

MARCADORES ISSR NA FORMAÇÃO DE GRUPOS HETERÓTICOS
E NA INFERÊNCIA EVOLUTIVA DE MILHO PIPOCA

ÉRICA CRISTINA DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2010

MARCADORES ISSR NA FORMAÇÃO DE GRUPOS HETERÓTICOS E NA INFERÊNCIA EVOLUTIVA DE MILHO PIPOCA

ÉRICA CRISTINA DE OLIVEIRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO - 2010

MARCADORES ISSR NA FORMAÇÃO DE GRUPOS HETERÓTICOS E NA INFERÊNCIA EVOLUTIVA DE MILHO PIPOCA

ÉRICA CRISTINA DE OLIVEIRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 15 de janeiro de 2010.

Comissão Examinadora:

Prof. Luiz Orlando de Oliveira (Ph.D. em Plant Genetics and Breeding) – UFV

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D. em Plant Breeding) – UENF

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D. em Plant Breeding) – UENF

Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior (D.Sc. Genética e Melhoramento) – UENF
Orientador

A Deus.
A Maria Ângela e Hélio, meus pais.
A Priscilla e Fábio, meus irmãos.
A Guilherme, meu sobrinho.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de certa forma, estiveram presentes durante a conquista de mais este sonho, contribuindo não somente para a minha formação profissional, mas também no crescimento pessoal. Em especial agradeço:

A Deus que, em sua infinita bondade, está sempre comigo.

A toda a minha família, que sempre acreditou nos meus sonhos e me apoiou mesmo nas mais difíceis decisões, estando sempre presente nos momentos em que eu mais precisei. Ao meu pai, agradeço por acreditar que eu podia, por apoiar-me nas minhas renúncias para estar aqui hoje; a minha mãe, por me incentivar a conquistar meus sonhos e aproveitar a cada instante da vida. Agradeço aos meus irmãos, pela força, incentivo e companheirismo. Ao meu sobrinho, por alegrar muitas vezes os meus dias, após um sorriso *online*. A minha madrinha (Cecília), aos primos, avós, tios, tias e cunhada.

Ao professor Antônio Teixeira do Amaral Júnior, meu orientador e amigo, que sempre esteve ao meu lado acreditando em mim, mostrando o caminho e sempre exigindo mais. E dessa forma, atribuo a ele, à pessoa e ao profissional, o que sou hoje.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), por fornecer estrutura suficiente para a formação de um profissional de qualidade e pela concessão da bolsa em parte do curso.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

Às instituições, UEM, CIMMYT, Embrapa, UFV, Pesagro e IAC, que doaram sementes, possibilitando desenvolver o trabalho com ampla diversidade de acessos.

A todos os docentes que contribuíram para a minha formação, em especial à professora Telma e ao professor Messias, pela orientação e valiosas sugestões essenciais para obtenção dos resultados apresentados nesta dissertação.

Ao professor Luiz Orlando de Oliveira, por fazer parte da banca de defesa da dissertação e contribuindo valiosamente para a melhoria do trabalho.

Aos funcionários da UENF, em especial ao técnico agrícola, Geraldo Francisco de Carvalho, e ao secretário, José Daniel Valle de Almeida, por todo o ensinamento, atenção e auxílio.

Aos colegas e amigos que conquistei durante a minha formação na UENF, tanto pela amizade e companheirismo quanto pelo aprendizado com suas experiências profissionais. Cito alguns: Ana Paula, Keila, Roberta, Poliane, Monique Freitas, Monique Moulin, Fernanda, Tatiane, Roberto, Lívia, Guilherme, Rodrigo, Renato, Ismael, Marilene, Emanuelli, Ronaldo, Lílian, Elaine, Dyana, Laissa, Magda, Valéria e Cynara. Em especial, agradeço ao Silvério e Leandro, pelo auxílio constante e pela amizade que construímos.

E às amigas, que posso chamar de irmãs que, apesar da distância, sempre estiveram presentes em minha vida (Camila, Marília, Tatianne e Aline).

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Taxonomia e características do Milho, Teosinte e <i>Tripsacum</i>	5
.2. Evolução do Milho	8
3.2.1. Relatos sobre a relação entre Milho, Teosinte e <i>Tripsacum</i>	8
3.2.2. Relatos sobre a relação entre o Milho e o Teosinte.....	11
3.2.2.1. Subespécie parental do Milho.....	13
3.3. Origem e hipóteses da domesticação do Milho.....	15
3.3.1. Origem do Milho Pipoca.....	20
3.4. Abordagens econômicas do Milho comum e Milho Pipoca.....	20
3.5. Melhoramento Genético de Milho: focalizando o Milho Pipoca.....	23
3.5.1. Melhoramento de Milho Pipoca na UENF.....	28
3.6. Divergência genética e grupos heteróticos.....	29
3.7. Marcador molecular – Técnica PCR.....	34
3.8. Marcadores moleculares e variabilidade genética.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. Material genético.....	39

4.2. Análise molecular.....	42
4.2.1. Extração do DNA.....	42
4.2.2. Quantificação do DNA.....	42
4.2.3. Amplificação do DNA.....	42
4.2.3.1. Marcador RAPD.....	42
4.2.3.2. Marcador ISSR.....	43
4.2.4. Eletroforese.....	45
4.3. Análises de diversidade.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Temperatura de anelamento e <i>Touchdown</i> no ajuste da técnica PCR para marcadores ISSR.....	48
5.2. Divergência genética e inferência evolutiva utilizando os marcadores RAPD e ISSR.....	52
5.3. Divergência genética no Milho Pipoca.....	62
5.3.1. Divergência genética entre os acessos de Milho Pipoca do Programa de Melhoramento da UENF (UNBs).....	69
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RESUMO

OLIVEIRA, Érica Cristina de; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Janeiro de 2010; Marcadores ISSR na formação de grupos heteróticos e na inferência evolutiva de milho pipoca. Orientador: Prof. Antônio Teixeira do Amaral Júnior. Conselheiros: Profa. Telma Nair Santana Pereira e Prof. Messias Gonzaga Pereira.

Esta pesquisa teve por objetivos inferir sobre a ancestralidade bem como conhecer a amplitude genética do milho pipoca utilizando marcadores ISSR. Além disso, foi avaliada a formação de grupos heteróticos e averiguado o efeito da seleção recorrente nas populações UNB-2U C0, C1, C2, C3 e C4 (UENFV-Explosiva) de milho pipoca. Para atingir os primeiros objetivos, 52 acessos foram analisados incluindo milho pipoca, milho comum (diploide e tetraploide), milho dentado, farináceo, e doce, e os supostos ancestrais do milho comum (*Tripsacum* sp. e teosinte). Os marcadores ISSR foram otimizados, via metodologia de PCR, utilizando a técnica *Touchdown*, a qual foi eficiente na amplificação das bandas, possibilitando a produção de 137 bandas polimórficas com o uso de 15 iniciadores. As análises de agrupamento por Neighbor-Joining e por Análise das Coordenadas Principais (PCoA), confirmaram a proximidade genética do teosinte com o milho comum (dentado, farináceo e tetraploide) e com o milho pipoca, em relação ao *Tripsacum* sp. Foi possível também formar dois grupos, um agrupou os acessos de milho comum e o outro agrupou os acessos de milho pipoca. Entre os materiais, *Tripsacum* sp. compartilhou um maior número de marcas com milho doce e milho pipoca do que com os demais tipos de milho comum. Os resultados

do agrupamento por UPGMA de 34 acessos de milho pipoca constituíram apenas cinco grupos e reuniram em um grupo cinco (IAC-112, IAC-125, UFVM2 Barão de Viçosa, RS 20 e Jade) dos sete materiais comerciais obtidos no Brasil; assim, pode-se concluir que a base genética do milho pipoca é estreita e que é necessário ampliar a base genética dos programas de melhoramento de milho pipoca, conduzidos por instituições públicas e privadas. O estudo de divergência genética da população UNB-2U mostrou que os ciclos C0 e C1 estão geneticamente mais afastados dos ciclos C2, C3 e UENFV-Explosiva (C4).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Érica Cristina de; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; January, 2010; The use of ISSR markers on the formation of heterotic group and on the evolutionary inferences in popcorn. Adviser: Antônio Teixeira do Amaral Júnior. Committee members: Telma Nair Santana Pereira and Messias Gonzaga Pereira.

This research has the objectives to infer about the ancestry as well as to estimate the genetic amplitude of popcorn by using the ISSR markers. Besides it was evaluated the heterotic group formation and verified the effect of recurrent selection in the popcorn population (UNB-2U C0, C1, C2, C3 and C4 (UENFV-Explosiva). To achieve the first objectives 52 accesses were analyzed, including popcorn, dent corn, flint corn, sweet corn, common corn (diploid and tetraploid) and the putative ancestors of maize (teosinte and *Tripsacum*). The ISSR markers were optimized by the Touchdown technique, which provided more efficient band amplifications, generating 137 polymorphic bands using 15 primers. The cluster analysis by Neighbor-Joining and Principal Coordinates Analysis (PCoA), confirmed the genetic proximity of teosinte with common corn (dent, flint, and tetraploid) and with popcorn, in relation to *Tripsacum*. There was also possible to form two groups, one clustered the common corn access and the other clustered the popcorn accesses. Among the materials, *Tripsacum* share more common bands in the sweetcorn and popcorn than in common corn. The results of UPGMA clustering analysis of 34 of popcorn accesses formed only five groups and five out seven commercial materials developed in Brazil (IAC-112, IAC-125, Viçosa,

UFVM2 Barão de Viçosa, RS 20 and Jade) were clustered together; so, it can be drawn a conclusion that the genetic base of maize is narrow and that it is necessary to widen the genetic base of the plant breeding programs conducted by public and private institutions. The genetic divergence study of UNB-2U population showed that Co and C1 cycles are genetically more apart from C2, C3, and UENFV-Explosiva (C4).

1. INTRODUÇÃO

Acredita-se que o centro de origem do milho seja Tehuacán, no México (Zinsly e Machado, 1980; Engels *et al.*, 2006); entretanto, existem controvérsias sobre a genealogia. A despeito dos inúmeros estudos em diversas áreas (Mangelsdorf e Reeves, 1939; Galinat, 1974; Mangelsdorf, 1974; Takahashi *et al.*, 1999; Goloubinoff *et al.*, 1993; Eubanks, 1997; White e Doebley, 1999; Poggio *et al.*, 2000; Poggio *et al.*, 2005; Koo e Jiang, 2008; Fu *et al.*, 2009), as incertezas persistem sobre a relação de ancestralidade e de parentesco entre o grupo de milho (*Zea mays ssp. mays*), teosinte (*Zea mays ssp. mexicana*) e *Tripsacum*.

Além das inferências na abordagem sobre a origem do milho comum, indaga-se também sobre a origem do milho pipoca. Alguns autores propalaram que o milho pipoca adveio do milho comum do tipo duro (dada a baixa capacidade de estourar), outros preconizam que essa hipótese é improvável já que o mais primitivo exemplar de milho é do tipo pipoca. (Zinsly e Machado, 1980; Kantety *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1999; White e Doebley, 1999; Fu *et al.*, 2009)

O milho pipoca é um alimento muito apreciado pelos brasileiros, principalmente em momentos de lazer, movimentando um mercado de bilhões de dólares, anualmente, no Brasil. (Rangel *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008)

Apesar do grande consumo, a recomendação de genótipos superiores de milho pipoca no país ainda é limitada; desde a década de 90, foram

recomendados apenas sete cultivares no Brasil. (Pacheco *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008; Pioneer, 2009)

Na implementação dos programas de melhoramento, a reduzida base genética da cultura, que pode ter advindo de seleções do milho comum do tipo duro (Kantety *et al.*, 1995), tem despertado o interesse dos pesquisadores. Carpentieri-Pípolo *et al.* (2002), ao avaliarem a divergência genética entre nove genótipos de milho pipoca, detectaram, por meio de análise de agrupamento, a formação de apenas dois grupos, identificados por reunirem somente um genótipo no grupo II. Foram recomendados cruzamentos entre o genótipo do grupo II e quatro genótipos do grupo I, o que proporcionou a constituição de apenas quatro híbridos superiores, tornando reduzida a possibilidade de explorar a obtenção dos possíveis 36 híbridos entre todos os genótipos incluídos no estudo. Mais recentemente, Miranda *et al.* (2008) concluíram que, embora seja possível aumentar a produtividade de grãos usando materiais locais, há dificuldade de obtenção de híbrido intervarietal comercial no Brasil. Populações de milho pipoca brasileiro têm heterose e variabilidade genética reduzidas para a capacidade de expansão em relação aos cultivares comerciais.

A constituição de grupos heteróticos é um dos pilares fundamentais no melhoramento do milho, uma vez que a formação de grupos divergentes, seja de materiais adaptados a clima temperado ou tropical, constitui a base para o emprego de estratégias de melhoramento. (Hallauer, 1973; Austin *et al.*, 2000; Barata e Carena, 2006; Aguiar *et al.*, 2008)

Segundo Hallauer, referenciado por Borém e Miranda (2005), grupos heteróticos correspondem a grupos divergentes de germoplasma que, quando cruzados, exibem altos níveis de heterose em F_1 .

Nesse aspecto, a variabilidade genética é fundamental nos programas de melhoramento, os quais buscam novas variedades que possam servir como futuros cultivares. Conhecer, pois, a diversidade genética é fator muito importante para o aproveitamento da heterose e, conseqüentemente, para a síntese de combinações superiores. (Moll *et al.*, 1965; Goodman, 1990; Vencovsky e Barriga, 1992; Laborda, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Balestre *et al.*, 2008)

Em milho comum, cujos programas de melhoramento receberam maior atenção por parte dos pesquisadores, autores têm observado a eficiência na identificação de grupos heteróticos de linhagens por procedimentos moleculares,

como. RFLP (Ajmone-Marsan *et al.*, 1998; Benchimol *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2003), AFLP (Lubberstedt *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2004); SSR (Reif *et al.*, 2003; Barata e Carena, 2006) e ISSR (Osipova *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2005).

Estudos baseado em marcadores moleculares com milho pipoca têm sido raros na comunidade científica. Nesse aspecto, Li *et al.* (2004) avaliaram a diversidade genética em relação a 56 linhagens de milho pipoca representantes de ampla base genética da cultura, além de 21 linhagens de milho comum, provenientes de diferentes grupos heteróticos de programas de melhoramento da China. Os autores verificaram a formação de agrupamentos diferenciados entre as linhagens de milho pipoca e comum, e que sete grupos heteróticos foram identificados com grande concordância das linhagens intragrupos e estudos prévios de melhoramento. Enfatizaram a importância do uso de marcadores SSR, em estudo de divergência genética, com linhagens de milho pipoca e comum.

Santacruz-Varela *et al.* (2004) utilizaram 29 marcadores morfológicos, 18 locos isozimáticos e 31 locos SSRs para avaliar a relação entre os germoplasmas de milho pipoca representativos das Américas. O estudo incluiu 56 populações dos E.U.A. e de nove países da América Latina, que foram dispersas em grupos, como base em análise de agrupamento e de componentes principais. Pela aglomeração dos genótipos, foi proposto o reconhecimento de três grupos, a saber: i) “Yellow Pearl Popcorn”, que representa o mais importante grupo comercial dos E.U.A.; ii) “North American Pointed Rice Popcorns”, que provavelmente originou de complexo de raças tradicionais de milho pipoca da América Latina; e iii) “North American and North American Early Popcorn”, que têm grande relação com milho comum do tipo duro, do norte dos E.U.A.

No Brasil, ainda não se tem relato do uso de marcadores ISSR na identificação de variabilidade genética de germoplasma de milho pipoca. Os escassos trabalhos com milho pipoca, aliados aos poucos programas clássicos de melhoramento com a cultura, constituem um entrave ao desenvolvimento de híbridos superiores para grande parte das áreas produtivas do país, estendendo-se à América do Sul, África e Oceania.

2. OBJETIVOS

- a) Utilizar a experiência de laboratório, para otimizar o uso da técnica *Touchdown* em marcadores ISSR, em milho (*Zea mays* L.);
- b) Inferir sobre a ancestralidade e conhecer a amplitude genética do milho pipoca, por meio de estimativas das distâncias genéticas, com base em marcadores ISSR em comparação com acessos de milho comum, teosinte (*Zea mays* ssp.) e *Tripsacum* sp.;
- c) Identificar possíveis grupos heteróticos de milho pipoca de interesse para o melhoramento em condições tropicais; e
- d) Averiguar o efeito da seleção recorrente nas populações UNB-2U C0, C1, C2, C3 e C4 (UENFV-Explosiva) de milho pipoca por marcadores ISSR.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Taxonomia e características do Milho, Teosinte e *Tripsacum* sp.

