoca

Em relação ao milho pipoca, existem algumas dificuldades adicionais no trabalho de melhoramento quando comparado com o milho comum, pois, ao agricultor interessa produtividade elevada e os demais atributos de boa população de milho normal; ao consumidor, interessa alta capacidade de expansão, que confere a pipoca melhor textura e maciez (Scapim et al., 2002). Como a produtividade de grãos está inversamente correlacionada com a capacidade de expansão (Sawazaki, 1995; Coimbra et al., 2001; Miranda, 2003), isto dificulta o ganho de seleção simultâneo quanto às duas características no melhoramento

populacional (Miranda, 2003). Ao melhorista cabe, então, a tarefa de romper essa correlação negativa, oferecendo um produto intermediário que satisfaça tanto produtores como consumidores (Zinsly e Machado, 1987).

O melhoramento genético do milho pipoca possui duas alternativas que podem ser conduzidas de forma conjunta: a obtenção de populações melhoradas e a obtenção de híbridos. No primeiro caso, a utilização adequada de métodos de seleção possibilita o aumento gradativo da frequência dos alelos favoráveis na população melhorada, sendo esta superior à original. No segundo caso, a estratégia de melhoramento visa a obtenção de linhagens endogâmicas que, quando em combinações adequadas, produzirão híbridos superiores em relação às populações de origem dessas linhagens (Paterniani e Miranda Filho, 1978; Vilarinho, 2003).

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

No primeiro Ensaio Nacional de Milho Pipoca, conduzido no ano agrícola 1991/92, a capacidade de expansão (CE) média foi de $17,5 \text{ mLmL}^{-1}$ e a média do melhor cultivar foi de $20,8 \text{ mLmL}^{-1}$ (Andrade, 1995). Na década de 40, a CE de híbridos e variedades comerciais nos Estados Unidos variava de 23,2 a $32,7 \text{ mLg}^{-1}$.

O melhoramento do milho pipoca no Brasil ainda tem sido considerado muito incipiente, porque são poucas as variedades e híbridos nacionais melhorados geneticamente, com alta produtividade e qualidade (Vilarinho et al., 2003). Por outro lado, o mercado nacional vem passando por várias mudanças, principalmente no que diz respeito ao sistema de parceria entre produtores e empacotadoras e a importação de produto. Até o início do ano agrícola 2003/2004, o consumo nacional de milho pipoca estava em torno de 80 mil toneladas, sendo que 75% deste mercado correspondia ao milho pipoca americano, importado principalmente da Argentina (Scapim et al., 2006). Na safra

2004/2005, segundo informações das empacotadoras, houve uma inversão no panorama nacional; com a entrada do híbrido simples modificado IAC-112 a importação brasileira foi de 20 mil toneladas (Scapim et al., 2006).

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

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

O acesso e o uso da diversidade genética têm sido apresentados como a base para efetuar os cruzamentos nos programas de melhoramento genético. Em milho um diverso conjunto de genes permite a manipulação de diferentes genótipos que tem conduzido à produção de híbridos melhorados tanto para produção, resistência a doenças e outras características de interesse agrônomico. Muitos programas de melhoramento em milho são baseados no desenvolvimento e seleção de linhagens com o objetivo de produzir híbridos superiores. O mecanismo de desenvolvimento e seleção de linhagens para *performance per se* é fácil, mas consome tempo. Também não é possível prever a *performance* do híbrido a partir da *performance* parental, isto por causa do alto efeito de dominância para algumas características de interesse, por exemplo, para a produção de grãos (Shieh e Thseng, 2002).

Para aumentar a eficiência dos programas de cruzamentos, é importante determinar a distância genética entre os parentais e isto pode ser feito através do uso de marcadores moleculares. Este procedimento tem sido usado como uma importante ferramenta para prever o vigor do híbrido a partir de cruzamentos simples (Shieh e Thseng, 2002). Em particular os polimorfismos baseados nos

segmentos de DNA são poderosas ferramentas usadas para avaliar a similaridade genética entre os estoques de linhagens (Lee, 1995).

2.3. Heterose e diversidade genética

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

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

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

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

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

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

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

Como a divergência genética pode estar associada à heterose, as análises de divergência genética podem ser úteis para a predição preliminar de cruzamentos que otimizem a heterose (Miranda, 2003). A forma mais recentemente utilizada e mais eficiente para predizer o desempenho de seus híbridos é a formação de grupos heteróticos, e estes grupos são formados com o auxílio de marcadores moleculares; estes marcadores moleculares são fragmentos cromossômicos que podem ser utilizados para detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos (Borém, 2001). Desta forma, o reconhecimento de um genótipo, ou o cálculo da similaridade genética entre os indivíduos, pode ser realizado de diferentes maneiras, podendo ser baseado em análises de genealogia, análise de caracteres morfológicos, e nas últimas décadas pode ser baseado em marcadores moleculares em nível de DNA (Kumar, 1999).

2.4. Marcadores moleculares

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

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

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

Os vários marcadores baseados em reações em cadeia de ampliações de segmentos de DNA usando enzimas polimerases, denominada de PCR

(*Polymerase Chain Reaction* tem sido introduzidos com sucesso para realizar um *fingerprinting* do genoma de plantas (Welsh e McClelland, 1990; Kesseli et al., 1994; Romero-Severson et al., 2001), e para estudar a diversidade genética (Moeller e Schaal, 1999; Carvalho et al., 2004; Menkir et al., 2004), Entre eles, o polimorfismo de seqüências de DNA amplificadas com *primers* aleatórios, denominados marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), tem sido descrito como uma metodologia sensível e eficiente para detectar variação genética (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990); estes marcadores são de fácil utilização e os resultados obtidos são fáceis de serem analisados.. Os marcadores de RAPD tem sido destacados pelo potencial destes para avaliar regiões de DNA que aparentemente evoluem mais rapidamente do que alguns marcadores bioquímicos tais como as isozimas (Brauner et al., 1992; Baruffi et al., 1995). Além disso, um grande conjunto de informações pode ser obtido de forma rápida e sem grandes custos. Por outro lado, o RAPD tem sido severamente criticado, pois a origem do polimorfismo não é compreendida, a homologia de bandas em reconstruções filogenéticas não pode ser suposta (Rieseberg 1996), e em muitos casos o padrão de bandas não é confiável e nem reproduzível (Jones et al., 1997; Perez et al., 1998). Apesar destas críticas, muitos pesquisadores tem demonstrado que este marcador pode gerar informações consistentes quando comparados com resultados obtidos com outras técnicas, particularmente em análises dentro da espécie (Lerceteau et al., 1997; Clerc et al., 1998). Segundo alguns autores (Munthall et al., 1992), o uso do mesmo conjunto de condições, otimização específica para uma cultivar ou espécie poderia produzir homologia para o padrão de amplificação. Penner et al. (1993) descreveram que a reprodutibilidade de resultados obtidos com RAPD pode ser obtida entre laboratórios. Estes autores descrevem que esta reprodutibilidade ocorre em função do emprego do mesmo conjunto de condições e parâmetros, otimizados especificamente para uma cultivar ou espécie, desta maneira o mesmo padrão de amplificação é produzido. Desta forma, superar as limitações de RAPD, e tornar este um marcador que produz resultados mais confiáveis, envolve a padronização dos parâmetros de reação, desenvolvimento de *primers* para o marcador SCAR, selecionar os *primers* mais adequados e utilizar vários *primers* contando para a análise somente os fragmentos reproduzíveis (Demeke et al., 1997). Kjolner et al. (2004) concluíram que apesar da análise com AFLP ser superior ao RAPD quanto

à eficiência, este último pode ser utilizado como um marcador confiável em pequenos laboratórios que possuem pouca estrutura tecnológica.

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

Outro tipo de marcador baseado em reações em cadeia de ampliações de segmentos de DNA usando enzimas polimerases (PCR) foi denominado de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*); este é um marcador multi-*loci* e foi desenvolvido por Vos et al. (1995). Os marcadores AFLP são fragmentos genômicos produzidos por enzimas de restrição e detectados após uma amplificação seletiva que produz um bom número de marcas (fragmentos amplificados). Este marcador é interessante, pois pode ser utilizado para realizar um *fingerprinting* em genomas de diferentes complexidades, incluindo o genoma de milho (Vos et al., 1995). O AFLP tem sido empregado para identificar seqüências de DNA ligada a *loci* de resistência à doenças (Becker et al., 1995; Cervera et al., 1996), para *fingerprinting* de DNA (Vos et al., 1995; Sharma et al., 1996; Laborda et al., 2005; Oliveira et al., 2004) e para estimar a relação entre polimorfismo molecular e a performance de híbridos de milho (Ajmone-Marsan et al., 1998).

Demeke et al. (1997) sugerem que o uso combinado de diferentes marcadores tais como: RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites podem fornecer melhores informações do que quando um só tipo de marcador é utilizado, uma vez que alguns dos problemas apresentados por um marcador podem ser superados pelo uso de outros marcadores.

2.4.1. Marcadores RAPD

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

A partir do desenvolvimento da técnica RAPD na década de 90, esta vem sendo amplamente utilizada para estudar genética de populações, pois os produtos de DNA amplificados cobrem tanto regiões codificadoras como não codificadoras do genoma. Kazan et al. (1993); Liu et al. (1994); Rus-Kortekaas et al. (1994); Thormann et al. (1994); Albo-Elmafa e Shimada, (1995); Brummer et al. (1995) e Sun et al. (1997) usaram RAPD, tanto para examinar variações intraespecíficas como interespecíficas para várias espécies de plantas. Stojisin et al. (1996) também usaram RAPD com o objetivo de fazer a caracterização de milho híbridos. Este marcador tem sido particularmente bastante utilizado, pois gera um grande conjunto de dados de forma rápida e com menor trabalho do que o envolvido para outros marcadores. Outra vantagem para o uso de RAPD é que nenhuma informação prévia do genoma é necessária (Fischer et al., 2000; Klinbunga et al., 2000).

A detecção dos produtos de amplificação na técnica RAPD é feita, geralmente, em géis de agarose, separados por eletroforese, e corados com brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Caixeta et al., 2006). Uma vez amplificado, o DNA pode ser usado em uma variedade de procedimentos analíticos. A técnica RAPD é simples, e apresenta uma série de vantagens em relação às demais, tais como rapidez operacional, por não requerer isolamento de uma sonda específica e nenhuma informação prévia sobre seqüências de nucleotídeos, além de custo relativamente

baixo e de permitir um número ilimitado de marcadores, devido à ocorrência de um número maior de anelamentos (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Binneck, et al., 2002). O primeiro passo para a utilização desta técnica é a seleção dos *primers* a serem utilizados, que deve basear-se na seguinte ordem: revelar diferenças, produzir bandas bem definidas e favorecer um padrão reproduzível (Loxdale et al., 1996; Demeke et al., 1997).

Verifica-se o polimorfismo para as seqüências de DNA amplificadas na técnica RAPD, quando não ocorre pareamento do *primer* com uma região homóloga do genoma, ou quando este pareamento é dificultado; em conseqüência disso não há amplificação desta região e, o resultado é a não formação de bandas; ou também, quando ocorre alteração do comprimento da região a ser amplificada (por duplicação, inserção ou eliminação de nucleotídeos), resultando no aparecimento de bandas com número de pares de bases diferentes (Milach, 1998). Nesse contexto, o polimorfismo é evidenciado em razão da presença ou ausência de bandas após a amplificação e separação por eletroforese em gel.

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes, portanto, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Enquanto o genótipo homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel, os genótipos homozigoto dominante (AA) e heterozigoto (Aa) são colocados juntos na mesma classe fenotípica, isto é, como a presença da banda no gel (Williams, et al., 1990; Carlson et al., 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1996; Milach, 1998).

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

2.4.2. Marcadores SSR (Seqüências Simples Repetidas) ou microssatélites

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

Segundo Shagai-Marroof et al. (1994) os microssatélites são marcadores moleculares muito usuais, pois eles são: 1) abundantes; 2) uniformemente distribuídos; 3) altamente polimórficos; 4) co-dominantes; 5) proporciona rápida obtenção de resultados por PCR; 6) são relativamente simples para interpretar, e 7) é um marcador facilmente acessado por outros laboratórios, pois as seqüências de *primers* estão disponíveis na literatura especializada. Gupta et al. (1996) descreveram que o marcador microssatélite é uma técnica baseada na amplificação das seqüências repetidas. As seqüências de DNA que flanqueiam a região variável dos *loci SSRs* são conservadas e são utilizadas para sintetizar pares de *primers* (Schlötterer, 2000). Esse par de *primers* é utilizado para a amplificação dos *loci SSR*. O polimorfismo é detectado quando existe diferença no produto amplificado. Esta diferença é resultante de produtos de amplificação (seqüências de bases) com variação no comprimento (Weber e May, 1989; Litt e Luty, 1989). Após a amplificação através da PCR, os produtos da amplificação de *loci SSR* podem ser separados através de eletroforese em géis de agarose de alta resolução. Para a detecção de pequenas diferenças nos produtos de amplificação utiliza-se preferencialmente gel de poliacrilamida corado com prata. Os resultados também podem ser analisados por autoradiografias quando os produtos dos *loci SSR* são marcados com isótopos radioativos. A amplificação de diferentes *loci SSR* pode ser realizada através de PCR *multiplex*. Este tipo de avaliação é

possível graças ao uso de corantes fluorescentes específicos para cada par de *primer* usado na amplificação dos diferentes *loci SSRs* (Gupta et al., 1996). Cada fragmento produzido através da amplificação, separado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (Kun-Sheng e Tanksley, 1993), ou em gel de agarose de alta resolução (Becker e Heun, 1995), representa um alelo do *locus* (Gupta et al., 1996).

A hipervariabilidade de microssatélites não é totalmente entendida, podendo ser decorrente de *crossing-over* desigual, ou devido a deslizamento de seqüências durante a replicação do DNA. Durante a replicação do DNA, a seqüência de nucleotídios nova pareia-se com a seqüência de nucleotídios molde. Se o pareamento for feito com uma repetição errada na seqüência original, a DNA polimerase pode adicionar ou deletar uma ou mais cópias da repetição na nova seqüência de DNA, em um processo conhecido como *slippage* (Tautz et al., 1986). Estes eventos podem resultar em variação do número de cópias da unidade básica de repetição (Schlötterer e Tautz, 1992). Evolutivamente o DNA microssatélite é muito importante como marcador em razão de sua taxa de mutação que tem sido considerada como altíssima. A suposição de alguns autores é a seguinte: é 10.000 vezes mais provável um microssatélite ganhar ou perder uma repetição de uma geração para a próxima, do que o gene para hemoglobina sofrer mutação em uma única base, promovendo a desordem denominada anemia falciforme, por exemplo. Além disso, um microssatélite pode retornar ao seu estado de comprimento original dentro de poucas gerações (Moxon e Wills, 1999).

O extensivo uso de microssatélites para estudos de variação genética ocorre em função da sua abundância, hipervariabilidade no comprimento de seus alelos, distribuição casual nos diversos genomas e à pequena quantidade de DNA que é usada para a amplificação e subsequente análise (Kun-Sheng e Tanksley, 1993). Os microssatélites ocorrem freqüentemente e casualmente (ou aleatoriamente) em todo o DNA de eucarionte examinado (Beckmann e Soller, 1990), representando uma vasta fonte de marcadores altamente informativos (Zhao e Kochert, 1992; 1993). Trata-se de um marcador co-dominante apresentando segregação mendeliana simples e graças à sua hipervariabilidade, ele é um importante marcador para o mapeamento genético de espécies com

pouco polimorfismo intraespecífico, como é o caso da maioria das espécies autóгамas (Röder et al., 1995).

A maior limitação do método de análise dos *loci* SSR é a obtenção dos *primers* específicos que flanqueiam as repetições. Para a obtenção destes *primers* há a necessidade da construção de bibliotecas genômicas e do seqüenciamento de DNA em larga escala, um investimento inicial que é alto e requer infra-estrutura especializada de laboratório (Chin et al., 1996). No entanto, uma vez obtidos os *primers* informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica. Os marcadores microssatélites são apresentados, portanto, como ferramenta eficiente na identificação e diferenciação de indivíduos.

2.4.3. Associação entre diferentes marcadores moleculares

Desde que Demeke et al. (1997) sugeriram que o uso combinado de diferentes marcadores moleculares tais como: RFLP, RAPD, AFLP e microssatélites podem fornecer melhores informações do que quando um só tipo de marcador é utilizado, na literatura especializada são encontrados cerca de duas dezenas de trabalhos que exploram a combinação e/ou comparação destes marcadores. Hahn et al. (1995); Smith et al. (1997); Ajmone Marsan et al. (1998); Pejic et al. (1998) compararam os diferentes marcadores para estudar a diversidade genética em milho, e relatam que esta comparação permite avaliar a eficiência relativa das diferentes técnicas disponíveis.

Sun et al. (2001) compararam o polimorfismo obtido para 28 híbridos de milho Canadense; a comparação foi realizada utilizando os marcadores RAPD e microssatélites. Com esta comparação estes autores obtiveram diferenças entre os dois marcadores; o maior nível de diversidade foi obtido para microssatélites em relação ao RAPD, e estes autores atribuíram as diferenças obtidas, em função das diferenças genéticas entre os híbridos avaliados e escolhidos e/ou em função das regiões do genoma do milho que foram acessadas por estes dois marcadores. RAPD são marcadores dominantes e microssatélites marcadores co-dominantes. Sun et al. (2001) registraram que os dados obtidos com microssatélites vêm aumentando consideravelmente a cada dia, e estes indicaram também que o nível de polimorfismo obtido com este marcador é maior do que o obtido com RFLP.

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

Os materiais biológicos também diferem entre si; segundo Garcia et al. (2004) as populações de milho tropical e temperado diferem geneticamente umas das outras, pois populações tropicais geralmente foram originadas de compostos com mais alta variabilidade genética. Estes autores relataram que para formar grupos heteróticos bem definidos é importante o uso de marcadores moleculares. A diversidade e a distância genética entre as linhagens de milho tropical foram avaliadas, e os referidos autores descreveram que os marcadores que apresentaram maior número de fragmentos polimórficos foram AFLP e RFLP. A correlação genética calculada para as avaliações realizadas com estes dois marcadores foi alta. Os autores justificam esta alta correlação pelo fato dos dois marcadores apresentarem princípios técnicos similares, ambos avaliam sítios de restrição do genoma.

Garcia et al. (2004) indicaram também em seus estudos que todos os marcadores utilizados, menos o RAPD, foram consistentes para estudar a diversidade em populações de milho tropical e produziram estimativas das distâncias genéticas com boa correlação. Estes autores indicam que RFLP parece ser o marcador mais “robusto” (eficiente) em termos de quantidade de polimorfismo avaliado, apesar de na prática ele ser uma técnica muito trabalhosa. Também foi descrito neste trabalho que os marcadores SSRs foram promissores em termos de polimorfismo e conteúdo de informações revelada, mas que este marcador pode apresentar alguns custos iniciais adicionais associado com o desenvolvimento de *primers*. Estes autores sugerem que AFLP é a melhor escolha para avaliar a diversidade, e estimar a relação genética entre linhagens de milho tropical com alta fidelidade. Segundo estes autores o sistema AFLP apresenta bom nível de precisão para estimativas de distância genética e predição de cruzamentos. Os resultados obtidos com AFLP foram altamente

correlacionados com os resultados obtidos com RFLP, sendo que o primeiro é um sistema mais rápido e que não requer prévio conhecimento de seqüências de DNA. Russell et al. (1997); Pejic et al. (1998) e Garcia et al. (2004) descreveram que AFLP pode ser aplicado para qualquer espécie de planta, sem que haja prévio conhecimento da seqüência de DNA, e tem sido assumido que este marcador é eficiente, produzindo um grande número de bandas em cada ensaio.