As espécies de *Zea* (milho e teosinte) e *Tripsacum* sp. são classificadas como pertencentes à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, ordem *Gramineae*. A primeira espécie pertence à tribo *Maydeae* e o *Tripsacum* sp., à tribo *Andropogoneae*. (Mangesldorf *et al.*, 1964; Galinat, 1979; Paterniani e Campos, 2005)

O gênero *Zea* inclui tanto a planta cultivada, como o milho, quanto alguns indivíduos do parente silvestre, o teosinte. As plantas de milho (*Zea mays mays* L.) são anuais, monoicas e autotetraploides ($2n=4x=20$). (Oliveira, 1984; Koo e Jiang, 2008)

O sistema radicular contém raízes primárias e adventícias. O caule é cilíndrico, tipo colmo, com nós e entrenós mais curtos na base. As folhas são lanceoladas, possuem limbo e bainha e são alternadas. Possuem duas inflorescências, a masculina e a feminina, tendo, na masculina, o pendão, constituído de um eixo central com ramificações e espiguetas. Cada pendão pode produzir de dois a cinco milhões de pólen. A parte feminina, quando bem desenvolvida, pode apresentar de 700 a 1.000 flores. (Moll *et al.*, 1965; Geraldi *et al.*, 1985) Cada estilo-estigma da espiga, quando fecundado, dá origem a uma semente. (Paterniani e Campos, 2005)

A semente do milho é o fruto, e este fruto é seco, indeiscente, com uma só semente aderente ao pericarpo. A semente é envolvida ao pericarpo podendo apresentar diversas colorações e ser de espessura variável. A função do pericarpo é proteger o interior da semente, dificultando o ataque de patógenos. (Oliveira, 1984)

De acordo com as características do grão, o milho é classificado em cinco principais classes: dentado, duro, farináceo, pipoca e doce (Paes, 2006). A principal característica do milho pipoca é conter sementes duras e pequenas que, sob a ação do calor em torno de 180 °C, estouram, dando origem à pipoca. O milho pipoca é capaz de estourar devido à presença de óleo e umidade no grão. Esse pericarpo, quando submetido à temperatura apropriada, rompe-se e expõe o endosperma. (Zinsly e Machado, 1980; Silva *et al.*, 1993; Sawazaki, 2001; Paes, 2006)

Silva *et al.* (1993) identificaram uma correlação positiva entre a capacidade de expansão e a espessura do pericarpo, bem como a proporção do endosperma com o peso e o volume. Analisando a difusividade térmica e a capacidade de expansão, os maiores valores da difusividade térmica e condutividade sugeriram que o pericarpo do milho pipoca é menos amorfo, isto é, estruturalmente mais organizado do que o pericarpo de milho comum, assim, as características do pericarpo, mais do que as do endosperma, parecem ser mais importantes para o pipocamento. A maior resistência mecânica do pericarpo do milho pipoca (aproximadamente quatro vezes maior do que o pericarpo de milho comum) significa que é possível sustentar maior pressão, privilegiando o alto valor de expansão em variedades de pipoca. As propriedades mecânicas e térmicas fazem com que o pericarpo atue como um sistema-tampão.

O teosinte é uma gramínea monoica, anual ou perene, que pode ser encontrada nas lavouras da América do Norte, muito utilizada como forrageira. Algumas espécies possuem a característica de rebrotar após o corte, apresentam perfilhamento abundante que resultam em touceiras densas e contêm várias espigas sem sabugo. Os colmos são cilíndricos e espessos com nós cobertos pelas bainhas das folhas, tendo ramificações na base. A altura da planta varia de 1,5 a 5,0 m. (Mattos, 2003)

No que se refere aos níveis de ploidia do teosinte, há indivíduos diploides e tetraploides, ambos, inicialmente, classificados como gêneros distintos do milho.

O teosinte diploide foi classificado, em 1932, por Schrader, como *Euchlaena mexicana*. Já o teosinte tetraploide foi classificado como *E. perennis*. Reeves e Mangelsdorf, em 1942, propuseram que ambas as espécies, *Euchlaena mexicana* e *Euchlaena perennis*, fossem consideradas como pertencentes ao gênero *Zea* (Goodnam e Smith, 1987). Por sua vez, Iltis e Doebley os classificaram em subespécies *Zea mays* ssp. *mexicana* ($2n=2x=20$) e *Zea mays* ssp. *parviglumis* ($2n=2x=20$), respectivamente. (Laborda, 2003) Porém, de acordo com Takahashi *et al.* (1999), *Zea perennis* ($2n=4x=40$) é considerada uma espécie distinta do teosinte diploide, cujos dados obtidos por hibridização “GISH” justificaram a separação desta na recente taxonomia, contida na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição e classificação das espécies e subespécies do Gênero *Zea*.

Seção	Espécie	Subespécie	Hábito	Genoma
<i>Luxuriantes</i>	<i>Zea diploperennis</i>		Perene	2x
	<i>Zea perennis</i>		Perene	4x
	<i>Zea luxuriantes</i>		Anual	2x
<i>Zea</i>	<i>Zea mays</i>	<i>mexicana</i>	Anual	2x
		<i>parviglumis</i>	Anual	2x
		<i>huehuetenangensis</i>	Anual	2x
		<i>Mays</i>	Anual	2x

Fonte: Freitas, 2001.

O gênero *Tripsacum* sp. possui como centro de diversidade a região Indo-Malaia. Essa tribo (*Andropogoneae*) pode ser encontrada na Ásia tropical e subtropical, na Austrália, África e no Hemisfério Ocidental, além do Continente Americano (EUA, México, Brasil, Paraguai e Colômbia). (Lemos *et al.*, 2005)

As espécies de *Tripsacum* sp. são perenes, distintas morfologicamente do milho e do teosinte, porque formam touceiras e apresentam vários citótipos: diploide ($2n=2x=36$), triploide ($2n=3x=54$), tetraploide ($2n=4x=72$), pentaploide ($2n=5x=90$) e hexaploide ($2n=6x=108$). (Goodman e Smith, 1987; Lemos *et al.*, 2005; Koo e Jiang, 2008)

As características morfológicas do milho, teosinte e *Tripsacum* sp. podem ser visualizadas e comparadas na Figura 2.

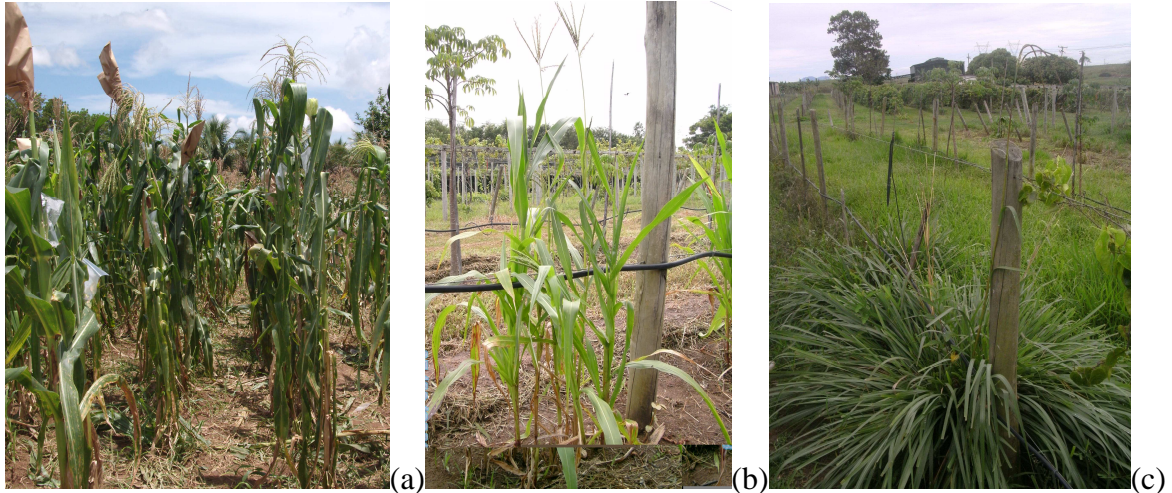


Figura 2 – Comparação do fenótipo do milho pipoca (a), teosinte (b) e *Tripsacum* sp. (c).

3.2. Evolução do Milho

3.2.1. Relatos sobre a relação entre Milho, Teosinte e *Tripsacum* sp.

As primeiras hipóteses que surgiram tentaram correlacionar o teosinte ao milho, conforme relatado por Goodman (1980). Mangelsdorf e Reeves, em 1939, baseando-se em características morfológicas, consideraram que o teosinte poderia ser o resultado da hibridação entre o milho e o *Tripsacum* sp.. Beadle, também em 1939, sugeriu que o milho teria surgido diretamente do teosinte, enquanto o *Tripsacum* sp. e o teosinte teriam sido derivados de um ancestral em comum. Um pouco antes, Weatherwax (1935) e, posteriormente, Randolph (1955) propalaram que o milho, o teosinte e o *Tripsacum* se originaram de um ancestral comum, mas evoluíram em linhas diferentes. Goodman (1980) ainda relata outra hipótese apresentada por Mangelsdorf, em 1974, em que o teosinte poderia ter sido originado do milho.

Em 1974, Galinat e Mangelsdorf compararam o número de genes do milho com *Tripsacum* sp. e verificaram que um complexo de genes ligados, localizado no cromossomo 4 do teosinte e do milho, estava distribuído em pelo menos três cromossomos do *Tripsacum* sp. Em decorrência, hipotetizaram que o 4º cromossomo do milho talvez fosse o mais altamente diferenciado em *Tripsacum* sp. (cromossomo este tido como o mais importante para determinar várias características da estrutura do envoltório do fruto do teosinte). Sendo assim, na concepção de Goodman (1980), se a introgressão do *Tripsacum* sp. tivesse influência sobre a origem do teosinte, era de se esperar que o *Tripsacum* possuísse a capacidade de fornecer este segmento do cromossomo 4 para o milho. Segundo o autor, a ausência de locos no cromossomo 4 de *Tripsacum* sp., pela sua introgressão em milho, gera um obstáculo para crer-se na descendência do teosinte

Pesquisas recentes, desenvolvidas por Poggio *et al.* (2000), utilizando a análise citogenética “FISH-GISH”, revelaram que 180 pares de bases repetidas, presentes no milho, também estavam presentes em *Z. diploperennis*, *Z. luxurians* e *Tripsacum dactyloides*, podendo indicar que mais de uma espécie estaria envolvida na origem do milho e que o rearranjo entre os genomas ocorreu posteriormente, uma ideia que corrobora a proposta de o milho ser alopoloide. Contudo, Poggio *et al.* (2005) sugeriram que o teosinte (*Zea mays parviglumis*) não seria o único ancestral do milho e que a introgressão de *Tripsacum* sp. no milho não poderia ser desconsiderada, baseando-se também em análise pelo método “FISH-GISH”.

Em outro estudo desenvolvido pela técnica de hibridização *in situ* (GISH), Takahashi *et al.* (1999) analisaram a relação entre o milho e seus parentes silvestres, concluindo que todos os ancestrais estudados (*Zea mays* ssp. *mexicana*, *Z. mays* ssp. *parviglumis*, *Z. diploperennis*, *Tripsacum dactyloides* e *Coix Lacryma-jobi*) apresentaram hibridização similar quando se utilizam os cromossomos do milho como sondas. Outro resultado de interesse teve-se à relação entre *Z. diploperennis* (diploide) e *Z. perennis* (tetraplóide), que balizou a existência de separação taxonômica, baseada na hibridização, quando utilizando, como sondas, o DNA dos dois indivíduos; observou-se ainda que a hibridização com os cromossomos do milho somente ocorria quando utilizado *Z. perennis*.

White e Doebley (1999), analisando a diversidade de nucleotídeos no gene terminal *ear1* (*te1*) em 26 sequências isoladas, nas quais, 12 acessos eram de milho, cinco de *Z. mays parviglumis*, três de *Z. mays mexicana*, dois de *Z. mays huehuetenangensis*, um de *Z. diploperennis*, um de *Z. luxurians*, um de *Tripsacum dactyloides* e um de *Tripsacum floridanum*, puderam observar que, embora a diversidade de nucleotídeos em *te1* na cultura do milho seja menor em relação ao *Z. mays parviglumis*, as análises filogenéticas entre essas sequências não apresentaram provas de seleção passada, indicando que a região do gene estudado não estaria envolvida na evolução do milho. Porém, a pequena diversidade genética do *te1* no milho em relação aos seus progenitores é comparável às encontradas em estudos anteriores de isoenzimas, e é coerente com a redução da diversidade genética do “grande-gonoma”, resultante da domesticação por efeito gargalo.

Eubanks (1997), por meio de “fingerprinting”, verificou plantas híbridas do cruzamento entre *Tripsacum dactyloides* ($2n=2x=36$), teosinte perene e *Zea diploperennis* e, por análise molecular por RFLP, investigou a possibilidade de as características do milho serem derivadas da hibridação entre o teosinte perene e o *Tripsacum* sp. Em decorrência de as análises revelarem tais características, considerando-se conexões perdidas do milho original correlacionadas com alelos derivados do *Tripsacum* sp., e, pelo fato de que os mesmos alelos tenham sido herdados na segunda geração do cruzamento entre o *Tripsacum* sp. e o teosinte, para Eubanks (1997), isso reforça a hipótese de que a hibridação entre o teosinte e o *Tripsacum* sp. desempenhou função crucial na evolução do milho.

Outro estudo, fundamentado na presença de “knob” heterocromático em *Tripsacum dactyloides* ($2n=36$) e milho, foi verificada a mesma repetição com 180 pares de base, constatando-se que o grande “knob” em milho é localizado, principalmente, na região intersticial do cromossomo e ambos os “knob” terminais e intersticiais foram observados no cromossomo do *Zea diploperennis* (teosinte $2n=20$). Contudo, com a continuidade desse estudo, advertem os autores, o mapeamento cromossômico do “knob” em espécies de *Zea* e *Tripsacum* sp. poderá revelar o impacto da perda do seu terminal na evolução do cariótipo do milho e do *Tripsacum* sp. (Koo e Jiang, 2008)

Estudo comparando a presença do alelo *Adh2* em amostras de milho, com 4.700 anos de existência, com o milho contemporâneo, teosinte e *Tripsacum*

sp. possibilitou inferir que o teosinte está mais relacionado com o milho do que com o *Tripsacum* sp. (Goloubinoff *et al.*, 1993), corroborando os resultados obtidos por Beadle, em 1939.

Os retroelementos (elementos móveis situados na região LTR – “long terminal repeat”) possibilitam verificar a variação destes elementos entre *Zea* e *Tripsacum* sp., podendo ser usados para distinguir diferentes genomas, citologicamente. A estimativa, por “dot blot” (técnica de hibridização, utilizada para detectar biomoléculas), do retroelemento “Huck” em *T. dactyloides*, *Z. diploperennis*, *Z. mays* e *Z. luxurians* revelaram diferenças significativas em número de cópias entre as espécies. “Huck” tinha expandido no genoma do progenitor, mas, após a separação entre *Zea* e *Tripsacum* sp., ele cessou a expansão na linhagem do *Tripsacum* sp. Já na linhagem *Zea*, o retroelemento “Huck” continuou a expandir-se no número de cópias; mas, na linha que levou a *Z. diploperennis*, a expansão foi interrompida ou reduzida; enquanto, nas linhagens que levaram a *Z. mays* e *Z. luxurians*, continuou a retrotransposição. A diferença entre *Z. luxurians* e *Z. mays* deve ter aparecido rapidamente, uma vez que somente cerca de 0,7 milhões de anos separam essas duas espécies. (Lamb e Birchler, 2006)

Na análise da diversidade genética e evolução do gene PSY1 (“phytoene synthase 1”), a árvore filogenética, baseada em sequência do comprimento total de PSY1, relacionou a proximidade de *Zea* com a *Tripsacum* sp. De acordo com o dendrograma, as espécies de teosinte *Zea mays* ssp. e *Zea diploperennis* estão mais relacionadas com o milho do que o *Tripsacum* sp., no entanto, o *Tripsacum* sp. está mais relacionado ao milho do que ao teosinte *Zea luxuriantes*. (Fu *et al.*, 2009)

3.2.2. Relatos sobre a relação entre o Milho e o Teosinte

A teoria de que o teosinte era o único progenitor do milho é conhecida como “hipótese do teosinte”. Como propalado por Beadle, em publicações do período de 1939 a 1980, relatou-se que: (a) o teosinte proporcionou uma boa fonte alimentar, e antigos povos o cultivaram para este fim; (b) durante o cultivo do teosinte, mutações que o melhoraram serviram para a utilidade dos seres humanos, que eram selecionados; (c) no mínimo cinco grandes mutações

poderiam ser suficientes para converter o teosinte em uma forma primitiva de milho; (d) diferentes mutações controlaram diferentes características; e (e) ao longo do tempo, humanos selecionaram grandes mutações adicionais positivas bem como menores mutações. (Doebley, 2004)

O milho e o teosinte apresentam extremas diferenças na morfologia da planta adulta, tanto é que os taxonomistas, inicialmente, consideraram o teosinte mais relacionado com o arroz do que com o milho. Porém, segmentos do genoma do teosinte diploide e do milho são similares, podendo ser facilmente cruzados, apresentando o mesmo número de cromossomos (com exceção, do teosinte tetraploide) ou morfologia similar dos cromossomos. Híbridos F₁, entre milho e alguns tipos de teosinte, exibem meiose completamente normal e completa fertilidade (Doebley, 2004), além de o cruzamento entre teosinte e milho poder ocorrer naturalmente (Almeida, 2003). A explicação para tanto, pode estar nos relatos de Doebley (2004) que, por meio de um artigo de revisão, afirmou que *Zea luxurians* (teosinte) possui cromossomos que são citologicamente distintos do milho. E, em contraste, outro teosinte, o *Zea mays ssp. mexicana*, possui cromossomos que são citologicamente similares aos do milho. Assim, a habilidade do cruzamento do milho e do teosinte, com produção de progênies férteis, pode ocorrer mais facilmente com *Zea mays ssp. mexicana*.