Em função das características dos marcadores AFLP e SSR, muitos estudos foram realizados com estes marcadores para estimar a diversidade genética em várias espécies tais como: cana-de-açúcar (Lima et al., 2002), trigo (Plaschke et al., 1995; Manifesto et al., 2001), algodão (Liu et al., 2000; Abdalla et al., 2001); soja (Priolli et al., 2002) e sorgo (Smith et al., 2000; Ghebru et al., 2002). Segundo Laborda et al. (2005), AFLP e SSR são técnicas muito reproduzíveis, e os resultados obtidos por estes dois marcadores são na maioria das vezes correlacionados, mesmo que estes marcadores apresentem diferentes aspectos genéticos que afetam sua utilidade para análise. Em um só gel de AFLP estes autores detectaram 98 bandas com uma taxa de 89% de polimorfismo. Em contraste com a eficiência dos ensaios empregando AFLP, os ensaios com SSR detectam um só *locus* por vez no gel, entretanto possui o potencial para detectar múltiplos alelos em um só *locus*. Segundo Laborda et al. (2005) esta característica torna SSR mais apropriado para muitos estudos de diversidade.

Laborda et al. (2005) testaram 109 *loci* de microssatélites e destes somente 37 foram aproveitados, caracterizando um baixo aproveitamento. Estes autores justificam este baixo aproveitamento em função dos *primers* terem sido desenvolvidos para linhagens de milho temperado e terem sido usados para estudar linhagens tropicais. Ainda foi descrito por estes autores que para microssatélites existe uma pequena diferença entre os alelos, muitas vezes necessitando separá-los em géis de poliacrilamida ao invés de em géis de agarose.

Henderson e Petes (1992) discutiram que o valor de PIC para microssatélite muitas vezes pode ser baixo. Segundo estes autores o valor de PIC revela não somente a presença dos muitos alelos, mas também as suas freqüências. Valor baixo para PIC pode retratar a presença de alelos raros, isto é aqueles que estão em baixa freqüência. Segundo Sênior et al. (1998) a presença de alelos raros para microssatélites pode ser explicada em função da alta taxa de

mutação descrita para este marcador, ou mesmo pela introdução de germoplasma exótico.

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

Laborda et al. (2005) descreveram que SSR é o marcador mais usual para a análise da variabilidade genética, pois com ele é possível detectar pequenas diferenças. Devido aos eventos de *slippage* e *crossing-over* desigual, que levam a formação de múltiplos alelos, cada linhagem pode ser agrupada em diferentes categorias. Este alto nível de polimorfismo obtido por este marcador, torna-o inapropriado para estabelecer a relação de *pedigree* entre cultivares. Mas ele é apropriado para estudar a real variabilidade genética entre genótipos e distingui-los com o propósito de cruzamentos.

Segundo Laborda et al. (2005), os marcadores como AFLP que obtém menor polimorfismo, são mais apropriados para análises de *pedigree*. Estes autores relatam que todos os tipos de marcadores são capazes de revelar a diversidade genética, mas em função das diferentes formas que estes marcadores estimam esta diversidade, alguns marcadores podem subestimar a divergência genética exibida pelos genótipos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético e experimentos de campo

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 10 linhagens endogâmicas S₇ de milho pipoca. Estas linhagens foram utilizadas para estudar a diversidade genética e comparar a eficiência dos marcadores RAPD e microssatélite. As linhagens *Yellow Pearl popcorns* I e II são derivadas de um composto americano. As linhagens Zélia I e II foram obtidas a partir do híbrido triplo da *Pioneer*. A linhagem Curagua é originária de população Curagua do Chile. As linhagens IAC112 I e II foram obtidas a partir do híbrido triplo modificado IAC 112. As linhagens Avati Pichinga I e II são linhagens obtidas da população Pichinga do Paraguai. A linhagem Pisankalla foi originada de uma população Colombiana (Quadro 01). Estas linhagens foram desenvolvidas na fazenda-escola da Universidade Estadual de Maringá, sob responsabilidade do Professor Dr. Carlos Alberto Scapim. Todas estas linhagens pertencem ao Programa de Melhoramento de Milho Pipoca do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

Quadro 01. Linhagens de milho pipoca avaliadas com RAPD e SSR e suas respectivas origens

Linhagens		Origem das Linhagens
P1-1	Yellow Pear Popcorn I	Derivada de um composto Americano
P1-2	Zélia I	Derivada do híbrido triplo da Pioneer
P1-3	Curagua	Derivada da população Curagua do Chile
P1-4	Zélia II	Derivada do híbrido triplo da Pioneer
P1-5	<i>Yellow Pear Popcorn</i> II	Derivado de um composto Americano

Quadro 01, Cont.

Linhagens		Origem das Linhagens
P9-1	<i>IAC 112 I</i>	Derivada do híbrido triplo modificado IAC 112
P9-2	<i>IAC 112 II</i>	Derivada do híbrido triplo modificado IAC 112
P9-3	<i>Avati Pichinga I</i>	Derivada da população Pichinga do Paraguai
P9-4	<i>Pisankalla</i>	Derivada de uma população Colombiana
P9-5	<i>Avati Pichinga II</i>	Derivada da população Pichinga do Paraguai

Aproximadamente 15 sementes de cada linhagem foram germinadas em pequenos balaios plásticos contendo solo, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais (UEM, Maringá-PR), para produzirem as folhas que foram utilizadas como amostras para a extração de DNA.

3.2. Extração do DNA

Para a extração de DNA das amostras de folhas das plântulas de milho pipoca foi utilizada a metodologia descrita por Hoisington et al. (1994) com pequenas modificações. Cerca de 300 mg de folhas jovens coletadas após 10 a 15 dias do plantio, de 10 plantas de cada linhagem de milho pipoca, totalizando 100 amostras, foram pulverizadas separadamente com nitrogênio líquido. O tecido vegetal foi colocado em microtubos para centrifuga (com capacidade para 2 mL) e sobre ele foi adicionado 800 µL de tampão de extração contendo CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5; NaCl 5M pH 8,0; CTAB 1% e 140mM de β-mercaptoetanol) previamente preparado. Os microtubos foram bem agitados por inversão e incubados em banho-maria a 65°C durante 1 hora, agitando suavemente a cada 5 minutos. Após o banho-maria, esperou-se aproximadamente 5 minutos para que as amostras alcançassem a temperatura ambiente e foi adicionado 800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico, preparado na proporção 24:1. O conteúdo dos microtubos foi misturado com suaves inversões durante 5 minutos.

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

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

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

Após este período, as amostras foram centrifugadas com 12.000 r.p.m por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado, e agitado por inversão durante 2 minutos. As amostras foram centrifugadas com 12.000 r.p.m por 5

minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco e ressuspendido em 100 µL de TE. As amostras foram estocadas em 4°C.

3.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído foi feita por análise em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Acetato de Sódio, EDTA, pH 8,0 - Hoisington et al., 1994) usando soluções de DNA padrão (Fago λ) de concentrações gradativas e conhecidas (50, 100, 150 ng). O gel foi corado em solução de brometo de etídio contendo 0,5 µg/mL e a imagem foi capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Com base na quantificação do DNA das amostras, foram selecionadas de 5 a 7 plantas de cada uma das 10 linhagens para análise através de RAPD e microssatélites.

3.4. Amplificação do DNA com *primers* para RAPD

3.4.1. Padronização das reações de amplificação com *primers* de RAPD

Para a obtenção de fragmentos de DNA amplificados utilizando os *primers* de RAPD, foram selecionados aleatoriamente dois indivíduos das linhagens P1 e P9 (totalizando seis amostras) para padronizar as concentrações de DNA a serem utilizadas na amplificação das reações de RAPD; foram testadas as concentrações de: 10, 15, 20, 25 e 30 ng. Para as amplificações também foi padronizada a concentração de MgCl₂; para esta condição foram testadas as concentrações de: 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mmol/L.

3.4.2 Seleção de *primers*

A seleção de *primers* foi realizada com a amplificação de duas amostras de DNAs de cada uma das linhagens P1 e P9. Para a seleção foram utilizados os *primers* para RAPD desenvolvidos pela Operon Technologies Inc - Alameda, CA, USA; para os testes foram utilizados os Kits A (1 a 20), Kit B (1 a 20), Kit C (1 a 20), Kit F (5, 9, 13), Kit I (5), Kit L (11), Kit M (1 a 10) e Kit P (2, 4, 7 a 11 e 17, totalizando 83 *primers* avaliados.

Destes 83 *primers* avaliados, nove amplificaram com padrão de bandas bem definidas e foram escolhidos para amplificar as 50 amostras de DNAs de indivíduos de milho pipoca para as linhagens P1-1, P1-2, P1-3, P1-4, P1-5 e para as linhagens P9-1, P9-2, P9-3, P9-4 e P9-5. Os *primers* selecionados foram: OPA03, OPA12, OPB07, OPB17, OPC05, OPC11, OPF05, OPL11 e OPM02.

3.4.3 Amplificação do DNA

Para o estudo da diversidade utilizando *primers* para RAPD foram amplificados DNAs de cinco indivíduos por linhagens. As reações de amplificação para os ensaios de RAPD foram feitas em um termociclador Techne TC-512, conforme o protocolo original descrito por Williams et al. (1990) com pequenas modificações. As reações foram padronizadas para um volume final de 20 μ L contendo 0,3 μ mol/L de *primers* (Operon Technologies Inc, - Alameda, CA, USA), 1 unidade de Taq-DNA polimerase (Invitrogen), 2,0 μ L de tampão de reação 10X (Invitrogen), 0,1 mmol/L de cada dNTP, 2,5 mmol/L de MgCl₂, 15 ng de DNA genômico e água mili-Q autoclavada q.s.p.