Diversos trabalhos, recentemente, procuram evidências que diferenciam o milho e a teosinte. John Doebley é um dos autores com maior expressão no estudo da evolução do milho, na busca da identificação de possíveis locos cujos alelos mutantes deram origem ao milho. Conforme estudado por Doebley e Stec (1993), comparando a diferença morfológica entre o milho e o teosinte, baseando-se em mapeamento de QTL (“quantitative trait loci”), foram encontradas cinco regiões nos genomas (milho x *Zea mexicana* e milho x *Zea parviglumis*) que controlam a maior parte das principais diferenças morfológicas. Tais estudos sugerem que locos com grandes efeitos sobre a morfologia não podem ser consideradas condicionantes específicos da evolução das culturas, mas sim, um fenômeno comum na evolução das plantas, sempre que uma espécie invade um novo nicho com concorrência reduzida.

Doebley (2004), em estudo com mapeamento de QTL nos dez cromossomos do milho e do teosinte, observou cinco (ou seis) regiões do genoma com forte efeito em características fenotípicas. Assim, foram confirmadas as observações anteriores, de que a herança das diferenças entre o milho e o teosinte era governada por poucos genes maiores ou por poucos blocos de vários

genes ligados, mas um maior número de locos de pequeno efeito. Como exemplo, cita-se uma determinada região do braço do cromossomo *1L* que está fortemente associada com as diferenças na arquitetura da planta.

Wang *et al.* (1999), utilizando o gene *tb1* (“teosinte branched 1”), avaliaram a possibilidade de ter havido seleção para este alelo durante a domesticação do milho. Quando os genes estão envolvidos na evolução da planta exibem menor taxa de polimorfismo e reúnem-se em um único grupo. Esse grupo, no milho, conteve a região 5'-flanqueadora, responsável pela regulação do *tb1*, com apenas 3% da diversidade encontrada no teosinte. Além disso, a filogenia, obtida com a análise de regiões regulatórias de *tb1*, exibiu um único grupo com poucas variações entre as regiões genômicas estudadas. Por conseguinte, a expressão do gene *tb1* foi alvo de seleção, tendo esse gene participado ativamente da evolução do milho a partir do teosinte. (Matsuoka *et al.*, 2002; Laborda, 2003) Estudos desenvolvidos por Clark *et al.* (2006), baseando-se também no gene *tb1*, permitiram constatar que esse gene estava presente em população atual de teosinte (*Zea mays parviglumis* e *mexicana*), isto é, em população após o processo de domesticação e cultivo.

Mais recentemente, Vigouroux *et al.* (2005) realizaram a análise genômica por marcadores microssatélites de acessos de milho – 45 raças silvestres pré-colombianas, além de três espécies anuais de teosinte (uma planta de *Z. mays* spp. *huehuetenangensis*, 23 plantas de *Z. mays* spp. *mexicana* e 21 plantas de *Z. mays* spp. *parviglumis*). Os resultados revelaram uma pequena diversidade genética entre os genomas das raças do milho e de espécies de teosinte. Nesse aspecto, quando os autores separaram os dados dos marcadores SSR, de acordo com o comprimento da sequência repetida “motif” em dinucleotídeos, constataram um pequeno decréscimo relativo à diversidade entre as raças de milho e o teosinte. E ainda que esse decréscimo foi menor em relação às sequências com mais de dois nucleotídeos, sugerindo que as taxas de mutação com efeitos maiores foram parcialmente minoradas pelo próprio processo de domesticação.

De todo modo, no sentido *lato*, Goodman (1980) e Wang *et al.* (1999) preconizaram que o teosinte, presente no centro de origem e diversidade, no México, sofreu, de alguma forma, a introgressão gênica do milho. E, em decorrência, o milho não representa fielmente o teosinte em trabalhos de genética

e taxonomia; além disso, da mesma forma, algumas raças de milho podem ter sofrido essa introgressão pelo teosinte.

3.2.2.1. Subespécie parental do Milho

É consabido que existe um debate entre pesquisadores sobre qual teria sido o teosinte ancestral do milho. (Freitas, 2001; Matsuoka *et al.* 2002; Doebley, 2004; Lamb e Birchler, 2006; Fu *et al.*, 2009) Nesse aspecto, estudos recentes comprovam que a subespécie do teosinte mais próxima ao milho é *Z. mays parviglumis*, como revelam os resultados das pesquisas a seguir referenciadas.

Meyers *et al.* (2001) verificaram que, em *Zea diploperennis*, muitas famílias de retroelementos são menos abundantes do que no milho, sugerindo que esta espécie cessou a expansão de retroelementos após a divergência com outras espécies de *Zea*.

Fu *et al.* (2009), ao analisarem a diversidade genética e a evolução do gene PSY1 (“phytoene synthase 1”), verificaram que as espécies de teosinte, *Zea mays huehuetenangensis*, *Zea mays mexicana*, *Zea mays parviglumis* e *Zea diploperennis*, estão mais relacionadas com o milho, enquanto as espécies *Zea luxuriantes* estão mais distantes do milho e ainda apresentam-se como ancestral do *Tripsacum* sp.

Evidências da relação genética entre o DNA ribossomal de milho ancestral e de *Zea mays parviglumis* foram constatadas por Buckler e Holtsford (1996), sendo relevantes para consubstanciar que *Zea mays parviglumis* foi o progenitor do milho. De acordo com dados de Freitas (2001), fundamentado em investigações genéticas e evolutivas por meio do uso da técnica de microssatélites, pôde-se notar que, enquanto a subespécie *Z. mays parviglumis* possui o microssatélite do tipo complexo GA₄TA, presente em muitas amostras do milho; a subespécie *Z. mays mexicana* conteve um outro alelo desse mesmo complexo, o GA₉TA, encontrado em qualquer outra amostra de milho. Baseando-se neste fato, o autor relatou que a subespécie com maior chance de ser o ancestral direto do milho é *Z. mays parviglumis*.

Análises por marcadores moleculares não têm sido incomuns como ferramentas para auxiliar a desvelar a origem do milho. Doebley *et al.* (1984) trabalharam com isoenzimas em populações de milho e teosinte e obtiveram,

como resultado, que a frequência de alelos isoenzimáticos das espécies de teosinte, *Z. luxurians*, *Z. diploperennis* e *Z. perennis*, é diferenciada do milho, enquanto a frequência de alelos do *Z. mays* ssp. *mexicana* é mais próxima. A frequência alélica de outro teosinte anual, o *Z. mays* ssp. *parviglumis*, é indistinguível do milho, denotando que este teosinte é mais geneticamente próximo ao milho e o provável ancestral deste.

Em outra pesquisa, desenvolvida por Matsuoka *et al.* (2002), utilizando microssatélites e algumas evidências arqueológicas (utilizando fósseis de milho), quantificou-se a diversidade entre o milho e o teosinte, cujos resultados permitiram deduzir que o milho e *Z. mays parviglumis* divergiram em 9.000 anos, e que o milho derivou de *Z. mays parviglumis*, por meio de um único evento de domesticação. Após o evento inicial, pode ter ocorrido a introgressão gênica de outros tipos de teosinte, contribuindo para o conjunto gênico de milho, constituindo, assim, uma possível explicação para a diversidade do milho.

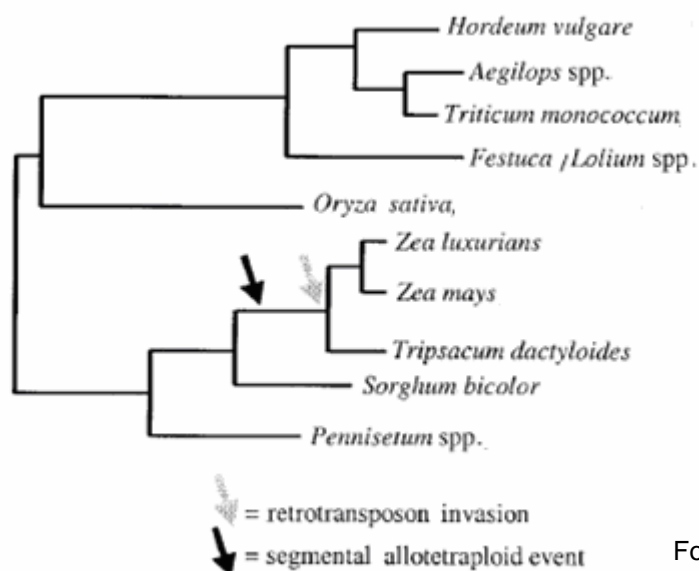
A subespécie *Z. mays mexicana* está presente em regiões com altitudes que variam entre 1.800 e 2.500 m de altura, ocupando as planícies e vales das regiões central e do norte do México. A pluviosidade dessas regiões varia entre 500 a 1.000 mm de chuva anual, tendo ainda uma temperatura média anual entre 15 e 20 °C. (Freitas, 2001) No entanto, a subespécie *Z. mays parviglumis* é de ocorrência em altitudes que variam entre 400 a 1.700 m, ocupando principalmente os topos dos morros nos vales dos rios, nas regiões oeste e sul do México, onde a precipitação anual é na ordem de 1.250 a 2.000 mm de chuva, com a temperatura média anual entre 20 e 25 °C. (Freitas, 2001; Doebley, 2004)

Conforme relatos de diversos autores (Doebley *et al.* 1984; Buckler e Holtsford, 1996; Freitas, 2001; Matsuoka *et al.* 2002), *Z. mays parviglumis*, mesmo sendo a subespécie mais relacionada com o milho, não pode ser excluída a possibilidade de introgressão de seus genes provenientes de outros tipos de teosinte e de milho, visto que as informações sobre as características do *habitat* destas subespécies possibilitam inferir sobre a capacidade do milho na adaptação a ambientes distintos, fornecendo indícios do grau de influência de cada subespécie de teosinte na origem das diferentes raças de milho. (Freitas, 2001)

3.3. Origem e hipóteses da domesticação do Milho

Durante anos, acreditou-se que o milho era uma cultura diploide, evoluído por meio de seleção e recombinação de genótipos ancestrais. (Beadle, 1978; Galinat, 1979; Goodman, 1980) No entanto, atualmente, existem evidências de que o milho possui origem alotetraploide ($2n=4x=20$). (Gaut *et al.*, 2000; Tenailon *et al.*, 2004)

O milho resultou de uma complexa evolução genômica depois do evento de poliploidização. (Koo e Jiang, 2008) O genoma do milho é repleto de duplicações cromossômicas e DNA repetitivo. A maioria do DNA nuclear repetitivo no milho são elementos de “retrotransposons”, que incluem cerca de 50% do genoma. (Gaut *et al.*, 2000) As duplicações resultaram de um antigo evento de poliploidia, há mais de 11 milhões de anos. A partir da união de dois genomas divergentes (poliploidização), a cerca de 4,8 milhões de anos, houve, além de rearranjos, perda genética, divergências e outras modificações, que conduziram ao atual genoma do milho diploidizado. (Lamb e Birchler, 2006) Com base em dados na sequência do DNA, o evento de poliploidia teria ocorrido após a divergência entre o milho e o sorgo (Figura 3).



Fonte: Gaut *et al.* (2000)

Figura 3 – Filogenia das espécies de gramíneas diploide.

O trabalho desenvolvido por Pereira *et al.* (1994), a partir de uma população F_2 , derivada do cruzamento entre duas subespécies de sorgo, foi

construído um mapa de ligação com RFLP. Sondas genômicas do milho e do sorgo, e sondas de cDNA do milho foram utilizadas para definir os três locos. Comparando os mapas do sorgo e do milho, os pesquisadores puderam verificar grande relação entre os dois genomas, em termos de ordem dos locos e da distância genética. E muitos locos ligados à cultura do milho também foram ligados ao sorgo, denotando sintonia entre as espécies estudadas.

Embora estudos arqueológicos e citogenéticos já tenham demonstrado algumas evidências, o provável antecessor do milho não é certamente conhecido. Sabe-se que o mais velho sabugo de milho foi encontrado na década de 50, em Tehuacán, México (centro de origem e diversidade do milho), e datado com aproximadamente 7.000 anos (Galinat, 1979; Engels *et al.*, 2006). Em escavações arqueológicas realizadas no México, em cavernas rochosas com 50 m de profundidade, foram encontrados grãos de milho e pedaços de maçarocas com mais de 5.000 anos (a.C.), bem como nas catacumbas dos Incas. (Oliveira, 1984)

Quanto à espiga de Tehuacán, o que intriga os pesquisadores é que não se sabe se a coleta ocorreu em uma produção de milho e, mesmo que tenha sido, se a população era domesticada ou derivada de um parente do teosinte, introduzido naquela época. Além disso, com a ajuda do homem, estas sementes podem ter sido dispersas, aproximando espécies cultivadas do ancestral, promovendo, assim, o cruzamento entre conjuntos gênicos distintos. (Galinat, 1979; Iltis, 1983)

Como o teosinte é uma espécie silvestre, e o milho conhecido é uma espécie cultivada, a interpretação mais relevante é que o milho tenha sido domesticado do teosinte. (Wang *et al.*, 1999; Matsuoka *et al.*, 2002; Doebley, 2004; Vigouroux *et al.*, 2005)

Contudo, outro ponto que se pode salientar é quanto ao surgimento efetivo da cultura do milho, indagando-se a forma que ocorreu esse isolamento e se foi decorrente da especiação. No intento de responder esta indagação, muitos pesquisadores relatam a existência de domesticação e também do “efeito gargalo”.

Segundo Doebley (2004), a domesticação é uma porção de um conjunto gênico de espécie silvestre, utilizada para “criar” uma nova espécie. O tamanho da população, durante a domesticação, poderia causar uma redução na diversidade genética na cultura relativa ao genitor. Para o milho, resultados

isoenzimáticos indicam uma perda de aproximadamente 25% de genes encontrados em *Z. mays parviglumis*.

Ittis (1983), tomando por base o conceito Darwiniano de mudança gradual no surgimento de novas espécies, e diante da escassa evidência arqueológica dos intermediários entre o teosinte e o milho, sugeriu que teria havido uma transmutação sexual no teosinte. E este evento teria transformado a inflorescência masculina do teosinte na inflorescência feminina do milho, por ocasião de uma mudança súbita no ambiente. Essa alteração, conseqüentemente, teria sido fixada e a planta domesticada.

De acordo com Weber *et al.* (2007), fundamentando-se em estudos de marcadores em nove genes regulatórios, em relação a 13 características da planta e arquitetura da inflorescência, verificaram a significância em dez associações envolvendo cinco genes “candidatos”. Sugeriram, então, que os principais genes reguladores no milho desempenham função na variação natural, para traços complexos no teosinte, e que algumas das menores variações podem ter sido alvo de seleção durante a domesticação.

Continuando os trabalhos, Weber *et al.* (2008), baseando-se na associação por marcadores em genes “candidatos” (genes selecionados ao estudo), para associação com características de uma população, constataram 33 associações significativas dos marcadores a partir de 15 genes “candidatos” e de dez características. Esta análise indicou que havia novas causas na relação entre genes específicos e variação nas características do teosinte. Por exemplo, dois genes do teosinte – ramosa (*ra1* e *ra2*) - parecem estar associados com a estrutura da espiga, tanto no teosinte quanto no milho; além disso, o gene MADS-box (*zag11*), típico do teosinte, está mais relacionado com a ruptura da espiga, que é uma característica-chave na domesticação do milho.

Segundo Hilton e Gaut (1998), com base em análise das sequências genéticas do gene de *glb1* (gene da proteína GLB1, abundante no embrião do milho) de quatro táxons (*Z. mays ssp. mays*, *Z. parviglumis*, *Z. luxurians* e *Tripsacum dactyloides*), preconizaram que a domesticação do milho foi um acontecimento recente que poderia ter sido baseado em um número pequeno de indivíduos fundadores; ademais, conforme os autores, o milho reteve uma proporção substancial da variação genética por meio dos genitores, todavia, divergiram em relação à morfologia.

Uma possibilidade para explicar a proximidade da relação do milho com o teosinte baseia-se na ocorrência de fluxo constante de alelos do teosinte para o milho, por meio de polinização cruzada, com a introgressão antes da introdução das raças de milho na América do Sul, e também no caso das amostras peruanas com tempo inferior a 4.700 anos. Fatos estes que levam à conclusão de que as significativas contribuições do teosinte foram relevantes nos primórdios da origem do milho. (Goloubinoff *et al.*, 1993)

A evolução do milho demandou aumento na expressão do gene *tb1* no ramo auxiliar primário e em suas inflorescências terminais para formarem espiga curta, em vez de alongada. A primeira comparação entre alelos de teosinte e milho para níveis de *tb1* indicou que o alelo, no milho, é expresso duas vezes mais que no ramo auxiliar imaturo e na inflorescência primária do teosinte. A segunda comparação foi por hibridização *in situ* no teosinte a qual não revelou homologia do gene *tb1* nas gemas auxiliares, onde há forte expressão no milho. A terceira é que não há diferença fixa de aminoácido entre o milho e o teosinte, sugerindo que a mudança na função da proteína *tb1* não ocorreu durante o processo evolutivo. Se a função da proteína não mudou, então é mais provável que a mudança na expressão esteja envolvida. Contudo, por meio de análise de QTL no braço longo do cromossomo 3, revelou-se elevado efeito epistático na expressão do gene *tb1*, tal como as plantas que transportam o alelo do teosinte, neste segundo QTL - níveis de *tb1* reduzido. Deste modo, sugere-se que a modificação na expressão do *tb1* foi um importante alvo de seleção durante a domesticação do milho (Doebley, 2004).

No entanto, outros autores relatam que o milho é resultado de uma mistura gênica de várias populações ancestrais, como é o caso do estudo desenvolvido por Dennis *et al.* (1985), Goloubinoff *et al.* (1993), dentre outros. Goloubinoff *et al.* (1993), ao investigarem um segmento do gene nuclear que codifica a enzima álcool desidrogenase 2 (*Adh2*), mediante amplificação e sequenciamento de excertos de espécies arqueológicas de milho de 4.700 anos e de amostras contemporâneas, verificaram que a diversidade da sequência em milho antigo é igual ao do milho contemporâneo. Alguns antigos alelos *Adh2* são idênticos ou estreitamente relacionados com os alelos contemporâneos. Com este estudo, puderam sugerir que a mistura gênica do milho ocorreu há milhões de

anos atrás e que raças domésticas de milho derivam de várias populações ancestrais silvestres.

Outros autores, contudo, consideram um “efeito gargalo” na evolução do milho. A esse respeito, em termos de arquitetura da planta, o milho e o teosinte, embora diferentes na variação interespecífica, tal variação não é maior do que a variação existente dentro de *Zea mays*, o que implica a ocorrência de substancial divergência entre as duas espécies (Doebley, 1990; Vigouroux *et al.*, 2005). Acredita-se que a diferença fenotípica possa ser explicada por um efeito fundador na evolução do milho, resultante de um efeito tipo “gargalo”, ou “bottleneck”, seguido de intensa seleção artificial. (Tanksley e McCouch, 1997; Eyre-Walker *et al.*, 1998)

Estima-se que tal evento tenha persistido por 400 a 2.000 anos e o tamanho da população durante o “efeito gargalo” possa ter ocorrido com um quantitativo de 500 a 4.000 indivíduos. Esta estimativa sobre o tamanho da população sugere que a fase inicial da domesticação do milho possa ter envolvido pequena comunidade humana dentro de uma área geográfica restrita. (Eyre-Walker *et al.*, 1998; Wang, 1999; Doebley, 2004)

3.3.1. Origem do Milho Pipoca

De acordo com Zinsly e Machado (1980), alguns autores mencionam que o milho mais antigo é o milho pipoca, visto que, em certas tumbas peruanas pré-históricas, havia utensílios de barro supostamente utilizados para o preparo de pipoca junto com sementes do milho pipoca. Além disso, a mais remota descoberta de milho foi do tipo pipoca, identificado em “Bat Cave”, Novo México, com data estimada em 2.500 a.C.

Quanto ao milho comum tipo dentado, as descrições mais antigas datam de 1.700 a.C., nos Estados Unidos da América. Estudos arqueológicos indicam que o milho dentado desta região é recente, apesar de ter sido encontrado tipo dentado na parte Central e Oeste dos Estados Unidos da América. (Goodman, 1980; Wang *et al.*, 1999)

A principal característica do milho pipoca que o diferencia de outros tipos de milho (dentado e duro) é apresentar sementes duras e pequenas que, sob a ação do calor, estouram, dando origem à pipoca. Tem-se conhecimento de que o grão duro pode estourar também, mas em menor expansão, quando comparado

ao milho pipoca, além de não apresentar, em nível desejado, a maciez e o sabor. (Goodman, 1980)

Em 1949, Erwin sugeriu que o milho pipoca poderia ter sido originado de mutação do milho comum tipo duro, mas o próprio autor afirmou também que essa hipótese poderia não estar absolutamente correta, uma vez que estudos arqueológicos revelaram evidências contrárias, tendo o milho pipoca como o tipo mais antigo dentre os milhos ancestrais (Goodman, 1980).

Segundo Eberhart (1979), a variedade do milho pipoca provém do milho tipo duro, no que concordam Zinsly e Machado (1980). Também na concepção de Kantety *et al.* (1995), o milho pipoca adveio do milho comum do tipo duro. Para tanto, utilizaram como ferramenta os marcadores moleculares ISSR, que revelaram maior proximidade genética entre essas formas de milho em relação ao tipo dentado.

3.4. Abordagens econômicas do Milho Comum e Milho Pipoca

A área cultivada de milho, na safra de 2008/09, foi estimada em 9,4 e 9,6 milhões de hectares, indicando uma redução de 2,6% a 2,8% em comparação com a safra de 2007/08. Isso ocorreu pelo preço do milho no mercado, diante dos elevados custos de produção. (Conab, 2009) O principal estado brasileiro produtor de milho é o Paraná, seguido por Minas Gerais. Quanto à extensão de área plantada, o estado que se destaca é Rio Grande do Sul. Na Tabela 2, pode-se verificar a oferta e demanda do milho no Brasil.

Tabela 2 – Oferta e demanda do Milho no Brasil (em mil toneladas), para o período de janeiro a dezembro de 1999 a 2008 e janeiro de 2009.

Safra	Produção	Importação	Consumo	Exportação
1999/00	31.640,90	1.770,50	34.480,00	6,70
2000/01	42.289,30	624,00	36.135,50	5.629,00
2001/02	35.280,70	345,00	36.410,00	2.747,00
2002/03	47.410,90	800,60	37.300,00	3.566,20
2003/04	42.128,50	330,50	38.180,00	5.030,90
2004/05	35.006,70	597,00	39.200,00	1.070,00
2005/06	42.514,90	956,00	37.100,00	3.938,00
2006/07	51.369,90	1.095,50	40.500,00	10.933,50
2007/08	58.609,80	500,00	44.500,00	7.500,00
2008/09	55.503,60	300,00	46.725,00	10.000,00

Fonte: Conab, 2009

O Brasil, a partir da década de 90, tem revelado um cenário de progresso paulatino no abastecimento de milho pipoca, embora este resultado possa ser creditado restritamente aos trabalhos de melhoramento no país, vez que raros foram os lançamentos de materiais melhorados por programas desenvolvidos no Brasil. Podem ser citados somente: IAC-112, híbrido simples modificado, que atende a uma parceria com a empresa Hikari; IAC-125, um híbrido triplo derivado IAC-112, registrado em abril de 2006; as variedades de polinização aberta BRS Angela, obtida de seleções recorrentes no composto CMS-43, tendo, como inconveniente, a cor branca dos grãos; RS 20, desenvolvida pela IPAGRO e comercializada pela AGROESTE-SC; UFVM2 Barão de Viçosa, do programa de melhoramento de milho pipoca do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV); Zélia e Jade, híbridos triplos melhorados, desenvolvidos pela Pioneer Hi-bred. (Pacheco *et al.*, 2000; Sawazaki, 2001; Scapim *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2008; Rangel *et al.*, 2007; Cruz e Pereira Filho, 2008)

Já em 1995, Sawazaki propalou que, no Brasil, como o milho pipoca não recebeu a mesma atenção dada ao milho comum, resultou em pouco progresso em seu melhoramento, relacionando esse fato ao limitado número de instituições e melhoristas envolvidos nesta cultura. De fato, na safra 2002/2003, de 206 cultivares de milho disponíveis no mercado, apenas dois foram de milho pipoca, a saber: RS 20 e Zélia. Na safra de 2008/2009, dos 302 cultivares disponíveis no mercado, apenas quatro foram do tipo pipoca, quais sejam: IAC-112, IAC-125, RS 20 e UFVM2 Barão de Viçosa. (Cruz e Pereira Filho, 2008; Conab, 2009) A Pioneer (2009), uma das empresas que fornecem sementes híbridas de milho no Brasil, das 25 cultivares de milho que registrou, apenas dois são do tipo pipoca, Zélia e Jade.

Segundo dados informados por Freitas Júnior *et al.* (2009), na década de 90, o Brasil importava 75% da demanda de milho pipoca, sendo o consumo estimado em 80 mil toneladas. Em 2003, o consumo era de 65 a 70 mil toneladas, e as importações, em 30%. Já, em 2004/2005, houve uma nova redução na importação para cerca de 20 mil toneladas (em que parte se deve ao consumo do híbrido simples modificado IAC-112).

Lamentavelmente, a redução na importação é decorrente, em larga medida, do cultivo de híbridos norte-americanos aqui registrados, e utilizados por empresas empacotadoras, como a Yoki Alimentos S.A., que estabelece acesso

restrito de uso com os produtores parceiros da empresa. Como exemplares desses híbridos, têm-se: P608, P608 HT, P618, P621 e P625. (Sawazaki, 2001; Sawazaki *et al.*, 2003; Freitas Júnior *et al.*, 2006) Para a safra 2005/2006, o híbrido triplo Jade, comercializado pela Pioneer, foi mais uma destas opções para o mercado de sementes do Brasil. (Cruz e Pereira Filho, 2008; Rangel *et al.*, 2008)

Essa parceria entre produtores e empresas empacotadoras tem crescido no país. A empresa escolhe a região onde será plantado o material, disponibiliza sementes e tecnologia aos produtores, aumentando, assim, a produtividade e reduzindo os custos de produção. Na safra de 2003, por exemplo, foram colhidas de 50 a 60 sacas por hectare (pelos melhores produtores), e a empresa pagou R\$ 55,00 por saca, com custo de produção de R\$ 800,00 ha⁻¹. (Santos *et al.*, 2007)

Segundo Ramon (2009), de acordo com a CEASA-Campinas (2009), no primeiro trimestre de 2009, o milho pipoca nacional estava cotado a R\$ 2,10/kg, correspondendo a R\$ 63,00 a saca de 30 kg; e o milho pipoca importado, a R\$ 2,40/kg, correspondendo a R\$ 60,00 a saca de 25 kg. Comparativamente, a saca de milho comum (60 kg) era comercializada a R\$ 30,00.

Na concepção de Machado (1997), a possibilidade de total mecanização e a ausência de controle de preço pelo governo, faz com que o valor comercial do milho pipoca seja, no mínimo, três vezes superior ao do milho comum.

3.5. Melhoramento Genético de Milho: focalizando o Milho Pipoca

Para Paterniani e Campos (2005), o melhoramento do milho é definido como o conjunto de medidas visando à melhoria quantitativa e qualitativa da produção, incluindo a duração do ciclo vegetativo e a resistência a pragas e doenças. Na concepção de Barth Pinto (2009), o melhoramento de plantas pode ser conceituado como a arte ou ciência que foca a obtenção de genótipos superiores sob determinadas condições ecológicas. Trabalhar no melhoramento de espécies de fecundação cruzada significa alterar as frequências gênicas de uma população, objetivando o aumento do percentual de alelos favoráveis e a redução de alelos indesejáveis. (Souza Junior, 1987; Hallauer e Miranda Filho, 1988)

Conforme publicado no Guia do Milho (2008), o primeiro esquema de milho híbrido foi criado pelo norte-americano, biólogo e geneticista George Harrison Shull, em 1909, que, após efetuar autofecundações, foram produzidos descendentes menos vigorosos e, à medida que se repetia o processo, fixavam-se algumas características, até serem obtidas as denominadas de linhas puras. Ao cruzar duas linhas puras diferentes, foi gerado descendente com grande vigor híbrido, explorando a heterose e dando origem ao milho híbrido.

Segundo informações de Santacruz-Varela *et al.* (2004), o primeiro híbrido comercial de milho pipoca foi obtido em 1934, em Minnesota, como resultado do cruzamento entre duas linhas puras derivadas do grupo heterótico *Japanese Hulless*. A partir de 1940, as variedades começaram a ser substituídas pelos híbridos.

O melhoramento do milho pipoca no Brasil não é recente. Iniciou-se em 1932, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), e já, em 1941, ocorreu o lançamento da primeira variedade nacional, proveniente de ciclos de seleção massal na população-base “South American Mushroom” (SAM), utilizada nos E.U.A. e derivada de “South American”, procedente da América do Sul. Porém, os trabalhos no país só foram retomados no início dos anos 80, com o lançamento do híbrido simples modificado IAC-112, em 1988, oriundo da combinação de linhagens da variedade SAM com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani x UFV Amarelo. (Sawazaki *et al.*, 2000; Sawazaki, 2001)

Pacheco *et al.* (2000), avaliando o efeito econômico na substituição da primeira variedade nacional por milho híbrido, na região central do Brasil, verificaram que o híbrido tem melhor desempenho do que a variedade, dependendo do ambiente, em relação à produção. Os piores híbridos, nos piores ambientes, responderam pior do que as piores variedades, porém o melhor híbrido simples, no melhor ambiente, superou a melhor variedade, com um lucro de R\$ 466,67 ha⁻¹. Na média dos híbridos e variedades, os híbridos simples foram mais produtivos, independentemente do ambiente. Isso ratifica que as variedades não são adequadas apenas em condições de alta tecnologia.

Para desenvolver um híbrido, é necessário obter as linhagens mediante sucessivas autofecundações, seja de um composto, uma população não melhorada ou mesmo de um híbrido. Após, em média, seis autofecundações, obtém-se uma nova linhagem, em que os indivíduos são uniformes com

características fixadas dentro da linha. A seguir, essas linhagens são cruzadas em diversas combinações e os híbridos superiores podem ser lançados como produto comercial. (Borém e Miranda, 2005) Os cruzamentos entre linhagens de diferentes grupos gênicos são preferidos, uma vez que, em geral, produzem híbridos superiores do que entre linhagens do mesmo grupo heterótico. (Hallauer e Miranda Filho, 1988; Paterniani e Campos, 2005; Ortiz *et al.*, 2008)

De modo geral, o melhoramento de espécies alógamas pode ser procedido, basicamente, de duas formas: gerando híbrido superior às populações originais ou obtendo-se populações para seleção. As populações de milho focadas no programa de melhoramento intrapopulacional são as que possuem alta média e ampla variabilidade genética quanto às características de interesse e, nesse aspecto, a análise de divergência genética objetiva a identificação das populações contendo indivíduos dissimilares. (Moll *et al.*, 1965; Vencovsky e Barriga, 1992; Hallauer e Miranda Filho, 1988; Miranda *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Aguiar *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008)

Conforme descrito por Sawazaki (1995), todos os métodos de melhoramento utilizados para o milho comum são aplicáveis ao milho pipoca; devendo levar em consideração o produto final e a expansão da pipoca. O método populacional que tem sido mais comum no melhoramento do milho pipoca no Brasil é a seleção recorrente intrapopulacional utilizando avaliação entre e dentro de famílias de meios-irmãos. (Pacheco *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2008; Barth Pinto, 2009) Porém, a utilização de procedimentos com controle parental, como a seleção entre famílias de irmãos completos, proporciona ganhos superiores por explorar não apenas a aditividade, mas também os efeitos de dominância. (Hallauer e Miranda Filho, 1988; Pereira e Amaral Júnior, 2001) Mais recentemente, tem sido proposto o uso da seleção recorrente recíproca, tendo sido observado, por Faria *et al.* (2008), que progênies derivadas de irmãos completos das populações Viçosa e Beija-Flor, respectivamente, na geração $S_1 \times S_1$, produziram resultados superiores quando comparadas aos dos híbridos $S_0 \times S_0$.

No melhoramento do milho pipoca, o melhorista deve atentar-se para atender tanto as perspectivas do consumidor quanto as do produtor. Para o consumidor, as características mais importantes são: o rendimento da pipoca, o mínimo de “piruás”, uma pipoca macia (sem partes duras de pericarpo ou ponta

do grão), e com sabor agradável. Já para o produtor, as principais características são: elevada produção, mínimo de acamamento, bom empalhamento, boa característica dos grãos, dentre outras de interesse regionais. (Sawazaki, 1995; Miranda *et al.*, 2003)

No que se refere à obtenção de híbridos de linhagens em milho pipoca, o maior entrave é o próprio efeito endogâmico da cultura, que tem destacada depressão por endogamia. (Sawazaki, 1995; Simon *et al.*, 2004)

Simon *et al.* (2004), analisando a depressão por endogamia em populações de milho pipoca (CMS-42, CMS-43, Zélia, RS-20, Catedral, Zaeli, UEM-J1 e UEM-M2), verificaram que a depressão endogâmica para o rendimento de grãos foi maior no grupo dos compostos (CMS-42, CMS-43) em relação à das demais populações melhoradas e não melhoradas, e que a probabilidade de sucesso na obtenção de linhagens de alta capacidade de expansão foi baixa para todas as populações.

Dentre os maiores desafios no melhoramento de plantas, têm-se a seleção para as características poligênicas de importância agrônômica e sua interação com o ambiente. Atualmente, este desafio vem sendo superado com a introdução de marcadores moleculares, permitindo a análise do indivíduo com base no DNA. (Borém e Caixeta, 2006)

A capacidade de expansão (CE) tem sido referenciada como fortemente influenciada pelo ambiente, contribuindo para a suposição da herança quantitativa, conforme sugerido por Bruson (1937). Outros autores, como Alexander e Creech (1977), concordam que a CE é uma característica de herança poligênica, porém sujeita à baixa interferência ambiental. Já, Larish e Brewbaker (1999) constataram que os genes com efeito de dominância preponderavam na expressão do rendimento de grãos e de seus componentes, e que havia proeminência da aditividade na expressão da capacidade de expansão, o que também foi constatado por Pereira e Amaral Júnior (2001), utilizando o delineamento I, de Comstock e Robinson (1948).

Apesar do paradoxo efeito e dominância para rendimento de grãos e da aditividade para a capacidade de expansão, é possível que híbridos de linhagens respondam vantajosamente para o rendimento e a qualidade dos grãos. Possivelmente, isso seja explicado pelo fato de que híbridos responsivos ao aumento da capacidade de expansão advenham do cruzamento entre linhagens

oriundas de populações divergentes, mas com baixas estimativas de depressão por endogamia para a capacidade de expansão e rendimento dos grãos. (Simon *et al.*, 2004; Scapim *et al.*, 2006) Assim, populações que apresentam maior frequência de alelos favoráveis para as características desejadas devem ser preferidas para a obtenção de linhagens que possam originar híbridos de bom desempenho agrônômico.