A desnaturação do DNA foi feita a 96°C por 5 min. Esta etapa foi seguida por 45 ciclos de amplificação (94°C por 1 min.; 35°C por 1 min.; 72°C por 2 min.). Após os 45 ciclos foi realizada uma extensão final de 7 min em 72°C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 1,7% preparada com tampão TBE 0,5X (44,5 mmol/L Tris, 44,5 mmol/L ácido bórico e 1 mmol/L EDTA). O marcador de peso molecular utilizado nos géis foi o DNA *Ladder 1Kb* (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e fotografados sobre luz ultravioleta.

3.5. Amplificação do DNA com *primers* para microssatélites ou SSR

3.5.1 Seleção de *primers*

Para a análise com microssatélites, inicialmente foi extraído o DNA de 10 plantas de cada linhagem de milho pipoca, resultando em um total de 100 amostras de plantas. Para as reações de amplificação com *primers* de SSR, foram

selecionados de 5 a 7 DNAs extraídos de cada linhagem. Para a escolha dos marcadores polimórficos, foram testados 51 *primers* de SSR. Todas as seqüências destes microssatélites foram obtidas a partir do *site* <http://www.maizegdb.org/ssr.php>. Para a padronização das condições de reação e escolha dos *primers* foram testados: 25, 30 e 50 ng de DNA de duas amostras. As amostras utilizadas para a seleção dos microssatélites foram tomadas de forma casual. Tanto para a seleção dos 51 pares *primers*, como para o estudo da diversidade genética, a amplificação do DNA foi realizada utilizando o programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991); este programa é bastante interessante para o anelamento dos *primers* de microssatélites (Quadro 02). O produto da amplificação foi separado e analisado em gel de agarose MS8 para verificar a complementaridade, reprodutibilidade e presença de polimorfismo para cada *primer* avaliado. Dos 51 pares de *primers* testados para as linhagens P1-1, P1-2, P1-3, P1-4, P1-5, P9-1, P9-2, P9-3, P9-4, P9-5, 27,4% foram polimórficos, e 72,6% monomórficos. Para investigar a variabilidade genética para estas 10 linhagens de milho pipoca 14 *primers* polimórficos foram selecionados.

3.5.2 Amplificação do DNA

As amostras de DNA dessas plantas foram submetidas à amplificação em termociclador (Techne TC-512), utilizando o programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991) (Quadro 02). Para cada reação, o volume total da mistura foi de 20 µL. A reação foi preparada com 25ng de DNA genômico, 2,0 µL de tampão de reação 10x (10 mM tris-HCl, pH 8.8), 2,0 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 1 unidade de taq-DNA polimerase (Invitrogen), 0,2 µM de *primer* F e R específico e água mili-Q autoclavada qsp até completar o volume de 20 µL.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% (50% agarose comum e 50% agarose MS-8), diluída e tamponada em TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM Ácido Bórico e 1 mM EDTA). Para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen). Os géis foram submetidos a um campo elétrico de 60 Volts por aproximadamente 5 horas. Após esse período, os géis foram corados com uma solução de Brometo de Etídio contendo 0,5 µg/mL.

Quadro 02. Seqüência do programa utilizado para amplificação do DNA de Milho pipoca

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

Os padrões de bandas obtidos foram visualizados e capturados com *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290 utilizando o programa Kodak 1D 3.5.

3.6. Análise dos dados obtidos

Para a análise de RAPD os géis foram lidos para a presença e ausência de bandas, criando-se uma matriz binária. Para calcular a distância genética entre as 19 linhagens das populações (P1 e P9) foi usado o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard para isso foi usado o software GENES versão 4.1 (Cruz, 2006).

Para o marcador codominante microssatélite a distância genética foi calculada utilizando a distância modificada de Rogers (Goodman e Stuber, 1983). A distância genética foi baseada na freqüência de alelos para cada *locus*, esta

análise considera a quantidade de diversidade genética e expressa a quantidade de diversidade presente em cada *locus* ou alelo, o cálculo foi realizado utilizando o software GENES versão 4.1 (Cruz, 2006).

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para a distância genética entre as distâncias genéticas para as diferentes linhagens de milho pipoca, tanto para quando o marcador RAPD e microssatélite foram utilizados. Intervalos de confiança Bootstrap (95% de probabilidade) do coeficiente de Pearson foram estimados a partir de 1000 reamostragens utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, 1995).

A representação simplificada das distâncias genéticas entre as linhagens foi obtida pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*) e representadas por meio de dendograma.

A confiabilidade dos agrupamentos foi verificada pela análise *Bootstrap* com 400 reamostragens, segundo descrito por Felsenstein (1985), utilizando o software GENES. Foram considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram P maior ou igual a 90%, sendo P a frequência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *Bootstrap*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação visual em gel de agarose 0,8% da intensidade das bandas de DNA das amostras das 10 linhagens de milho pipoca, com as amostras de DNA do fago λ de concentração conhecida, mostrou que a quantidade de DNA extraído variou de 10 a 60 ng/ μ L (Figura 01).

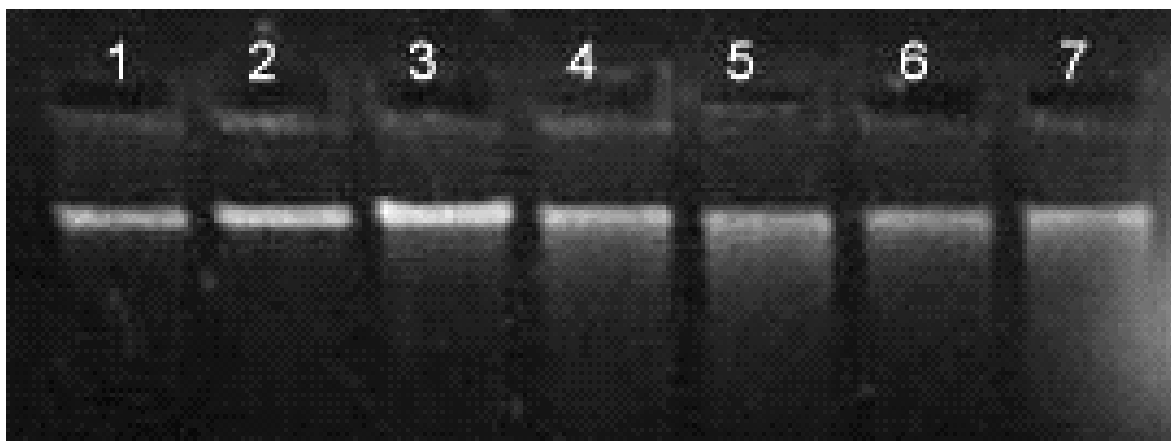


Figura 01. Gel de agarose 0,8%, utilizado para a quantificação de DNA. Amostras 1, 2 e 3 são DNAs de Fago λ de 50, 100, 150 ng. Amostras 4, 5, 6 e 7 são DNAs extraídos de plantas de linhagens de milho-pipoca.

Para a padronização das condições de amplificação utilizando os *primer* de RAPD, foram testadas as concentrações de DNA e de $MgCl_2$; para isso foi utilizado o *primer* OPA-04, pois este apresentou boa amplificação em testes anteriores. A melhor concentração de DNA testada foi a de 15 ng, e a concentração de 2,5 mmol/L de $MgCl_2$ foi a que apresentou bandas mais definidas no gel de resolução após as amplificações (Figura 02).

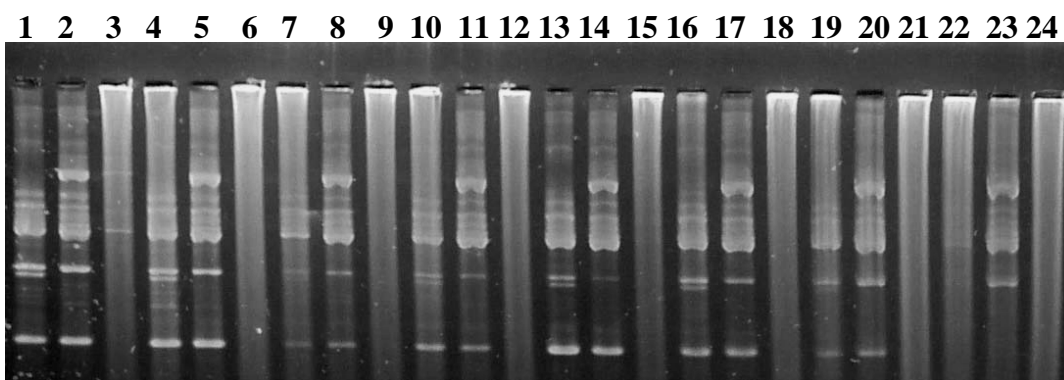


Figura 02. As amostras de 1 a 24 foram amplificadas com o *primer* OPA-04. De 1 a 12 são ampliações para os testes de concentração de DNA. Os testes foram repetidos com 1 indivíduo de cada uma das 3 populações (1, 2, 3 – 10 ng; 4, 5 e 6 – 15 ng; 7, 8 e 9 – 20 ng e 10, 11 e 12 – 25 ng). As amostras de 13 a 24 foram amplificadas com diferentes concentrações de MgCl₂ (13, 14 e 15 – 2,0 mmol/L; 16, 17 e 18 – 2,5 mmol/L; 19, 20 e 21 – 3,0 mmol/L e 22, 23 e 24 – 3,5 mmol/L).

Esta padronização é necessária para que reprodutibilidade seja obtida com o emprego deste marcador. Demeke et al. (1997) descrevem e discutem a padronização de uma série de parâmetros experimentais que são necessários para melhorar os resultados obtidos com RAPD. Uma vez que as melhores condições de amplificação para RAPD foram estabelecidas, estas foram utilizadas para as reações de seleção dos *primers* e para as posteriores ampliações do DNA das amostras das 10 linhagens.