A capacidade de expansão é medida realizando a divisão do volume da pipoca (depois de expandida) pelo volume da semente de milho pipoca. Dessa forma, se a CE for dez, significa que o volume da semente, depois de estourada, produzirá dez volumes de pipoca. Quanto maior for o valor da capacidade de expansão maior será o valor comercial do cultivar, visto essa característica estar intimamente relacionada com a maciez da pipoca. (Zinsly e Machado, 1980; Sawazaki, 2001).

O mínimo que se espera de um cultivar, para ser aceito comercialmente, é que a CE esteja acima de 15 mL mL^{-1} , já que, abaixo deste índice, a pipoca é rígida e contém muitos grãos sem estourar, conhecidos como “piruás”. (Sawazaki, 1995; Matta e Viana, 2001; Miranda *et al.*, 2003) Segundo Matta e Viana (2001), uma população com CE menor que 28 mL.g^{-1} é considerada pobre, se estiver entre 28 e 30 mL.g^{-1} é boa; com valores entre 30 e 35 mL.g^{-1} , são consideradas muito boas; e acima de 35 mL.g^{-1} , excelentes.

Como exemplo de material melhorado, cita-se uma variedade de milho pipoca, a BRS Angela, selecionada pela Embrapa - Milho e Sorgo. Essa variedade apresenta alta produtividade de grãos, estabilidade de produção e bom ICE (índice de capacidade de expansão), no valor de 28 mL.g^{-1} . Todavia, possui o grão de cor branca, que não tem boa aceitação, comercialmente. (Embrapa Milho e Sorgo, 2009)

Outros exemplos a serem citados são: a) o híbrido Jade, desenvolvido pela Pioneer, que possui elevado potencial produtivo, capacidade de expansão igual a 28 mL.g^{-1} , maciez, boa sanidade e é bem aceito no mercado; e b) o híbrido Zélia, também desenvolvido pela Pioneer, que apresenta elevado potencial produtivo, capacidade de expansão igual a 35 mL.g^{-1} , maciez e alta aceitação no mercado. (Pioneer, 2009)

Em milho pipoca, a correlação negativa entre a produtividade de grãos e a capacidade de expansão (Brunson, 1937; Larish e Brewbaker, 1999; Daros *et al.*,

2004b; Scapim *et al.*, 2006) pode não ser prejudicial às perspectivas de ganho quando se usa o índice de seleção. Resultados satisfatórios têm sido obtidos com índices de seleção em programas de seleção recorrente, permitindo-se citar: Daros *et al.* (2002), Daros *et al.* (2004a), Santos *et al.* (2007) e Freitas Júnior *et al.* (2009).

Atualmente, as instituições brasileiras que mantêm programa de melhoramento de milho pipoca são: UENF, UFV, UFLA, UEM, UEL, UFRS, ESALQ e IAC, que visam à melhoria de materiais para o país e, conseqüentemente, à diminuição da dependência da importação dos E.U.A. e da Argentina. (Scapim *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2008; Rangel *et al.*, 2008; Freitas Júnior *et al.*, 2009)

3.5.1. Melhoramento de Milho Pipoca na UENF

O Programa iniciou-se com uma variedade de polinização aberta, UNB2U, originada de UNB2, após dois ciclos de seleção massal em Campos dos Goytacazes, RJ. A população UNB2 originou-se de seleção em um composto Indígena, que a ESALQ/USP, de Piracicaba/SP, doou à UNB, de Brasília, DF. Com isso, gerou-se a população UNB-1, que foi cruzada com a variedade de milho pipoca Americana, cujas progênies selecionadas foram cruzadas com uma variedade de milho pipoca de grãos amarelos e resistentes, a *Exserohilum turcicum*. Após dois ciclos de seleção massal, foi obtida uma população formada por plantas resistentes, com alta produção e com grãos amarelos. Tal população foi retrocruzada, por três vezes, com a variedade Americana, originando, assim, a população UNB2, de polinização aberta. (Pereira e Amaral Júnior, 2001)

Buscando uma melhor estratégia para o estabelecimento de um programa de melhoramento, no qual fossem maximizados os ganhos de milho pipoca na UENF, Pereira e Amaral Júnior (2001) avaliaram 92 famílias de irmãos completos e de meios-irmãos em dois ambientes contrastantes, evidenciando a existência de suficiente variabilidade genética para a capacidade de expansão e a produção de grãos. Segundo os autores, a herança para a capacidade de expansão foi aditiva e os maiores ganhos, para esta característica, seriam possíveis com o método de seleção recorrente intrapopulacional com famílias de irmãos completos.

Por conseguinte, Daros *et al.* (2004b) implementaram o 1º ciclo de seleção recorrente em UNB2U. Para tanto, foram avaliadas 75 famílias, em dois ambientes (Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ). Os resultados do ciclo C1 revelaram a possibilidade de progresso genético de 4,69%, para a produção de grãos, e 10,39%, para a capacidade de expansão.

Em continuidade ao programa, Daros *et al.* (2004b) implementaram o 2º ciclo (C2) de seleção recorrente, contudo, utilizando famílias endogâmicas (S_1), o qual revelou suficiente variabilidade genética a ser explorada em ciclos futuros, com perspectivas de ganhos de 26,95%, para a produção de grãos, e de 17,8%, para a capacidade de expansão.

Santos *et al.* (2007), trabalhando com famílias de meios-irmãos, obtidas a partir de UNB-2U C2, revelaram a possibilidade de progressos genéticos de 7,16%, para a capacidade de expansão, e de 10,00%, para a produção, além de ganhos negativos para espigas doentes e atacadas por pragas, e plantas acamadas e quebradas.

O 4º ciclo de seleção recorrente foi obtido por Freitas Júnior *et al.* (2009), que utilizaram o procedimento de seleção recorrente com famílias de irmãos completos, obtendo ganhos preditos para o rendimento de grãos e a capacidade de expansão, respectivamente, de 10,55% e 8,50%.

Rangel (2009), na condução do 5º ciclo de seleção recorrente, obteve média das famílias avaliadas com magnitude de 29,30 mL.g⁻¹ para a capacidade de expansão (CE), e de 2.920,93 kg.ha⁻¹ para o rendimento de grãos (RG), totalizando um ganho real de 4,83% e 7,34%, para CE e RG, respectivamente. Estes resultados ratificam o progresso genético da população UENFV-Explosiva de milho pipoca, como passou a ser denominada a partir do 5º ciclo de seleção recorrente intrapopulacional.

O 6º ciclo de seleção recorrente na população UNB-2U está sendo conduzido e há perspectivas de que a população UNB-2U (então designada UENFV-Explosiva) gere uma nova variedade de milho pipoca com alto potencial para uso em plantios comerciais nas regiões Norte e Noroeste Fluminense.

3.6. Divergência genética e grupos heteróticos

Há duas formas de se inferir sobre a diversidade genética, podendo ser de natureza quantitativa ou preditiva. (Cruz e Carneiro, 2008) Entre os métodos quantitativos, citam-se as análises dialélicas, em que são necessárias as avaliações dos genitores e das combinações híbridas. Os métodos preditivos da heterose são quantificados por medidas de dissimilaridades, que expressam o grau de divergência genética entre os genitores. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Cruz e Carneiro, 2008) Para a composição de grupos heteróticos, têm sido utilizadas técnicas biométricas multivariadas. (Birchler *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2004; Cruz, 2005; Pereira e Pereira, 2006; Aguiar *et al.*, 2008)

Quanto às variáveis quantitativas, as medidas de dissimilaridade comumente utilizadas são a Euclidiana e a de Mahalanobis. Uma crítica sobre a distância Euclidiana é que esta não leva em consideração as variâncias e covariâncias residuais que existem entre as características avaliadas. Quando há informações provenientes de ensaios experimentais, é utilizada a distância de Mahalanobis, em que é possível obter a matriz de dispersão residual. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Mingoti, 2007; Cruz e Carneiro, 2008)

Tratando-se de variáveis binárias, uma maneira de avaliar a diversidade genética é por meio de informações obtidas por dados moleculares, identificando presença e ausência de bandas, atribuindo o número 0 (zero), para ausência de banda e o número 1 (um), para presença de banda. Com base nesses valores, podem-se obter medidas de dissimilaridade, utilizando a distância binária de Sokal. Outras medidas de similaridade também podem ser utilizadas como: coeficiente de coincidência simples; coeficiente de Roger e Tanimoto; coeficiente de Sokal e Sneath; coeficiente de Russel e Rao; coeficiente de Jaccard; coeficiente de Sorenson ou Nei e Li; coeficiente de Ochiai; coeficiente de Baroni, Urbani e Buser; coeficiente de Haman; coeficiente de Yule; coeficiente de Ochiai II, dentre outros.

Apesar de existirem vários coeficientes, os mais utilizados são os de coincidência simples, o de Jaccard e o de Nei e Li. O índice de coincidência simples apresenta a desvantagem de considerar, como fator de similaridade, o número de coincidências de ausência da marca molecular (0-0). Para Jaccard, apenas a coincidência do tipo "1-1", é levada em consideração quanto a similaridade entre os acessos. O coeficiente de Nei e Li também tem esta proposição e, ao ser encontrado, deve ser ponderado por um peso mais elevado,

no caso, igual a 2 (dois). Desta forma, sugere-se que, ao se trabalhar com materiais exóticos ou envolvendo espécies diferentes, o adequado é utilizar o coeficiente de Nei e Li. No entanto, se o estudo for intraespecífico, recomenda-se o coeficiente de Jaccard. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Mingoti, 2007)

Mohammadi e Prasanna (2003), ao efetuarem uma revisão sobre a análise da diversidade genética em plantas, salientaram a importância da escolha apropriada para mensurar a distância genética. No caso de marcadores codominantes, esperam-se resultados satisfatórios com o uso do complemento aritmético da distância de Nei e Li; já para marcadores dominantes, as melhores expectativas recaem sobre o uso do complemento aritmético de Jaccard.

Quanto às variáveis multicategóricas, comumente obtidas no melhoramento em caracterizações de dados morfológicos, tem sido mais comum o uso da distância de Cole-Rodgers *et al.* (1997), com a flexibilidade de utilizá-la de forma ponderada. (Cruz *et al.*, 2004)

Na predição da diversidade genética, dentre os métodos multivariados que podem ser aplicados, os mais comuns são os métodos aglomerativos de Ward e UPGMA. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Crossa e Franco, 2004; Cruz *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2008) UPGMA fundamenta-se na composição de grupos com base na média de distância entre os genótipos, ao passo que Ward utiliza a soma de quadrados das distâncias entre pares de genótipos. (Cruz *et al.*, 2004)

O estudo da divergência genética, além da análise de agrupamento, pode ser feito por Análise de Escala Multidimensional, Componentes Principais e por Variáveis Canônicas. Em particular, a análise por Variáveis Canônicas objetiva a obtenção de um gráfico bidimensional, em que as duas primeiras variáveis reúnam um mínimo de 80% da variação total. Quando esse percentual não é atingido nas duas primeiras variáveis canônicas, pode-se recorrer à terceira e, dessa forma, gerar o gráfico tridimensional, considerando um mínimo de variação de 80% nas três primeiras Variáveis Canônicas. (Amaral Júnior *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2004; Sudré *et al.*, 2007)

Depois de concluir o agrupamento, é possível verificar a consistência. Para um método de otimização, como o de Tocher, deve ser utilizada a análise discriminante, podendo ser a metodologia que foi proposta por Anderson (1984). Para os métodos hierárquicos, a consistência do agrupamento é verificada depois

de obtido o dendrograma, em que se tem uma nova leitura da dissimilaridade ou da similaridade entre os genótipos. Os coeficientes de semelhança são estabelecidos, de acordo com o método de agrupamento utilizado, e podem ser empregados na constituição de uma nova matriz de dissimilaridade, denominada matriz de coeficiente de semelhança cofenética. O ajustamento dos métodos hierárquicos é feito por meio do coeficiente de correlação cofenética (CCC), descrito por Sokal e Rohlf, em 1962. Quanto maior o valor do CCC, menor será a distorção entre a matriz de distância e o agrupamento dos genótipos. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Mingoti *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2008)

As medidas de dissimilaridade são importantes em estudos de diversidade genética, quando se procuram identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação. Espera-se que genitores com bom desempenho e divergentes apresentem genes complementares que proporcionem, na F_1 , maior heterose e indivíduos transgressivos nas gerações segregantes. Se dois genitores geneticamente próximos forem selecionados, não é provável que produzam heterose considerável, já que terão rearranjos genéticos similares para as características de interesse. Essa última situação somente se aplica em cultivares já melhorados, em que o pouco ganho na heterose é compensado pela geração de híbrido superior em relação ao dos genitores com bom desempenho, sendo esse procedimento designado cruzamento convergente. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Borém e Miranda, 2005; Mingoti, 2007; Cruz e Carneiro, 2008)

Para Consonante com Paterniani (2001), a heterose é a expressão genética que estima a diferença entre os híbridos e seus parentais. A concepção de heterose continua sendo aplicada na produção de vários híbridos de diferentes espécies vegetais. Na cultura do milho, o uso da heterose na hibridação foi recomendado como um valioso método de melhoramento. Os híbridos podem ser sintetizados por várias formas, porém, a mais comum é por meio do cruzamento entre linhas puras.

A teoria da heterose foi proposta para explicar as causas do fenômeno do vigor híbrido. A teoria da dominância, proposta por Davenport, em 1908; Bruce, em 1910; e Keeble e Pellew, em 1910, consideram que a concentração e a interação de vários genes dominantes no híbrido é devido ao vigor híbrido. Outra teoria foi a hipótese da sobredominância proposta por Shull, em 1909, e East, em 1936, baseada na hipótese de que a heterozigose é necessária para a

expressão da heterose e, assim sendo, a sobredominância poderia trazer uma vantagem para a atividade fisiológica do híbrido. (Vencovsky e Barriga, 1992; Paterniani e Campos, 2005)

A teoria da genética quantitativa, de acordo com Falconer (1987), indica que, quando o grau de dominância for superior a 0 (zero), a heterose é uma função de frequência alélica entre os genitores, existindo uma correlação positiva entre a divergência genética e a heterose. Sendo assim, estudos da diversidade genética, entre as linhagens, vêm sendo utilizados como meio de predição de cruzamentos superiores em programas de melhoramento. (Paterniani *et al.*, 2008)

Os programas de melhoramento genético têm, nos grupos heteróticos, um dos seus pilares, por possibilitar a obtenção de híbridos superiores, em razão de pertencerem a diferentes conjuntos gênicos, o que possibilita não apenas a ampliação da distância genética entre os materiais em cruzamento, mas também a possibilidade de obtenção de combinações alélicas favoráveis. (Cruz, 2005) Desde os primeiros trabalhos desenvolvidos por Davenport, em 1908, e por Shull, em 1909, vários estudos apresentaram evidências de que o cruzamento entre linhas geneticamente divergentes, frequentemente, resultaram em progênie superiores. (Paterniani, 2001; Cruz, 2005)

Hoje, especialmente em programas de seleção recorrente na obtenção de híbridos de linhagens, os marcadores de DNA têm sido utilizados, propiciando a identificação de materiais discrepantes que potencializam a heterose, para os componentes de produção, em populações melhoradas e em híbridos. (Benchimol *et al.*, 2000; Warburton *et al.*, 2002; Guimarães, 2003; Von Pinho, 2003; Ye *et al.*, 2005; Barata e Carena, 2006; Pereira e Pereira, 2006; Aguiar *et al.*, 2008; Balestre *et al.*, 2008; Cuz e Carneiro, 2008; Tardin *et al.*, 2007) Em particular ao uso de distintas variáveis para a obtenção de matrizes híbridas, tem sido preconizado o agrupamento de Gower e Ward-MLM. (Gower, 1971; Núñez *et al.*, 2003; Crossa e Franco, 2004; Gonçalves *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2009; Barbé *et al.*, 2009).

3.7. Marcador Molecular – Técnica PCR

Os marcadores moleculares têm sido considerados ferramentas poderosas em programas de melhoramento de plantas, devido às opções de

aplicações como, por exemplo, caracterização de genótipos, aplicação como seleção assistida, mapeamento de características quantitativas (QTLs), dentre outras. (Eathington *et al.*, 2007; Schulman, 2007; Bernardo, 2008; Collard e Mackill, 2008).

O primeiro marcador molecular a ser estabelecido foram as isoenzimas. (Market e Moller, 1959) Entretanto, este marcador é bastante criticado por ter reduzida cobertura nos genomas investigados, decorrente do pequeno número de locos que podem ser detectados; além do baixo nível de polimorfismo identificado por loco. Com a descoberta e isolamento das enzimas de restrição (endonucleases), em 1960, foi possível o surgimento de uma nova classe de marcadores moleculares, denominados “restriction fragment length polymorphisms” (RFLPs) e os minissatélites, que permitem detectar as diferenças entre indivíduos, diretamente a partir da molécula de DNA. Apesar de esses marcadores apresentarem inúmeras vantagens, são laboriosos e caros, além de os resultados surgirem de forma lenta, visto envolverem a execução de várias etapas. (Schlötterer, 2004; Caixeta *et al.*, 2006; Schulman, 2007)

Em 1987, Mulis e Falona publicaram o clássico artigo “specificic synthetis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction”, que consistiu no desenvolvimento da técnica de multiplicação de fragmentos de DNA, *in vitro*, em escala exponencial. (Mulis e Falona, 1987) Essa técnica, posteriormente denominada PCR (“polymerase chain reaction”), revolucionou as pesquisas em biologia molecular, permitindo o desenvolvimento de uma sequência de diferentes marcadores, a saber: “single sequence repeated” (SSR), “random amplified polymorphic DNA” (RAPD), “sequence tagged sites” (STS), “expressed sequence tags” (EST), “sequence characterized amplified regions” (SCAR), “inter simple sequence repeats” (ISSR), “amplified fragment lenght polymorphism” (AFLP), “single nucleotide polymorphisms” (SNPs), dentre outros. (Schlötterer, 2004; Schulman, 2007)

Para o funcionamento da técnica PCR, são necessários dois iniciadores que flanqueiam a sequência de DNA alvo; dNTPs, que são os quatro nucleotídeos trifosfatos; a enzima DNA polimerase termoestável; íons de magnésio e tampão para reação. (Roux, 1995; Kubista *et al.*, 2006). Nesse sentido, a reação é realizada por sucessivos ciclos de temperatura, em três etapas: (1) desnaturação em temperatura elevada (em torno de 92 - 95 °C), para separação da fita dupla de

DNA; (2) anelamento dos iniciadores, reduzindo a temperatura, entre 35 – 60 °C; e (3) extensão, na qual a temperatura é ajustada em torno de 72° C, o que é ótimo para atividade da polimerase que amplifica o fragmento de DNA de interesse, a partir da extremidade 3'-OH livre dos iniciadores, incorporando os dNTPs. (Kubista *et al.*, 2006)

Entretanto, para um bom funcionamento e confiabilidade dos marcadores que utilizam o PCR, há necessidade de uma prévia padronização das condições da reação, para que não sejam produzidas ampliações indefinidas e inespecíficas. (Hyndman e Mitsuhashi, 2003) Por conseguinte, diversos reagentes e etapas têm que ser padronizados para obtenção de resultados satisfatórios nas reações como, por exemplo, a adequada concentração de Mg^{2+} , o desenho dos iniciadores, as condições dos ciclos, sendo a temperatura de anelamento (T_a) um dos componentes que requer maior atenção no ajuste. (Roux, 1995) Nesse aspecto, se a T_a é muito alta, os iniciadores anelam-se de maneira deficiente, resultando em baixa produção de DNA amplificado; contudo, se a T_a for muito baixa, pode ocorrer anelamento inespecífico dos iniciadores, ocasionando a amplificação de segmentos de DNA indesejáveis. (Roux, 1995; Hyndman e Mitsuhashi, 2003)

Em geral, para solucionar esse problema, a T_a pode ser obtida por um gradiente de temperatura variando de 2 a 10 °C abaixo da temperatura de fusão (T_m - *melting temperature*), definida dependentemente de alguns fatores, como a presença de GC do fragmento do DNA-alvo. Outra opção é incorporar a técnica de *Touchdown* que, baseando-se na T_a , seja possível programar o termociclador para que, a partir de um determinado ciclo, a temperatura diminua progressivamente a cada ciclo. (Don *et al.*, 1991; Roux, 1995; Hyndman e Mitsuhashi, 2003; Caixeta *et al.*, 2006)

Parte das pesquisas que utilizam marcadores ISSR plantas, inclusive milho, usam uma temperatura constante de anelamento (TC) para todos iniciadores. (Kantety *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2002; Debinath, 2007). Outras pesquisas usam a temperatura constante para alguns iniciadores, enquanto a técnica *Touchdown* é empregada para os demais iniciadores. (Martins *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004) Nos casos em que se utiliza o *Touchdown*, não há um procedimento que tenha sido testado para predizer em que ciclo e nível a temperatura de anelamento deve ser reduzida, fato que

compromete a eficiência do emprego do *Touchdown*. Com a ocorrência de novas pesquisas utilizando ISSR em *Zea mays*, tal situação torna-se ainda mais complexa, já que um *quantum* maior de marcas de especificidades dúbias pode estar sendo considerado e, por outro lado, as marcas que não são reveladas por condições inadequadas podem não estar sendo aproveitadas.

3.8. Marcadores moleculares e variabilidade genética

Por propiciarem a detecção da variabilidade presente em nível de DNA, além de serem menos influenciados ambientalmente, os marcadores moleculares são ferramentas poderosas para serem utilizadas em associação com programas de melhoramento clássico. (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Milach, 1998; Guimarães, 2003; Pereira e Pereira, 2006; Tardin *et al.*, 2007; Munhoz *et al.*, 2009)

Os marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar a distância genética entre os genótipos e, assim, orientar a escolha de genitores, para formação de híbridos, por exemplo.

Os marcadores moleculares também têm sido utilizados para estabelecer grau de parentesco entre linhagens endogâmicas e para a predição de comportamento híbrido. (Borém e Miranda, 2005; Pereira e Pereira, 2006) Estudos têm sido realizados também para investigar a relação entre a diversidade genética em relação às regiões de origem, para fins de conhecimento de parença entre materiais adaptados a diferentes condições ambientais. Xia *et al.* (2005), utilizando marcadores SSR em populações subtropical, tropical de meia altitude e alta altitude, obtiveram a separação dos grupos heteróticos, mostrando diferença entre o milho das diferentes regiões, apesar de, em alguns ambientes, este dado ser difícil de identificação.

No trabalho desenvolvido por Santacruz-Varela *et al.* (2004), foi avaliada a distância genética de 56 acessos de milho pipoca provenientes de 10 países (inclusive o Brasil), baseados em características morfológicas, alelos isoenzimáticos e SSR (“simple sequence repeat”), obtendo-se o reconhecimento de três grupos, a saber: i) “Yellow Pearl Popcorn”, que representa o mais importante grupo comercial dos E.U.A.; ii) “North American Pointed Rice Popcorns”, que, provavelmente, se originou de um complexo de raças tradicionais

de milho pipoca da América Latina; e iii) “North American and North American Early Popcorn”, que tem grande relação com os tipos duro de milho comum do norte.

Outros autores também utilizaram marcadores moleculares para analisar a diversidade genética, via RAPD, microsátélites e ISSR, em milho comum e pipoca. (Carvalho *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Vigouroux *et al.*, 2005; Munhoz *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009) Como exemplo, cita-se o trabalho de Silva *et al.* (2009), em que foi avaliada a divergência entre 25 genótipos de milho pipoca por microsátélites, cujo resultado foi que a maioria dos acessos agrupados possuía a mesma origem parental. Carvalho *et al.* (2004), ao estudarem a divergência genética entre 81 acessos de milho comum (“landraces” mantidas por agricultores no sul do Brasil), por marcador RAPD, concluíram que o tipo de agricultura praticada pelos pequenos agricultores de milho tem contribuído para a manutenção da variabilidade genética e que o isolamento de produção é uma prática regular. Estes resultados podem ser úteis para estabelecer e manter coleções de germoplasma de milho “landraces”, e servir como fontes para elaboração de estratégia de melhoramento.

Utilizando-se a técnica ISSR em milho pipoca, Kantety *et al.* (1995) avaliaram a divergência genética entre o milho dentado e o pipoca. Os autores obtiveram média de 54 bandas/iniciador, com mais de 98% de repetição de bandas, fazendo uso dos seguintes iniciadores: (CA)₆R, (CA)₆RY, (CA)₆RG, (GT)₆YR, (GT)₆AY, (AGC)₄Y, (AGC)₄GR, (AGC)₄GY, (AGC)₄AY, (GCT)₄Y. Pelos resultados, constatou-se a absoluta separação entre os tipos de milho dentado e pipoca, além de discriminar, embora com menor distanciamento, três grupos heteróticos de milho pipoca: “South American” (representado por nove linhagens); “Supergold” (constituído por oito linhas); e “Amber Pearl” (com três linhas).

Silva *et al.* (2009), estudando 25 genótipos pela técnica microsátélite, identificaram quatro acessos mais distantes, geneticamente, dos demais indivíduos e, com isso, foi possível sugerir o cruzamento de indivíduos, para aproveitamento de efeito heterótico, com estes acessos.

Em milho comum, cujos programas de melhoramento receberam maior atenção por parte dos pesquisadores, autores têm demonstrado a eficiência na quantificação da diversidade genética e identificação de grupos heteróticos, utilizando-se de RFLP (Ajmone-Marsan *et al.*, 1998; Benchimol *et al.*, 2000;

Bretrán *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2003), RAPD (Carvalho *et al.*, 2004; Bruel *et al.*, 2007), AFLP (Laborda, 2003; Oliveira *et al.*, 2004) e, mais recentemente, com o uso de marcadores SSR (Laborda, 2003; Reif *et al.*, 2003; Vigourox *et al.*, 2005; Barata e Carena, 2006) e ISSR (Carvalho *et al.*, 2002).

No entanto, no Brasil, não se tem relato do uso de marcadores moleculares ISSR na identificação de variabilidade genética de germoplasma de milho pipoca. Os escassos trabalhos aliados aos poucos programas clássicos de melhoramento com milho pipoca constituem um entrave ao desenvolvimento de híbridos superiores para grande parte das áreas produtivas do país, o que se estende à América do Sul, África e Oceania.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material genético

Um total de 52 acessos, de diferentes constituições genéticas, foi analisado (Tabela 3). Destes, 34 acessos são milho pipoca; sete, milho dentado; dois, milho semidentado; quatro, milho duro; um, semiduro; um, milho doce; um, milho comum tetraploide; e dois, milho ancestral.

O plantio foi realizado em Campos dos Goytacazes, no Colégio Estadual Agrícola “Antonio Sarlo” e em casa de vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Os acessos cultivados em casa de vegetação foram: Argentina, PA 091, Colombiana, PAZM 130703, SE 013, TATU 1 e TATU 2.

A coleta das folhas foi feita em “bulk”, com cerca de 16 indivíduos de cada genótipo, após 45 dias de plantio. Em seguida, as folhas foram embaladas em papel alumínio e conservadas em gelo até a transferência para o ultrafreezer a -80 °C. Os procedimentos laboratoriais, tais como, extração de DNA, amplificação de fragmento, eletroforese e fotodocumentação, foram desenvolvidos no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF (LMGV/CCTA/UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ.

Tabela 3 – Acessos de milho comum, pipoca, doce, teosinte e *Tripsacum* sp., utilizadas suas principais características e procedências

Numeração	Genótipo	Tipo de Grão	Dias para Florescimento	Peso de 100 sementes(g)	Altura (m)		Cariopse		Procedência
					Planta	Espiga	Pericarpo	Endosperma	
01	VALL 429	Pipoca	93	8,84	2,05	1,35	Amarela	Laranja	CIMMYT
02	UFVM2-Barão Viçosa	Pipoca	62	12,18	1,26	0,63	Incolor	Laranja	UFV
03	ARGENTINA	Pipoca	-	-	-	-	Incolor	AM/AL *	UEM
04	SE 013	Pipoca	-	-	-	-	Incolor	Branco e Amarelo	UEM
05	UNB-2U C1	Pipoca	59	14,77	1,53	0,87	Incolor	Laranja	UENF
06	URUG 298	Pipoca	59	7,83	1,21	0,73	Vermelha	Laranja	CIMMYT
07	IAC-125	Pipoca	-	15,00	1,59	0,84	Incolor	Laranja	IAC
08	RS-20	Pipoca	59	10,75	1,14	0,55	Incolor	Laranja	IPAGRO/AGROESTE
09	TATU 2	Pipoca	-	8,00	-	-	Incolor	Branco	UEM
10	UNB-2U C0	Pipoca	60	14,30	1,45	0,83	Incolor	Laranja	UENF
11	PAZM 130703	Pipoca	-	-	-	-	Incolor	Branco	UEM
12	SAM	Pipoca	-	14,49	-	-	Incolor	Laranja	Sul-americana/EUA
13	BRS ANGELA	Pipoca	74	10,52	1,52	0,84	Incolor	Branco	Embrapa
14	IAC-112	Pipoca	-	13,30	1,89	1,04	Incolor	Laranja	IAC
15	Viçosa	Pipoca	62	14,64	1,41	0,80	Amarela	Laranja	UFV
16	COMPUESTO	Pipoca	-	17,00	-	-	Incolor	AM/Branco *	CIMMYT
17	TATU 1	Pipoca	-	8,70	-	-	Incolor	Preto/Roxo	UEM
18	PA 091	Pipoca	-	-	-	-	Incolor	Amarelo	UEM
19	ARZM 13 050	Pipoca	63	16,22	1,62	0,97	Incolor	Branco e Amarelo	CIMMYT
20	BEIJA-FLOR	Pipoca	56	15,69	1,65	0,86	Incolor	Laranja	UFV
21	BOYA 462	Pipoca	82	16,54	2,30	1,42	Incolor	Incolor e Preto/roxa	CIMMYT
22	PARA 172	Pipoca	69	12,14	1,56	0,99	Incolor	Branco e Amarelo	CIMMYT
23	ARZM 07 049	Pipoca	70	16,47	1,85	1,22	Incolor	Laranja	CIMMYT
24	BOZM 260	Pipoca	61	12,86	2,06	1,29	Incolor	Branco	CIMMYT
25	ARZM 05 083	Pipoca	76	9,76	1,82	1,34	Incolor	Branca	CIMMYT
26	CHZM 13 0134	Pipoca	50	11,09	1,53	0,94	Marrom	AM/AL *	CIMMYT
27	UNB-2U C3	Pipoca	56	15,63	1,80	0,94	Incolor	Laranja	UENF

Cont. Tabela 3

Numeração	Genótipo	Tipo de Grão	Dias para Florescimento	Peso de 100 sementes (g)	Altura (m)		Cariopse		Procedência
					Planta	Espiga	Pericarpo	Endosperma	
28	PR-023	Pipoca	68	16,80	1,90	1,09	Incolor	Laranja	UEM
29	Zélia	Pipoca	-	13,72	1,66	0,80	Incolor	Laranja	Pioneer Hi-bred
30	UENFV-Explosiva C4	Pipoca	56	15,68	1,72	0,98	Incolor	Laranja	UENF
31	PARA 170	Pipoca	85	6,55	0,91	0,58	Incolor e marrom	Branco	CIMMYT
32	COLOMBIANA	Pipoca	-	11,66	-	-	Incolor	Laranja	UEM
33	JADE	Pipoca	-	17,83	-	-	Incolor	Laranja	Pioneer Hi-bred
34	UNB-2U C2	Pipoca	56	15,18	1,60	0,90	Incolor	Laranja	UENF
35	DOCE DE CUBA	Doce	62	14,97	1,76	1,10	Incolor	Amarelo	UENF
36	COMPOSTO FLINT N	Duro	67	20,86	1,36	0,76	Incolor	Laranja	UENF
37	CATETO SETE LAGOAS	Duro	71	17,69	2,15	1,21	Incolor	Laranja	Embrapa
38	CATETO COLOMBIA	Duro	68	28,41	2,38	1,40	Incolor	AM/AL *	Embrapa
39	CIMMYT – 11	Duro	72	27,73	1,58	0,88	Incolor	AM/AL *	UENF
40	CATETO ROXO	Semiduro	69	31,87	1,80	0,98	Marrom	AM/AL *	Pesagro
41	MAYA	Dentado	64	29,54	2,34	1,45	Marrom	AM/AL *	Embrapa
42	CENTRALMEX	Dentado	68	33,14	1,94	1,24	Incolor	AM/AL *	Embrapa
43	CATETO AMARELO	Dentado	72	26,25	2,50	1,48	Incolor	Amarelo	Pesagro
44	PIRANÃO 11	Dentado	68	32,14	1,45	0,80	Incolor	Amarelo	UENF
45	DENTE DE BURRO	Dentado	77	24,68	2,05	1,19	Incolor	Amarelo	UENF
46	AZTECA	Dentado	64	26,07	2,46	1,58	Incolor	AM/AL *	Embrapa
47	MAYA ANTIGO	Dentado	67	30,81	2,27	1,35	Incolor	AM/AL *	UENF
48	SARACURA	Semidentado	68	24,74	1,64	0,89	Incolor	AM/AL *	Embrapa
49	BR 106	Semidentado	70	25,66	1,68	0,96	Incolor	AM/AL *	Pesagro
50	Tetraplóide	Milho tetraploide	65	15,46	1,59	0,85	Incolor	Amarelo	UENF
51	Teosinte	Ancestral	74	6,64	-	-	-	-	UFV
52	<i>Tripsacum</i> sp.	Ancestral	-	4,56	-	-	-	-	Embrapa

* AM=Amarelo e AL=Alaranjado

4.2. Análise molecular

4.2.1. Extração do DNA

Aproximadamente 200 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos com a capacidade de 1,5 mL e imersos em nitrogênio líquido. A extração de DNA foi realizada, de acordo com o protocolo “mini-prep” de Doyle e Doyle (1990), com modificações, com a adição de proteinase K no tampão de extração, na concentração final de $0,125 \text{ mg.mL}^{-1}$.

4.2.2. Quantificação do DNA

Para avaliação da concentração e da qualidade de DNA, as amostras foram avaliadas em gel de agarose a 1,0%, coradas com a mistura de “Blue Juice” 6X com “Gel Red”, na proporção de 1:1. Como padrão, foi utilizada amostra de DNA, com concentração conhecida de DNA de fago λ (10, 20, 30, 50 e 100 ng).

As amostras de trabalho foram posteriormente padronizadas na concentração de $5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ e mantidas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.3. Amplificação do DNA

4.2.3.1. Marcador RAPD

A reação de amplificação, via PCR, foi realizada conforme Williams *et al.* (1990), com modificações.