Para a seleção de *primers* foram amplificadas seis amostras de DNAs com 83 *primers*. Destes 83 *primers* avaliados, nove amplificaram com padrão de bandas bem definidas e foram escolhidos para amplificar as 50 amostras de DNAs de plantas de milho pipoca das linhagens P1-1, P1-2, P1-3, P1-4, P1-5 e das linhagens P9-1, P9-2, P9-3, P9-4 e P9-5. Os *primers* selecionados foram: OPA-03, OPA-12, OPB-07, OPB-17, OPC-05, OPC-11, OPF-05, OPL-11 e OPM-02. O aproveitamento de *primers* para RAPD neste trabalho foi de 10,84%. Os *primers* selecionados foram aqueles que produziram bandas bem definidas e reproduzíveis no gel, e que apresentaram polimorfismo. A Figura 03 ilustra as seqüências de DNA amplificadas com o *primer* OPM-02 de amostras das linhagens Zélia I (P1-2), Avati Pichinga I (P9-3), Pisankalla (P9-4) e Avati Pichinga II (P9-5), por exemplo; a figura representa parte do gel de agarose usado para amplificar simultaneamente as 50 amostras das 10 linhagens.

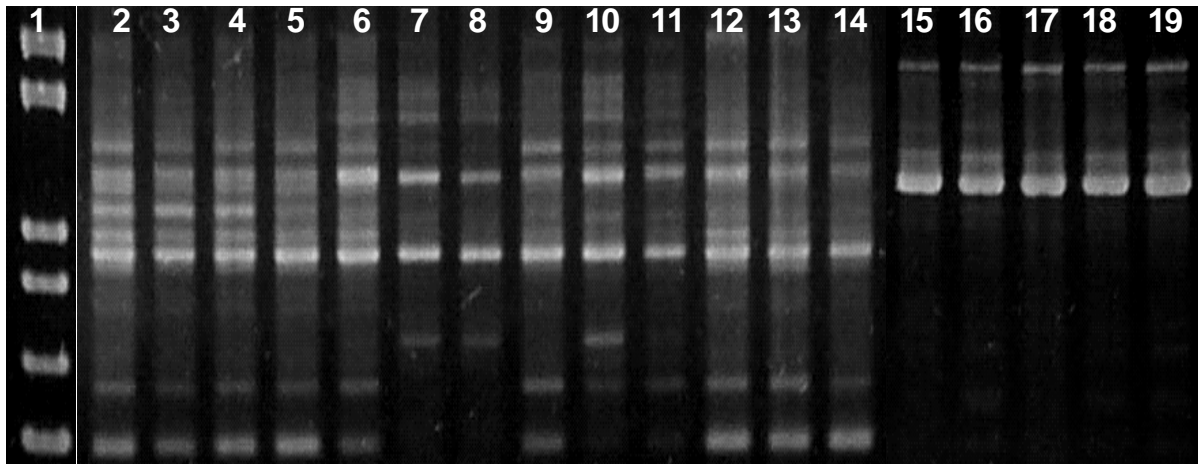


Figura 03. Gel de agarose 1,7% utilizado para separar os fragmentos de DNA de diferentes linhagens de milho pipoca amplificados com o *primer* OPM-02. As amostras de 2 a 6 pertencem a linhagem Zélia I (P1-2), as amostras de 7 a 11 pertencem a linhagem Avati Pichinga I (P9-3), as amostras de 12 a 14 pertencem a linhagem Pisankalla (P9-4) e as amostras de 15 a 19 pertencem a linhagem Avati Pichinga II (P9-5). A amostra 1 corresponde ao marcador 1 Kb DNA *ladder* (Invitrogen).

A amplificação do DNA das 50 amostras das linhagens *Yellow Pearl* I (P1-1), Zélia I (P1-2), Curagua (P1-3), Zélia II (P1-4), *Yellow Pearl* II (P1-5) e das linhagens IAC-112I (P9-1), IAC-112II (P9-2), Avati Pichinga I (P9-3), Pisankalla (P9-4) e Avati Pichinga II (P9-5), com os nove *primers* selecionados resultou na produção de 126 fragmentos amplificados; destes 22 foram monomórficos e 104 foram polimórficos conferindo um polimorfismo de 82,54% para as 10 linhagens avaliadas (Quadro 03). O *primer* que revelou menor polimorfismo foi o OPC-05, com 11 bandas das quais sete foram polimórficas (63,64 %). O *primer* OPM-02 produziu 16 bandas e foi o que apresentou maior quantidade de bandas polimórficas (93,75%) (Quadro 03).

Para a amplificação com *primers* para microssatélites, foi adotada uma concentração de 25 ng de DNA/20 μ L de reação, pois o perfil de bandas gerado foi o mesmo de quando foi usado de 25 a 50 ng de DNA, sugerindo que a concentração de DNA nesta faixa não interfere na amplificação de DNA de milho pipoca. Para seleção dos *primers* que foram utilizados para estudar a diversidade genética foram testados 51 pares de *primers*; para este teste foi utilizado o programa *Touchdown* PCR (Don et al., 1991). Este programa é considerado como adequado para o anelamento dos *primers* de microssatélites. Para a seleção dos *primers* foram utilizadas duas amostras de DNA das linhagens; estas foram

escolhidas ao acaso. O resultado para verificar a complementaridade, reprodutibilidade e presença de polimorfismo dos mesmos foi analisado em gel de agarose MS8.

Quadro 03. Número e frequência dos fragmentos monomórficos e polimórficos, obtidos para cada *primer* utilizado para amplificar o DNA das diferentes linhagens de milho pipoca

<i>PRIMERS</i>	Número total de fragmentos	Número de fragmentos monomórficos	(%)	Número de fragmentos polimórficos	(%)
OPA-03	16	02	12.50	14	87.50
OPA-12	16	04	25.00	12	75.00
OPB-07	15	01	06.67	14	93.33
OPB-17	19	03	15.79	16	84.21
OPC-05	11	04	36.36	07	63.64
OPC-11	10	02	20.00	08	80.00
OPF-05	12	04	33.33	08	66.67
OPL-11	11	01	09.09	10	90.91
OPM-02	16	01	06.25	15	93.75
Total	126	22	17.46	104	82.54

Dentre os 51 pares de *primers* testados, 14 foram selecionados conferindo um aproveitamento de 27,4%, pois estes foram polimórficos (Quadro 04). Estes 14 *primers* foram utilizados para investigar a variabilidade genética para as 10 linhagens de milho pipoca. A posição destes *primers* no genoma, os motivos, o número de repetições por motivos e os respectivos número de alelos amplificados estão apresentados no Quadro 04. O polimorfismo para as 10 linhagens, avaliado com os 14 *primers* de microssatélites foi de 52,76%; este polimorfismo foi avaliado utilizando o programa Popgen 32, e refere-se a heterosigozidade média esperada.

Todas as 50 amostras das 10 linhagens foram avaliadas usando os nove *primers* de RAPD e os 14 *primers* para microssatélites, e com o resultado desta avaliação foi calculado o polimorfismo e as distâncias genéticas entre as linhagens.

De acordo com a amplificação dos *loci* SSR, o número de alelos por *locus* de microssatélites para as 10 linhagens de milho pipoca variou de dois a cinco, com um total de 47 alelos para todos os *primers* usados. O maior número de alelos foi verificado nos *loci* *Umc1653* e *Umc2281*, contendo cinco alelos e para

os loci *Umc2227*, *Umc1636*, e *Umc2262*, foram encontrados quatro alelos (Quadro 04). O número médio de alelos por locus foi 3,36.

Quadro 04. Seqüências dos *primers* de microssatélite usados na estimação da diversidade genética nas 10 linhagens de milho pipoca, número de alelos detectados por cada *primer* e localização destes nos cromossomos

Locus	Seqüência de Nucleotídeos	Número de Alelos	Cromossomo
<i>Umc1071</i>	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT (Reverse)	3	1
<i>Umc1071</i>	GTGGTTGTCGAGTTCGTCGTATT (Forward)		
<i>Umc1336</i>	CTCTGTTTTGGAAGAAGCTTTTTGG (Reverse)	2	10
<i>Umc1336</i>	GTACAAATGATAAGCAAGGGGCAG (Forward)		
<i>Umc1422</i>	CTCATCGCGATCTCCCAGTC (Reverse)	3	2
<i>Umc1422</i>	GAGATAAGCTTCGCCCTGTACCTC (Forward)		
<i>Umc1636</i>	GTAAGTGGTACAGGTCGTCGCTCTT (Reverse)	4	9
<i>Umc1636</i>	CATATCAGTCGTTTCGTCAGCTAA (Forward)		
<i>Umc1653</i>	GCCGCCACGTACATCTATC (Reverse)	5	6
<i>Umc1653</i>	GAGACATGGCAGACTCACTGACA (Forward)		
<i>Umc2227</i>	AGCTGAGCCTTCTCTTCTGGCT (Reverse)	4	1
<i>Umc2227</i>	ACCTTGAGCGTGGAGTCGGT (Forward)		
<i>Umc2245</i>	CGTCGTCTTCGACATGACTTCAC (Reverse)	3	2
<i>Umc2245</i>	GCCCTGTTATTGGAACAGTTTACG (Forward)		
<i>Umc2262</i>	CGTTCCTGGTACCCTGTCTATAA (Reverse)	4	3
<i>Umc2262</i>	TCTGTTCCGGGATTCTTCTCAGTC (Forward)		
<i>Umc2280</i>	AAAAGAAGACGCTTTGTTTGTTC (Reverse)	3	4
<i>Umc2280</i>	TTTTCGTCAACTTGATGTTTATGAGAGT (Forward)		
<i>Umc2281</i>	ATGATGATCTGCAGAGCCTAGTCC (Reverse)	5	4
<i>Umc2281</i>	CAATGATTGGAGCCTAACCCT (Forward)		
<i>Umc2292</i>	ACTTCCGGCATGTCTTGTGTTT (Reverse)	3	5
<i>Umc2292</i>	AGCAGAAGAGGACAAACCAGATTC (Forward)		
<i>Umc2293</i>	ATGTTCCGTTTATTATTTGCCCG (Reverse)	3	5
<i>Umc2293</i>	AAAGAACAGACGCGATCCAATC (Forward)		
<i>Umc2343</i>	GACTGACAACCTCAGATTTACCCA (Reverse)	3	9
<i>Umc2343</i>	TCATCTTCCCCACAAATTTTCATT (Forward)		
<i>Umc2350</i>	CGAATCGAGGATGGTTTGTTC (Reverse)	2	10
<i>Umc2350</i>	AGTAGCGACTCCTCTGCGTGAG (Forward)		
Total		47	