As concentrações adotadas, para um volume final de 15 μL , foram: 1,5 μL de Tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl a pH 8,4, 1% de Triton X-100); 1,2 μL de 25 mM MgCl_2 , 0,75 μL de 2 mM dNTPs; 1,5 μL de iniciador (0,5 mM); 0,12 μL de 5U de Taq DNA polimerase e 2 μL de DNA genômico ($5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$), completando o volume final com água ultrapura. O procedimento foi realizado utilizando os 20 oligonucleotídeos de RAPD, a partir de uma seleção com vários nucleotídeos, quando estes revelaram melhor qualidade do gel e quantidade de polimorfismo, em relação aos demais (Tabela 4).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos de RAPD, com as respectivas sequências de pares de bases.

Oligonucleotídeos	Sequência 5'→3'
ae11	AAGACCGGA
ae18	CTGGTGCTGA
c04	CCGCATCTAC
c16	CACACTCCAG
d13	GGGGTGACGA
aa11	ACCCGACCTG
aa14	AACGGGCCAA
aa16	GGAACCCACA
ab06	GTGGCTTGGA
ac14	GTCGGTTGTC
ac10	AGCAGCGAGG
ac12	GGCGAGTGTG
ac17	CCTGGAGCTT
ad11	CAATCGGGTC
e18	GGAAGCAGA
f01	ACGGATCCTG
i07	CAGCGACAAG
m05	GGGAACGTGT
n15	CAGCACTGGT
ab08	GTTACGGACC

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador de gradiente da marca Eppendorf, de acordo com o seguinte programa: 1 min de desnaturação a 95 °C, seguida por 45 ciclos de amplificação, sendo 94 °C a 1 min (desnaturação), 36 °C a 1 min (anelamento), 72 °C por 2 min (extensão) e uma extensão final no último ciclo a 72 °C por 7 min.

4.2.3.2. Marcador ISSR

A partir de uma triagem, foram selecionados 15 iniciadores que proporcionaram melhor qualidade de amplificação e polimorfismo. Destes iniciadores utilizados, dez eram dinucleotídeos; quatro, trinucleotídeos; e um, tetranucleotídeo. Sendo que seis foram sintetizados pela *RW Genes* – (CT)₈RC; (CT)₈TG; (GA)₈T; (GA)₈YC; (CTC)₅RC; (GTC)₆ – e nove pela *Invitrogen* –

(GA)₆CC; (GT)₆CC; (CAC)₃GC; (AG)₈YT; (AC)₈CT; (AC)₈YG; (CT)₈RG; (GGAT)₃GA; (GAA)₆AA.

O teste para o marcador ISSR foi conduzido com oito acessos de milho, sendo: Centralmex (milho comum do tipo dentado), Tripsacoide 01 (obtido do cruzamento entre milho comum e *Tripsacum* sp.), Doce de Cuba (milho doce), Cimmyt (milho comum do tipo duro), Cateto Amarelo (milho comum do tipo dentado), IAC-112 (milho pipoca), BOZM 260 (milho pipoca) e PR 023 (milho pipoca).

As reações de amplificação, via PCR, foram realizadas, de acordo com a metodologia sugerida por Zietkiewicz *et al.* (1994), com modificações. As concentrações foram adotadas para um volume final de 20 µL contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 2 µL de Tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl a pH 8,4, 1% de Triton X-100); 2 µL de 25 mM MgCl₂; 1,6 µL de 2 mM dNTPs; 1 µL (5%) de DMSO (Dimethyl Sulfoxide); 1,8 µL de 0,5 mM de iniciador (*RW Genes* e *Invitrogen*); 0,12 µL de 5U de Taq DNA polimerase “Fermentas” e 2 µL de DNA genômico (5 ng.µL⁻¹), completando o volume final com água ultrapura.

As amplificações, para a otimização da temperatura ótima de anelamento (T_a), foram realizadas no termociclador de gradiente da marca Eppendorf, de acordo com o seguinte programa: 4 min de desnaturação a 94 °C, seguida por 42 ciclos de amplificação (94 °C a 1 min, 1 min com T_m – “temperature of melting” – variando de 2 em 2 °C, em um espectro de até 14 °C para cada iniciador, a partir da temperatura média obtida pela equação: $T_m = (G + C)4 + (A + T)2$, e 72 °C por 3 min). Após os 42 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (2%), corados com a mistura de “Blue Juice” 6X com “Gel Red”, na proporção de 1:1, e as imagens foram reveladas pelo sistema “MiniBis Pro”.

Posteriormente, foi testada a técnica de *Touchdown* para todos os iniciadores com diferentes combinações de programações:

(A) 4 min de desnaturação a 94° C, seguida por 30 ciclos de amplificação (94 °C a 1 min, 1 min com T_a específica para cada iniciador, variando ± 7° C, e 72 °C por 3 min) e 12 ciclos (94 °C a 1 min, decréscimo de 0,5 °C da T_a de cada iniciador por ciclo, e 72 °C por 3 min). Após os 42 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C;

(B) 4 min de desnaturação a 94 °C, seguida por 32 ciclos de amplificação (94 °C a 1 min, 1 min com T_a específica para cada iniciador, variando ± 7 °C, e 72 °C por 3 min) e 10 ciclos (94 °C a 1 min, decréscimo de 0,5 °C da T_a de cada iniciador por ciclo, e 72 °C por 3 min). Após os 42 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C;

(C) 4 min de desnaturação a 94 °C, seguida por 30 ciclos de amplificação (94 °C a 1 min, 1 min com T_a específica para cada iniciador, variando ± 7 °C, e 72 °C por 3 min) e 12 ciclos (94 °C a 1 min, decréscimo de 1,0 °C da T_a de cada iniciador por ciclo, e 72 °C por 3 min). Após os 42 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C;

(D) 4 min de desnaturação a 94 °C, seguida por 32 ciclos de amplificação (94 °C a 1 min, 1 min com T_a específica para cada iniciador, variando ± 7 °C, e 72 °C por 3 min) e 10 ciclos (94 °C a 1 min, decréscimo de 1,0 °C da T_a de cada iniciador por ciclo, e 72 °C por 3 min). Após os 42 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C.

A análise foi feita por comparação dos acessos, levando-se em conta a qualidade dos géis, a nitidez das bandas, o número de marcas encontradas, marcas perdidas, marcas obtidas, quantidade de marcas monomórficas e polimórficas, quando submetidos à temperatura constante nos 42 ciclos, pela técnica *Touchdown*.

Para avaliação comparativa das melhores condições de temperatura de anelamento, tomou-se como base a temperatura recomendada pelo fabricante. A empresa *RW Genes* calcula a temperatura de anelamento com base na equação: $T_m = (G + C)4 + (A + T)2$, no entanto, a empresa *Invitrogen* considera não apenas a quantidade de AT (adenina e timina) e CG (citosina e guanina), mas também a disposição dos oligonucleotídeos nos iniciadores (equação indisponibilizada pela empresa).

4.2.4. Eletroforese

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,0% e tampão TAE 1X, a 100 volts por 2 h e, posteriormente, corados com a mistura de “Blue Juice” 6X com ‘Gel Red’, na proporção de 1:1. O

marcador Ladder de 250 pares de bases foi utilizado para a determinação do tamanho dos fragmentos gerados.

Os géis foram fotodocumentados no sistema de revelação, sob luz ultravioleta no equipamento “Mini Bis Pro” (BioAmérica).

4.3. Análises de diversidade

A revelação das bandas nos géis, tanto para o marcador RAPD quanto para o ISSR, foram utilizadas para a confecção de matrizes de distâncias genéticas, considerando-se: a = presença da banda em ambos os indivíduos, b = presença em um indivíduo e ausência em outro, e c = ausência da banda em um indivíduo e presença em outro. As distâncias entre os indivíduos foram obtidas pela estimativa do complemento aritmético de similaridade de Jaccard:

$$J_{ij} = 1 - \frac{a}{a + b + c} \text{ (Jaccard, 1908).}$$

A partir da matriz de distância, foi implementado o agrupamento dos indivíduos com base nos métodos “unweighted pair group method with the arithmetic averages” (UPGMA), Neighbor-Joining e Análise das Coordenadas Principais (PCoA). (Sneath e Sokal, 1973; Cruz *et al.*, 2004)

O método UPGMA agrupa os genótipos com base nas médias das distâncias entre estes, a partir do par mais semelhante. (Mohammadi e Prasanna, 2003) O método Neighbor-Joining é um método utilizado para a construção de árvores filogenéticas sem raiz, a partir de uma matriz de distância de acordo com o princípio da evolução mínima (soma total do comprimento dos ramos). O princípio do método é encontrar pares de unidades taxonômicas operacionais que minimizam o comprimento total dos ramos. (Saitou e Nei, 1987) O PCoA pode ser utilizado para verificar a dispersão dos indivíduos num plano de segunda ou terceira dimensão. PCoA é um método de dimensionamento que se inicia com a matriz de semelhança ou diferenças entre um conjunto de indivíduos, e objetiva produzir uma baixa parcela dimensional gráfica dos dados, de tal forma que as distâncias entre os pontos estejam perto da dissimilaridade original. (Mohammadi e Prasanna, 2003; Mingoti, 2007)

Para tanto, foram utilizados os recursos computacionais do programa Genes (Cruz, 2006), Programa R, usando o pacote “cluster” (www.r-project.org) e DARwin 5 (Perrier e Jacquemoud-Collet, 2006). A consistência entre a matriz de

distância e os agrupamentos foi implementada pelo uso do coeficiente de correlação cofenética, cuja estimativa é a própria correlação de Pearson, entre os elementos correspondentes da matriz de distâncias genéticas e a matriz gerada pelo agrupamento. Trata-se de um coeficiente de correlação produto-momento que quantifica a concordância entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz de dissimilaridade cofenética, expressa pelo dendrograma. (Sneath e Sokal, 1973; Cruz *et al.*, 2004; Mingoti, 2007)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Temperatura de anelamento e *Touchdown* no ajuste da técnica PCR para marcadores ISSR

Em nove dos 15 iniciadores, verificou-se que a T_a variou $\pm 3,5$ °C da T_m recomendada pela empresa; todavia, a T_a dos iniciadores (CT)₈TG, (GA)₆CC e (GT)₆CC diferiram em 10,0, 10,0 e 8,0 °C da T_m recomendada pelas empresas, respectivamente. Para os iniciadores sintetizados pela *RW Genes*, com oligonucleotídeos degenerados (CT)₈RC, (GA)₈YC e (CTC)₅RC, não foi determinada a T_m ; entretanto, ao aplicar a equação [$T_m = (G + C)4 + (A + T)2$], verificou-se uma variação de 6,5, 1,0 e 6,0 °C, respectivamente, entre a T_a para com a menor temperatura informada pela equação, que varia com o oligonucleotídeo (Y = C ou T; R = A ou G). Diante destes fatos, evidencia-se a necessidade de realização de pré-testes com gradientes de temperaturas para cada iniciador, de forma que se tenha possibilidade de identificação da temperatura ideal de anelamento para proporcionar a máxima eficiência do PCR.

Em algumas pesquisas com marcadores ISSR, verifica-se a adoção de apenas uma temperatura constante de anelamento para todos os iniciadores utilizados. (Kantety *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 2002; Debinath, 2007) Porém, é consabido que as temperaturas são individuais para cada desenho do iniciador ISSR utilizado, estando vinculadas diretamente com a presença de CG e com a disposição destes pares de bases (Roux, 1995; Reddy *et al.*, 2002); portanto, a

eficiência e a confiabilidade na geração de marcas possuem relação direta com o manuseio da temperatura ideal de anelamento, além da concentração dos reagentes.

Como exemplo, cita-se a clássica pesquisa de Kantety *et al.* (1995) com milho comum e milho pipoca, em que estabeleceram 45 °C como a temperatura de anelamento para todos os iniciadores. Todavia, por reavaliação das temperaturas ideais, com base na equação da T_m , em vez de 45 °C para o iniciador (CA)₆R, os autores deveriam ter utilizado a temperatura de 40 °C para a amplificação. De todo modo, as estimativas de temperaturas de anelamento obtidas, com base na equação para os iniciadores utilizados por Kantety *et al.* (1995), não revelaram sequer um valor excedente a 45 °C.

Por sua vez, na pesquisa de Fernandez *et al.* (2002), com cevada, os autores estabeleceram a T_a de 52 °C como padrão para todos os iniciadores validados, porém, de acordo com o cálculo da T_m , com base na equação, as temperaturas de anelamento dos iniciadores variaram de 50 a 58 °C, denotando que temperaturas distintas para parte dos iniciadores deveriam ter sido utilizadas.

Consideração distinta deve ser feita em relação à pesquisa com milho. Na pesquisa desenvolvida por Carvalho *et al.* (2002), foi utilizada uma T_a para cada iniciador. O procedimento foi indicado para todos os trabalhos envolvendo marcadores moleculares ISSR, por tornar confiáveis os resultados obtidos a partir do produto da PCR, evitando o surgimento de bandas inespecíficas e a ausência de amplificação de bandas, devido ao uso de temperatura diferente da ideal.

Com base nos pré-testes realizados no presente estudo, utilizando o gradiente de temperatura de anelamento para cada iniciador, verificou-se que, quanto maior a temperatura, maior a identificação de bandas com menor peso molecular. Em contrapartida, as bandas de alto peso molecular foram perdidas, já que não eram reveladas ou eram evidenciadas em menor quantidade nos géis.

Com a aplicação da técnica *Touchdown*, utilizando um gradiente variando de 1 a 10 °C a partir da T_a , constatou-se que, dos 15 iniciadores avaliados, 10 proporcionaram géis com maior qualidade e número de bandas, a saber: (CT)₈RC, (CT)₈TG, (GA)₈T, (CTC)₅RC, (GTC)₆, (GA)₆CC, (CAC)₃GC, (AG)₈YT, (AC)₈CT e (GGAT)₃GA. Destes, a maioria foi eficiente com a utilização de 12 ciclos finais, com um decréscimo de 0,5 °C, exceto o iniciador (GTC)₆ em que a maior eficiência ocorreu nos 10 ciclos finais (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação das temperaturas utilizadas para iniciadores ISSR pela técnica *Touchdown* (T_a em °C); pelas Empresas *RW Genes* (calculada com base na equação $T_m = (G + C)4 + (A + T)2$) e *Invitrogen*, com base na T_m (°C) por equação não informada; e, finalmente, T_a obtida pelo gradiente de temperatura.

Iniciadores	<i>Touchdown</i>				T_a (°C)
	Ciclos Iniciais	T_a (°C)	Ciclos Finais	T_a (°C)	
(CT) ₈ RC	30	47,5	12	47,5 -0,5	47,5
(CT) ₈ TG	30	50	12	50 - 0,5	44
(GA) ₈ T	30	53	12	53 - 0,5	51,5
(GA) ₈ YC	30	48	12	50 - 0,5	48
(CTC) ₅ RC	30	53	12	53 - 0,5	50
(GTC) ₆	32	60	10	60 - 0,5	58,5
(GA) ₆ CC	30	42	12	42 - 0,5	42
(GT) ₆ CC	30	45	12	48 - 1,0	45
(CAC) ₃ GC	30	40	12	40 - 0,5	37
(AG) ₈ YT	30	46	12	46 - 0,5	42
(AC) ₈ CT	30	50	12	50 - 0,5	47
(AC) ₈ YG	30	52	12	55 - 0,5	52
(CT) ₈ RG	-	-	-	-	42
(GGAT) ₃ GA	30	46	12	46 - 0,5	40,5
(GAA) ₆ AA	-	-	-	-	48

* A equação da T_m não é aplicável para oligonucleotídeos degenerados.

** Valores alterados de acordo com a base nucleotídica: Y = C ou T; e R = A ou G.

Em relação à temperatura inicial, constatou-se que apenas os iniciadores (CT)₈RC e (GA)₆CC foram eficientes, quando o primeiro ciclo de anelamento foi realizado com a mesma da T_a . Segundo Roux (1995), mesmo que a temperatura de anelamento fique abaixo da T_m nos ciclos finais, a reação de amplificação na região específica já terá sido iniciada, impedindo amplificação inespecífica durante os ciclos restantes.

Os iniciadores (GA)₈YC, (GT)₆CC, (AC)₈YG, (CT)₈RG e (GAA)₆AA não foram eficientes com o uso da técnica *Touchdown*. Por conseguinte, aplicou-se a T_a nos ciclos iniciais e um gradiente, variando de 1 a 5 °C nos ciclos finais, com decréscimo de temperatura (0,5 ou 1,0 °C) e alteração do número de ciclos finais (10 ou 12 ciclos). Com essa modificação no procedimento, houve melhoria na revelação das bandas amplificadas para a maioria dos iniciadores. Os iniciadores (GT)₆CC e (AC)₈YG proporcionaram melhor qualidade dos géis quando foram impostos 12 ciclos finais com acréscimo de 3 °C nos últimos ciclos, enquanto, para o iniciador (GA)₈YC, os melhores resultados foram possíveis com o

acréscimo de 2 °C nos 12 ciclos finais. Entretanto, com base nas revelações dos géis, o iniciador (GT)₆CC proporcionou maior eficiência de anelamento, quando utilizada a redução de 1,0 °C por ciclo, enquanto, para os iniciadores (AC)₈YG e (GA)₈YC, isso ocorreu, quando se utilizou o decréscimo de 0,5 °C (Tabela 5 e Figura 4).