Nas Figuras 03 e 04, é possível observar diferentes alelos para os loci estudados. Os valores para os coeficientes de fixação F de Wright (Wright, 1965) estimados a partir da análise das freqüências dos alelos nos loci SSR indicaram que o déficit de heterozigotos nas 10 linhagens corresponde a somente 4,5% (F_{IS}

= 0,045), e que a diferenciação entre as 10 linhagens considerando a variação nas frequências dos diferentes alelos corresponde a 73,49% ($F_{ST} = 0,7349$). Todos estes parâmetros também são indicativos da divergência genética alta presente nas 10 linhagens de milho pipoca. Desta forma, o polimorfismo de DNA detectado para estas linhagens de milho pipoca analisadas no presente estudo pode ser considerado como alto, uma vez que usando os 9 *primers* para amplificar seqüências aleatórias, a proporção de seqüências polimórficas foi igual a 82,54%, e usando os 14 *primers* para *loci* SSR foi possível estimar um valor de heterozigosidade média esperada igual a 52,76%, um déficit de heterozigotos igual a 4,5%, e uma diferenciação entre as linhagens de 73,49%.

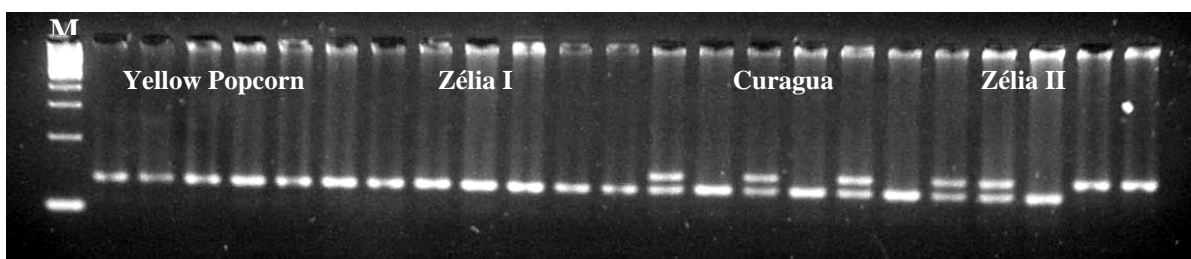


Figura 03. Amplificação do DNA genômico de milho pipoca das linhagens Yellow Popcorn (P1-1), Zélia I (P1-2), Curagua (P1-3) e Zélia II (P1-4) utilizando o microssatélite UMC2292. M é o marcador *Laeder* 100 pb (Invitrogen).

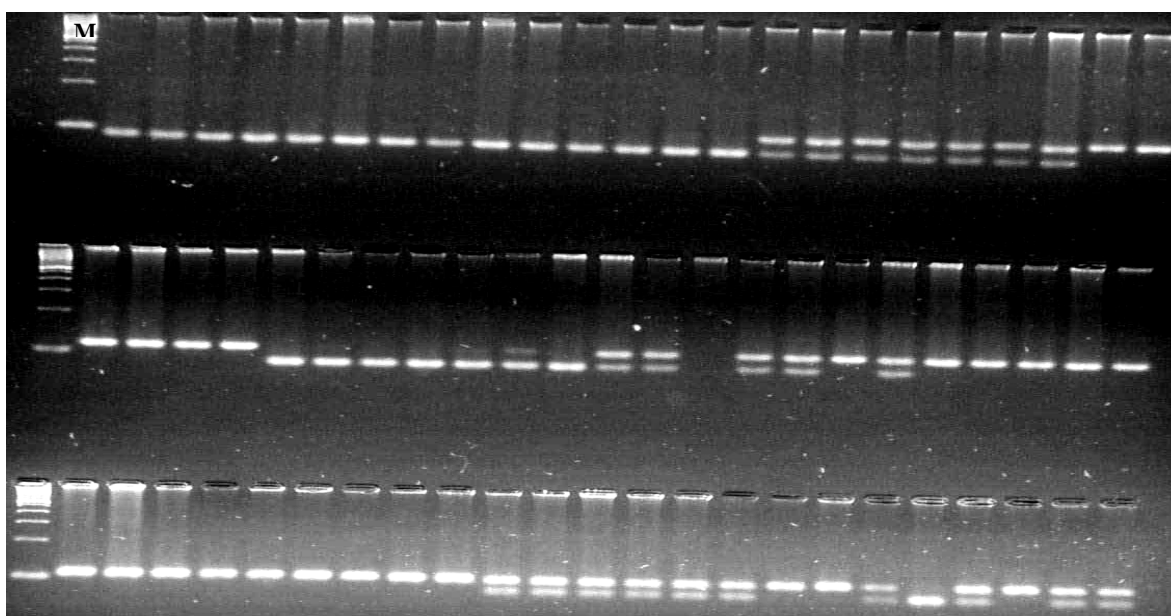


Figura 04. Amplificação do DNA genômico das 10 linhagens de milho pipoca usando o microssatélite UMC1071. M é o marcador *Laeder* 100 pb (Invitrogen).

A partir do padrão de fragmentos amplificados obtidos para cada *primer* de RAPD foi gerada uma matriz binária, onde para a presença do fragmento foi atribuído 1 e para a ausência foi atribuído 0 (zero). Esta matriz de dados foi submetida à análise utilizando o programa GENES, empregando o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard, e os resultados das distâncias genéticas entre as 10 linhagens estão apresentados no Quadro 05. Para a análise do RAPD as linhagens P1-1 (*Yellow Pearl I*) e P9-3 (*Avati Pichinga I*) foram as que apresentaram o maior valor para a distância genética (0,4219), e as linhagens P1-2 (*Zélia I*) e P1-3 (*Curagua*) e P1-2 (*Zélia I*) e P1-4 (*Zélia II*) foram as que apresentaram os valores menores de distâncias genéticas (0,2394 e 0,2411 respectivamente). O valor maior para a distância genética observada entre as linhagens P1-1 (*Yellow Pearl I*) e P9-3 (*Avati Pichinga I*) pode ser explicado pela origem divergente de ambas variedades de milho pipoca; a variedade *Yellow Pearl I* foi formada a partir de um milho composto americano, enquanto a variedade *Avati Pichinga* é originária do Paraguai. Por outro lado, a origem comum das linhagens *Zélia I* e *Zélia II* pode explicar a maior similaridade genética, ou menor divergência genética, encontrada entre as linhagens P1-2 e P1-4, mas não explica a similaridade genética encontrada entre as linhagens formadas a partir da variedade *Zélia I* (híbrido triplo da Pioneer) e as linhagens formadas a partir da variedade *Curagua*, originária do Chile. Moller e Schaal (1999) utilizando RAPD para identificar a variação genética entre 15 acessos de milho nativo da América, também encontraram alto nível de polimorfismo entre os acessos, e os resultados revelaram uma forte correlação entre a relação genética e a posição geográfica dos acessos nativos americanos. Os referidos autores (Moller e Schaal, 1999) concluíram que análise de RAPD pode ser potencialmente utilizada para organizar coleções de sementes e para entender a diferenciação genética intraespecífica. Outros autores também têm indicado o RAPD como ferramenta para determinar a extensão da variedade genética entre linhagens de milho e para agrupar genótipos diferentes em grupos heteróticos distintos (Lanza et al., 1997; Liu et al., 1997; Shieh e Thseng, 2002). Da mesma maneira, os resultados obtidos por Carvalho et al. (2004), estudando 81 acessos de milho, sugerem que RAPD é um marcador importante para estabelecer e manter uma coleção de germoplasma.

Quadro 05. Distâncias genéticas calculadas entre as dez linhagens de milho pipoca a partir dos dados obtidos de RAPD, usando o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard

	P1-1	P1-2	P1-3	P1-4	P1-5	P9-1	P9-2	P9-3	P9-4	P9-5
P1-1	0	0.3316	0.3600	0.3159	0.3098	0.3902	0.4082	0.4219	0.3782	0.4125
P1-2		0	0.2394	0.2411	0.3162	0.3175	0.2685	0.3731	0.2831	0.3141
P1-3			0	0.2415	0.3220	0.3199	0.3119	0.3821	0.3399	0.3487
P1-4				0	0.2875	0.3039	0.2972	0.3821	0.3117	0.2923
P1-5					0	0.3465	0.3246	0.3501	0.3797	0.3275
P9-1						0	0.2740	0.3153	0.3261	0.2745
P9-2							0	0.2814	0.2824	0.2458
P9-3								0	0.3288	0.2906
P9-4									0	0.2923
P9-5										0

Com a análise do polimorfismo dos marcadores RAPD para as 50 amostras individuais de plantas das 10 linhagens foi possível a construção do agrupamento apresentado na Figura 04. O dendrograma construído pelo programa GENES identificou os vários grupos de origens divergentes usados para formar as 10 linhagens de milho pipoca.

A análise do dendrograma mostra que apesar das linhagens dos grupos P1 (P1-1, P1-2, P1-3, P1-4 e P1-5) e P9 (P9-1, P9-2, P9-3, P9-4 e P9-5) estarem na sétima geração de cruzamentos entre meio-irmãos, estas ainda contém variabilidade genética suficiente para garantir o prosseguimento do processo de seleção. O dendrograma também mostra as linhagens P1 e P9 em dois grupos maiores, indicando uma perspectiva para a formação de 2 grupos heteróticos.

O mesmo conjunto de dados utilizado para formar o dendrograma da Figura 04 foi utilizado para construir o dendrograma da Figura 05, usando o programa PopGen 32. No dendrograma da Figura 05, embora cada uma das amostras das 10 linhagens estejam representadas individualmente (5 amostras de cada linhagem), estas também formam 2 grupos grandes e distintos correspondentes aos grupos P1 e P9, similar ao que foi observado usando o programa GENES para a análise dos marcadores RAPD. Estas evidências indicam que independente da análise utilizada o resultado obtido para RAPD foi similar.

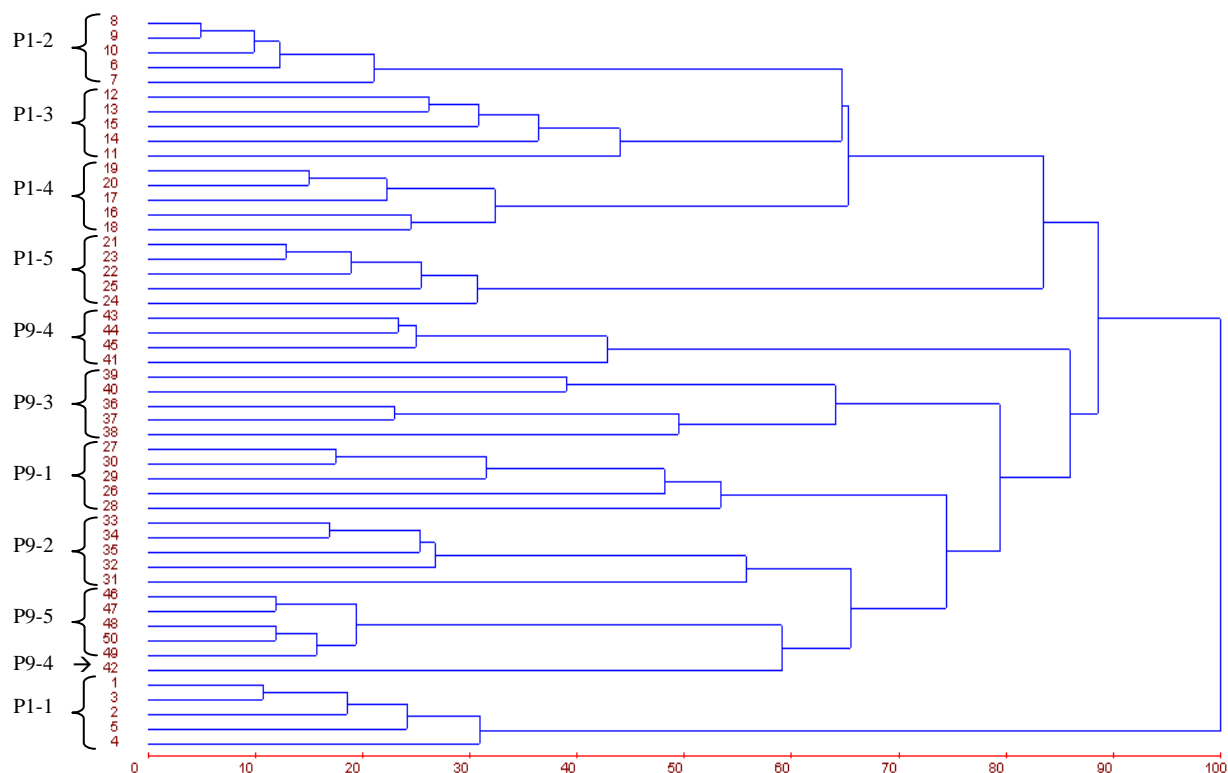


Figura 04. Agrupamento das 5 plantas de cada uma das 10 linhagens de milho pipoca construído com os dados obtidos com o marcador RAPD usando o método de UPGMA (programa GENES).

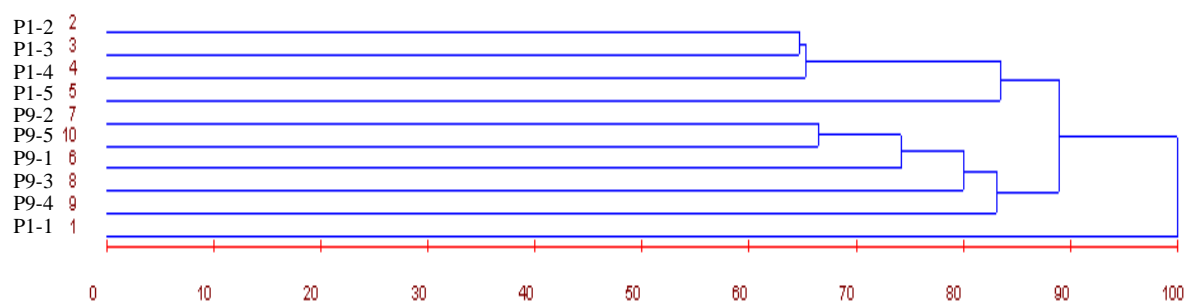


Figura 05. Dendrograma da similaridade genética construído com os dados obtidos com o marcador RAPD para as 10 linhagens de milho pipoca, definido pelo método de agrupamento UPGMA (programa PopGen 32).

Embora não tenham sido encontrados na literatura especializada estudos com milho pipoca utilizando marcadores RAPD, a organização das linhagens das populações P1 e P9 em dois grupos distintos parece ser um indicativo da consistência do marcador RAPD para a análise e caracterização molecular de milho pipoca, estando portanto, em consonância com os propósitos de formação de linhagens divergentes em programas de melhoramento genético.

A partir da análise da frequência dos 47 alelos nos *loci* SSR, foi calculada a diversidade genética através da distância genética de Rogers (1972). A maior distância genética (0,8495) foi detectada entre as linhagens P1-4 (Zélia II) e P9-3 (Avati Pichinga) e a menor distância (0,2092) foi verificada entre as linhagens P1-2 (Zélia I) e P1-4 (Zélia II), conforme pode ser observado no quadro das distâncias genéticas (Quadro 06).

A linhagem P1-4 foi derivada do híbrido triplo da Pioneer, e a linhagem P9-3 foi derivada da variedade Pichinga originada do Paraguai. Portanto, a maior distância genética entre as linhagens de Zélia II e as linhagens da variedade Pichinga estimada a partir da análise dos *loci* SSR, também pode ser justificada pela distância geográfica de origem das variedades desenvolvidas no Brasil e no Paraguai, refletindo assim, a distância biológica entre as duas variedades originais.

A comparação dos valores de distância genética estimados com a análise do RAPD e com a análise dos *loci* SSR mostrou números diferentes. Por exemplo, as linhagens que apresentaram maior distância genética, ou seja, menor similaridade, para os dados obtidos com o RAPD foram as linhagens P1-1 e P9-3 (0,4219), e na análise dos microssatélites a distância obtida entre estas mesmas linhagens foi de 0,6443. As linhagens que apresentaram maior distância para os dados obtidos com microssatélite foram as P1-4 e P9-3 (0,8495), e para o RAPD a distância entre estas duas linhagens foi de 0,3821. Deste modo, os valores de distância genética entre algumas linhagens parecem ser maiores quando os *loci* SSR são usados em comparação com os marcadores de RAPD.

O polimorfismo RAPD quando comparado com o polimorfismo em *loci* específicos, como o de isozimas, por exemplo, foi apresentado como sendo maior (Baruffi et al., 1995); os autores destas evidências justificaram que as regiões aleatórias de DNA aparentemente evoluem mais rapidamente do que as seqüências de *loci* específicos. Embora a expressão ou neutralidade dos *loci* SSR ainda seja um aspecto controverso, a variação ocorrida em determinados *loci* SSR das linhagens de milho pipoca tem conduzido a uma maior divergência genética entre as linhagens; este aspecto pode ser evidenciado pela discrepância dos valores de distância genética obtidas com a análise de RAPD (menor distância genética) e análise de *loci* SSR (maior distância genética) entre duas linhagens.

Apesar dos valores diferentes de distâncias genéticas observadas analisando o RAPD e os microssatélites, o dendrograma da Figura 06, construído com o agrupamento dos genótipos avaliados em função das distâncias genéticas estimadas a partir da análise dos *loci SSR* e utilizando o método das médias das distâncias (UPGMA; *Unweighted Pair-Group Method using an Arithmetic Average*), também identifica os dois grandes grupos formados para os genótipos P1 e P9, de modo similar ao observado nos agrupamentos determinados com a análise do RAPD (Figuras 04 e 05).

O valor de correlação de Pearson estimado a partir da comparação das distâncias genéticas obtidas com os dois marcadores, RAPD e microssatélite, foi igual a $r = 0,5453$ (Figura 07). Este valor que é um pouco maior do que 0,5 indicando que existe um relativo padrão de associação entre os resultados obtidos por estes dois marcadores. O desvio padrão foi de 0,112 e intervalo de confiança Bootstrap de (95% de probabilidade): 0.315 – 0.684. O intervalo de confiança demonstra que a associação entre os marcadores é positiva e estatisticamente diferente de zero, e o valor de correlação de Pearson de 0,5453 é um reflexo das diferenças para a similaridade observada e já apresentada acima para os dois marcadores para as 10 linhagens. Estas diferenças podem ser observadas nos dendrogramas produzidos a partir de resultados obtidos com RAPD e microssatélite. Os dois dendrogramas construídos com os dados obtidos de RAPD para as linhagens P1 e P9, apresentam dois grupos principais, mas a linhagem P1-1 está isolada destes grupos. Para os dados obtidos com microssatélite as linhagens P1 e P9 formaram os 2 grupos distintos.

A comparação de distâncias genéticas geradas por diferentes marcadores moleculares, tem sido descrita por vários autores (Hahn et al., 1995; Russell et al., 1997; Yang et al., 1996), e tem revelado somente moderada associação entre as distâncias genéticas calculadas com os marcadores RFLP e RAPD. Pejic et al. (1998), por exemplo, comparou diferentes marcadores moleculares utilizados para avaliar a similaridade genética entre linhagens de milho, e observaram grandes diferenças para os agrupamentos de similaridade obtidos com o emprego de RAPD, RFLP, SSR e AFLP. O fato é que tem sido pouco freqüente que os resultados obtidos com RAPD se correlacionam com os resultados obtidos com outros tipos de marcadores para milho (Hahn et al., 1995; Pejic et al., 1998; Garcia et al., 2004), e também para outras espécies (Doldi et al., 1997; Russell et

al., 1997). De acordo com Li et al. (2001) a inconsistência entre os dados obtidos por diferentes marcadores, especialmente para avaliar diferentes linhagens, resulta do fato que os marcadores moleculares avaliam diferentes componentes de variação do DNA, e estes podem evoluir de diferentes maneiras. A comparação da eficiência entre marcadores moleculares para estudar a diversidade genética em 18 linhagens de milho tropical, realizada por Garcia et al. (2004), mostrou que o valor mais baixo de correlação foi encontrado entre os marcadores de RAPD e microssatélites; neste trabalho os autores encontraram um valor de correlação de Pearson igual a 0,33. Os valores altos de correlações relatados pelos referidos autores (Garcia et al., 2004) foram verificados entre os marcadores de RFLP e RAPD (0,50) e entre o RAPD e AFLP (0,48). Esta proposição de baixa correlação de Pearson para marcadores de RAPD e microssatélites pode ser superada frente as evidências das análises das 10 linhagens de milho pipoca utilizando os marcadores RAPD e microssatélites na presente investigação.

Desta forma, apesar das indicações de que os microssatélites correspondem a marcadores moleculares mais informativos do que a análise de RAPD (Demeke et al., 1997), as análises das 10 linhagens de milho pipoca indicam que ambas as técnicas podem fornecer informações consistentes e no mesmo sentido para estudar a diversidade genética em milho pipoca, apresentando valores de diversidade genética e distâncias genéticas concordantes. Portanto, a opção de analisar a diversidade genética em milho pipoca usando marcadores RAPD para monitorar e orientar programas de melhoramento genético pode ser feita, desde que as limitações impostas por esta técnica sejam superadas. Superar as limitações de análise de RAPD, e tornar este um marcador com resultados mais confiáveis, envolve a padronização dos parâmetros de reação, a seleção dos *primers* mais adequados, e a utilização de vários *primers* considerando para a análise somente os fragmentos reproduzíveis, conforme as premissas apontadas por Demeke et al. (1997). Para as análises de RAPD nas 10 linhagens de milho pipoca houve uma preocupação em padronizar as melhores condições de amplificação, e estes cuidados foram importantes e determinantes dos resultados consistentes obtidos com os dois tipos de marcadores moleculares.

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

Quadro 06. Distâncias genéticas calculadas entre as dez linhagens de milho pipoca a partir dos dados obtidos com microssatélite usando o coeficiente de Rogers

	P1-1	P1-2	P1-3	P1-4	P1-5	P9-1	P9-2	P9-3	P9-4	P9-5
P1-1	0	0.2677	0.3289	0.3618	0.3402	0.61	0.6387	0.6443	0.6501	0.6575
P1-2		0	0.3056	0.2092	0.4046	0.6403	0.6228	0.7681	0.6945	0.6609
P1-3			0	0.3117	0.4581	0.5374	0.6006	0.6436	0.6498	0.5657
P1-4				0	0.3985	0.7424	0.6966	0.8495	0.7377	0.7559
P1-5					0	0.7698	0.8359	0.7879	0.7194	0.7255
P9-1						0	0.2194	0.3028	0.4212	0.2668
P9-2							0	0.2861	0.3791	0.3221
P9-3								0	0.4358	0.2649
P9-4									0	0.3469
P9-5										0

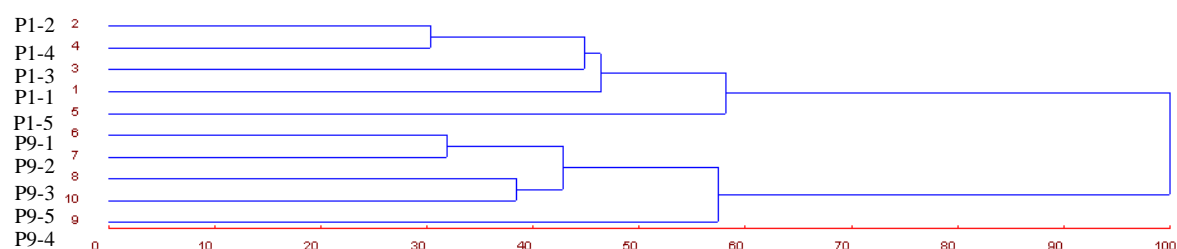


Figura 06. Agrupamento das dez linhagens de milho pipoca construído com os dados obtidos com os marcadores microssatélites e utilizando o método de UPGMA.

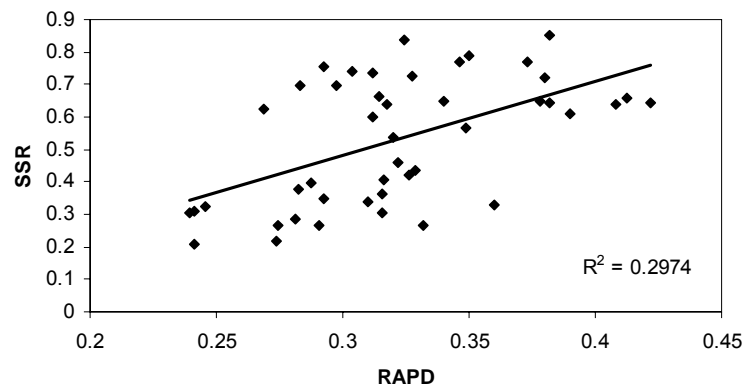


Figura 07. Gráfico de dispersão construído a partir das distâncias genéticas (GD) obtidas usando marcadores microssatélites e RAPD. A linha reta indica o grau de correlação entre as distâncias genéticas. R^2 é o coeficiente de determinação do ajuste da linha reta.

5. CONCLUSÕES

1. Os diferentes valores de distâncias genéticas observadas analisando os dados obtidos com o RAPD e com o microssatélite é um reflexo das regiões do genoma do milho que foram investigadas por estes dois marcadores. Apesar dos diferentes valores obtidos para estes marcadores, os dendrogramas construídos identificam dois grandes grupos formados para os genótipos P1 e P9, isto é um indicativo da consistência do marcador RAPD para a análise e caracterização molecular de milho pipoca, sendo que este pode ser utilizado com o propósito de separar as linhagens divergentes em programas de melhoramento genético.

2. Apesar das indicações de que os microssatélites correspondem a marcadores moleculares mais informativos do que a análise de RAPD, o estudo das 10 linhagens de milho pipoca indicam que ambas as técnicas podem fornecer informações consistentes para estudar a diversidade genética em milho pipoca. Portanto, a opção de analisar a diversidade genética em milho pipoca usando marcadores RAPD pode ser feita, desde que as limitações impostas por esta técnica sejam superadas.

3. A avaliação da distância genética entre as linhagens parentais de milho pipoca, quer seja utilizando os marcadores RAPD ou *loci* microssatélites, foi um procedimento importante, pois a divergência genética estimada poderá ser usada para prever o vigor de híbridos produzidos a partir de determinados cruzamentos, visando assim, aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento genético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; BENCHIMOL, L.L.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA Jr. C.L.; SOUZA, A.P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize

single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR Markers. **Euphytica**, 130:87-99, 2003.

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

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

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

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

BECKMAN, J.S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. **Bio/Technology**, 8:930-932, 1990.

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

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

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 500p.

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

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

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

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

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

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

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

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

CLERC, A.; MANCEAU, C.; NESME, X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic

diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64:1180-1187, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. London: Longman, 1996. 464p.

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

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. (3.ed.). Brasília: EMBRAPA-CERNAGEN, 1998. 220 p.

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

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

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

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

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

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

GUPTA, P.K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Current Science*, 70: 45–54, 1996.

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

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

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

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. 2.ed. Mexico: CIMMYT, 1994. 50p.

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

JACOB, H.J.; LINDPAINTER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, YI-PEI; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, 67:213-224, 1991.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; Van de WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; DALY, A.;

BRETTSCHNEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD AFLP and SSR markers in plants network of European laboratories. **Molecular Breeding**, 3:381-390, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and heterosis. In: COORS, J.G.; PANDEY, S. (eds.) **The genetics and exploitation of heterosis in crops**. Proceedings of an international symposium, CIMMYT, Mexico City, Mexico, 17-22, august, 1997. Crop Science Society of American, Madison, Wisconsin, USA, pp. 99-118.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, 97:1248-1255, 1998.

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

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

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

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

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

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 3.ed. Lavras: Editora UFLA, 2004. 472p.

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

REIF, J.C., MELCHINGER, A.E., XIA, X.C., WARBURTON, M.L., HOISINGTON, D.A., VASAL, S.K., BECK, D., BOHN, M., FRISCH, M. Use of SSRs establishing heterotic groups in subtropical maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 107:947-957, 2003.

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

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

ROGERS, J.S. Measures of similarity and genetic distance. Studies in Genetics VII. University of Texas Publ 7213:145-153 (1972)

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

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

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

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

SALEM, H.H.; ALI, B.A.; HUANG, T.; QIN, D.; WANG, X.; XIE, Q. Use of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis for Economically Important Food Crops. **Journal of Integrative Plant Biology**, 49:1670-1680, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S.E.; KRESOVITCH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR

loci as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparison with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:163-173, 1997.

SMITH, J.S.C.; KRESOVICH, S.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; DEAN, R.E.; WOODMAN, W.L.; LEE, M.; PORTER, K. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. **Crop Science**, 40:226–232, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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](#)