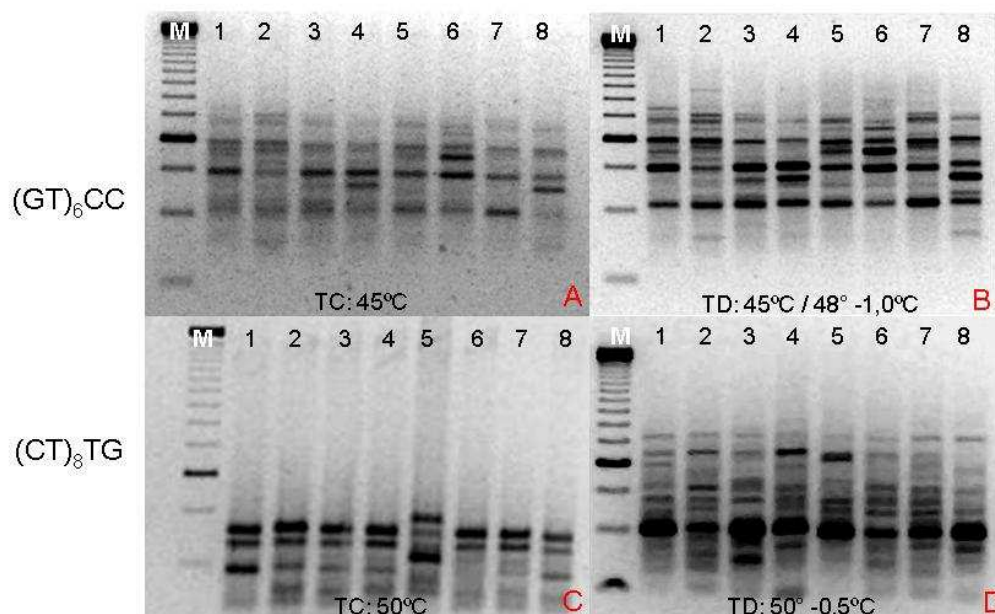


Figura 4 – As letras A com B referem-se ao produto do PCR, quando amplificado com o iniciador (GT)₆CC em temperatura constante, e quando utilizada a técnica *Touchdown*, respectivamente. As letras C e D revelam o resultado do PCR do iniciador (CT)₈TG, sendo a letra C com a temperatura superior ao da T_a (44 °C), no qual houve perda de bandas com maior peso molecular e ganho de bandas com menor peso molecular. A letra D refere-se ao gel revelado, após uso da técnica *Touchdown*, com o emprego de alta temperatura (50 °C) nos 30 ciclos iniciais, e decréscimo de 0,5 °C por ciclo nos 12 últimos ciclos, em que se visualiza maior quantitativo de bandas de maior peso molecular, sem impedir a produção de bandas com menor peso molecular. M = 250 pb ‘High DNA Mass Ladder’ (Invitrogen, EUA).

Alguns pesquisadores vêm fazendo uso da técnica *Touchdown* com marcadores ISSR (Martins *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004), porém, o procedimento metodológico não é descrito com clareza, não contendo as informações necessárias para permitir a repetição dos trabalhos. O mesmo ocorreu em estudos que puderam validar ou não a eficiência das temperaturas e ciclos empregados. Nesse sentido, os resultados aqui apresentados são também

de relevância para futuras pesquisas nas culturas do milho comum, milho pipoca, milho doce, teosinte e *Tripsacum* sp., visto que o processo de experimentação das condições ótimas de temperatura, para um conjunto representativo de iniciadores, será de importância na economia de recurso, tempo e esforço.

5.2. Divergência genética e inferência evolutiva utilizando os marcadores RAPD e ISSR

Considerando o marcador RAPD, cada iniciador produziu bandas de intensidade variável, facilmente detectadas, e bandas inespecíficas, com pouca intensidade, sendo estas descartadas. No total de 20 iniciadores de RAPD utilizados, foram obtidas 92 bandas polimórficas (82,9%) e 19 bandas monomórficas (17,1%). A média de bandas por iniciador foi de 5.5. O percentual médio de dissimilaridade estimado foi de 82,55%. O iniciador que proporcionou maior número de marcas polimórficas foi c04, com um total de nove fragmentos, apresentando 100% de polimorfismo. A média de fragmentos polimórficos dos iniciadores foi de 4,6 (Tabela 6).

Tabela 6 – Oligonucleotídeos de RAPD testados em milho (*Zea mays* L.) e ancestrais (Teosinte e *Tripsacum* sp.).

Oligonucleotídeo	Sequência 5'→3'	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Porcentagem de Polimorfismo
ae11	AAGACCGGA	5	3	60
ae18	CTGGTGCTGA	5	4	80
c04	CCGCATCTAC	9	9	100
c16	CACACTCCAG	5	3	60
d13	GGGGTGACGA	10	9	90
aa11	ACCCGACCTG	6	4	66,6
aa14	AACGGGCCAA	3	2	66,6
aa16	GGAACCCACA	6	5	83,3
ab06	GTGGCTTGGA	6	5	83,3
ac14	GTCGGTTGTC	5	4	80
ac10	AGCAGCGAGG	5	4	80
ac12	GGCGAGTGTG	5	5	100
ac17	CCTGGAGCTT	7	5	71,4
ad11	CAATCGGGTC	5	5	100
e18	GGAAGTGCAGA	6	4	66,6
f01	ACGGATCCTG	6	5	83,3
i07	CAGCGACAAG	3	3	100
m05	GGGAACGTGT	5	4	80
n15	CAGCACTGGT	2	2	100
ab08	GTTACGGACC	7	7	100
TOTAL	-	111	92	1651,1
MÉDIA	-	5,55	4,6	82,55

Carvalho *et al.* (2004), averiguando a diversidade genética entre raças locais de milho por marcador RAPD, utilizaram 31 iniciadores, obtendo 255 marcas, das quais 184 (72,2%) foram polimórficas.

Com base na matriz de dissimilaridade, por marcador RAPD, os acessos mais similares foram Azteca e PR 023, distantes em 0,10. Já os acessos *Tripsacum* sp. e IAC-125 foram os mais divergentes, com uma distância de 0.65, sendo que a distância média entre os acessos foi de 0,29 ($\pm 0,077$).

Pelo marcador ISSR, foram testados 18 iniciadores, sendo três descartados devido à ausência de amplificação. Utilizando 15 iniciadores, foi possível obter 122 bandas polimórficas (89,1%) e 15 bandas monomórficas (10,9%). A média de bandas por iniciador foi de 9,1. O percentual médio de polimorfismo foi estimado em 89,6% (Tabela 7).

Tabela 7 – Oligonucleotídeos de ISSR testados em milho (*Zea mays* L.) e ancestrais (Teosinte e *Tripsacum* sp.).

Oligonucleotídeo	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Percentagem de Polimorfismo
(CT) ₈ RC	8	8	100
(CT) ₈ TG	7	7	100
(GA) ₈ T	12	11	91,7
(GA) ₈ YC	12	11	91,7
(CTC) ₅ RC	15	11	73,3
(GTC) ₆	8	7	87,5
(GA) ₆ CC	6	4	66,6
(GT) ₆ CC	7	7	100
(CAC) ₃ GC	8	7	87,5
(AG) ₈ YT	10	8	80
(AC) ₈ CT	8	7	87,5
(AC) ₈ YG	9	9	100
(CT) ₈ RG	9	8	88,9
(GGAT) ₃ GA	10	9	90
(GAA) ₆ AA	8	8	100
TOTAL	137	122	1344,7
MÉDIA	9,1	8,1	89,6

Com o uso dessa técnica, verificou-se que a percentagem de polimorfismo variou de 66,6% a 100,0%. Os iniciadores que revelaram maior *quantum* de marcas polimórficas foram (GA)₈T, (GA)₈YC e (CTC)₅RC, no total de

11 fragmentos, sendo que o iniciador (CTC)₅RC foi o que proporcionou a maior quantidade de fragmentos amplificados, com um total de 15 bandas.

É necessário destacar que os iniciadores que proporcionaram maior quantidade de fragmentos amplificados não foram os que revelaram, proporcionalmente, maior grau de polimorfismo. Nesse aspecto, os marcadores que, em proporcionalidade aos fragmentos amplificados, exibiram maiores taxas de polimorfismo foram: (CT)₈RC, (CT)₈TG, (GT)₆CC, (AC)₈YG e (GAA)₆AA. Para esses iniciadores, o número de fragmentos amplificados equivaleu ao quantitativo de bandas polimórficas, portanto, em termos proporcionais, contiveram 100,0% de bandas polimórficas.

De modo geral, para os marcadores ISSR, o número de fragmentos amplificados e o quantitativo de fragmentos polimórficos foram adequados, comparando-se com o estudo de Carvalho *et al.* (2002), que investigaram a diversidade genética entre raças locais de milho por marcadores ISSR. Esses autores utilizaram 16 iniciadores, obtendo 153 marcas, das quais 116 (75,8%) foram polimórficas.

Com base na matriz de dissimilaridade, os acessos mais similares foram PR 023 e TATU 2, distantes em 0,15, ambos milho pipoca. A maior estimativa de distância, no valor de 0,69, ocorreu entre um germoplasma ancestral, no caso, *Tripsacum* sp., e um exemplar de milho pipoca, VALL 429, proveniente do CIMMYT. Há que se destacar que a distância média entre os acessos foi de 0,38 ($\pm 0,077$).

A primeira diferença notória nos resultados das duas técnicas, RAPD e ISSR, foi constatada quanto aos indivíduos mais similares e mais distantes geneticamente. No caso dos acessos mais similares, a técnica RAPD revelou os acessos Azteca e PR 023. Com esta informação, pode-se verificar um indício de falha, visto que um destes acessos, o Azteca, é um milho do tipo dentado, da raça Tuxpeno, de porte alto e utilizado como um dos parentais da variedade BR 106. Por sua vez, o PR 023 é um tipo de milho pipoca. Já, em relação à técnica ISSR, os acessos mais similares (PR 023 e TATU 2), são milhos do tipo pipoca, provenientes da mesma região, no estado do Paraná.

Com base nas bandas reveladas pelas técnicas RAPD e ISSR, foi realizada a análise de divergência genética, utilizando o complemento aritmético do Índice de Jaccard e a análise de agrupamento por Neighbor-joining e PCoA.

Considerando-se o resultado do agrupamento em ambas as técnicas moleculares (RAPD e ISSR), quanto ao marcador RAPD, houve eficiência na separação dos ancestrais (teosinte e *Tripsacum* sp.), em relação aos demais indivíduos. Tal resultado indica ainda que o teosinte está mais relacionado ao grupo do milho do que o *Tripsacum* sp., no entanto, não houve a perfeita separação entre os tipos de milho comum (dentado e duro) e pipoca (Figuras 5 e 6).

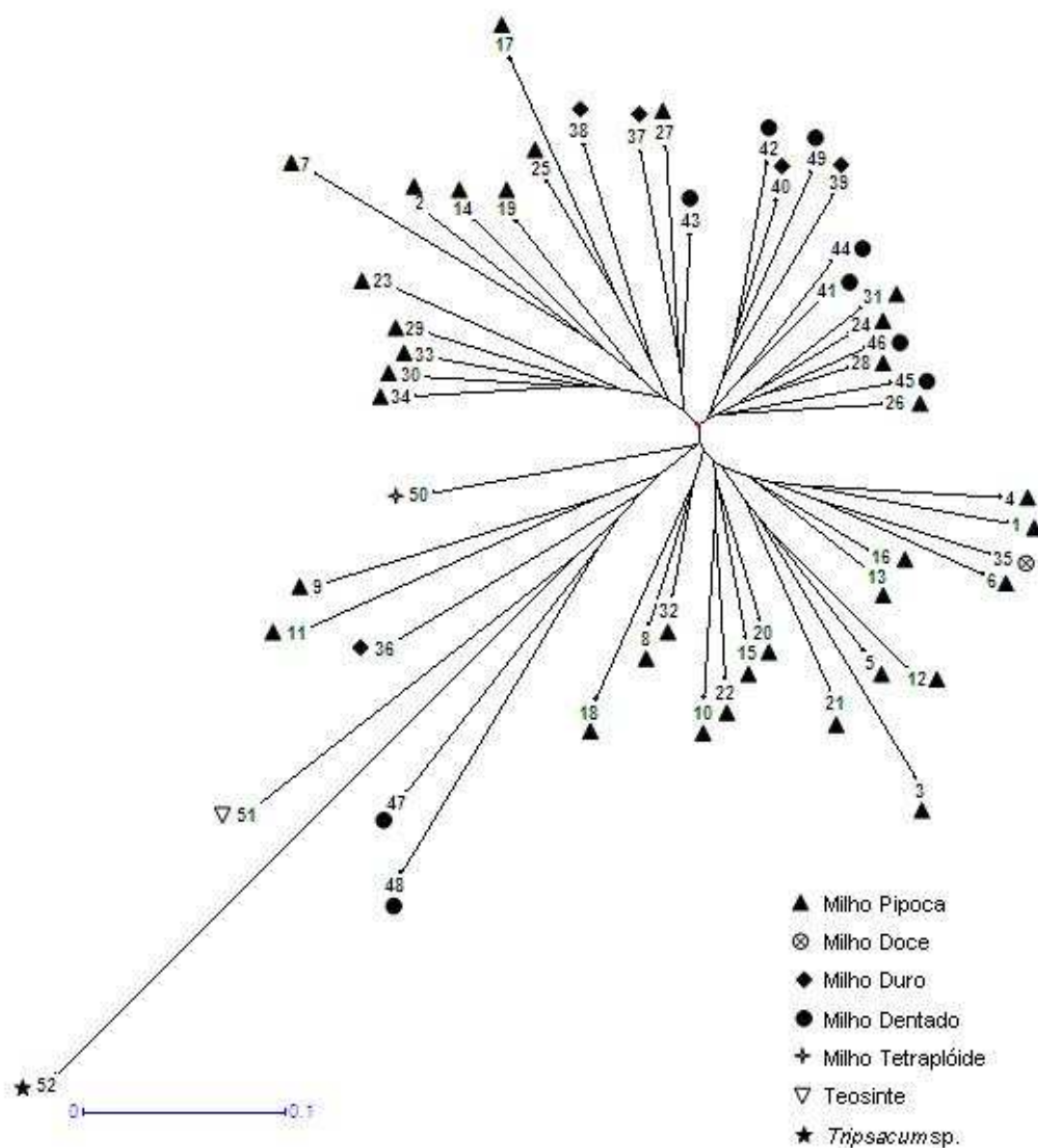


Figura 5 – Agrupamento por Neighbor-Joining para marcadores RAPD, com base no complemento aritmético do Índice de Jaccard, em genótipos de milho comum (dentado, duro e tetraploide), milho pipoca, milho doce e ancestral (teosinte e *Tripsacum* sp.).

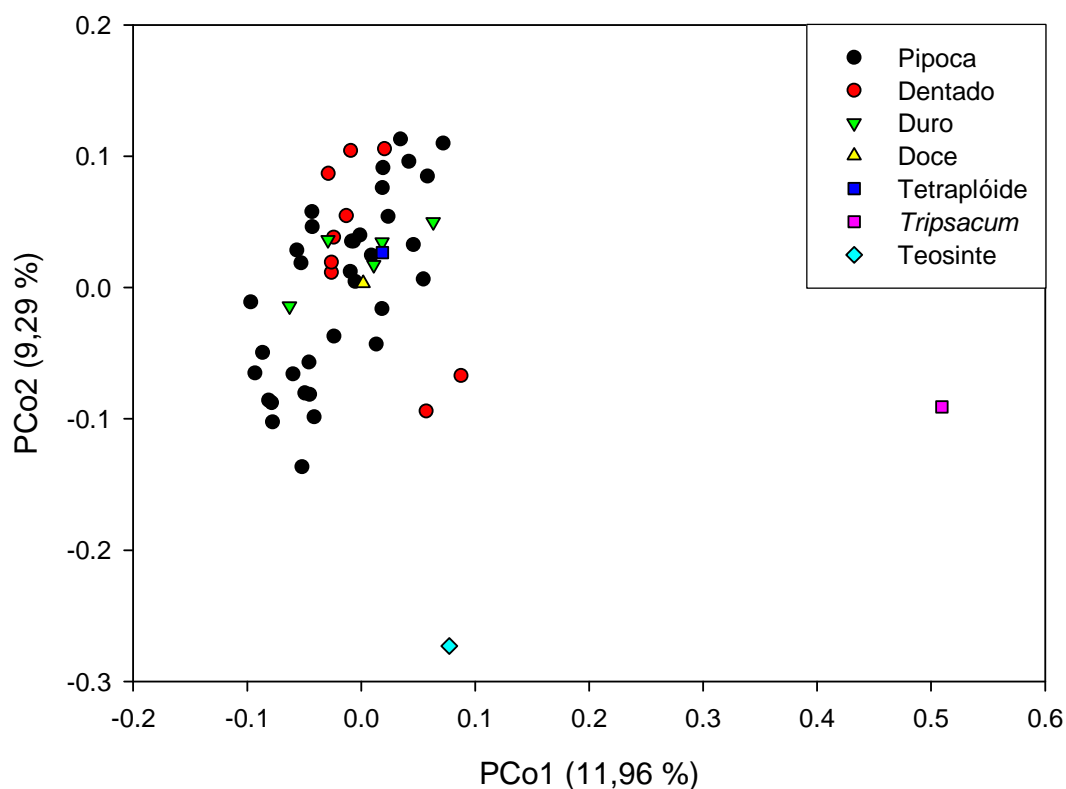


Figura 6 – Agrupamento por PCoA para marcadores RAPD, com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, em genótipos de milho comum (dentado, duro e tetraploide), milho pipoca, milho doce e ancestral (teosinte e *Tripsacum* sp.).

O marcador ISSR foi eficiente na separação dos ancestrais para com os demais genótipos, ratificando também a maior proximidade do teosinte em relação ao milho do que o *Tripsacum* sp., porém, com a vantagem de possibilitar a separação entre milho comum e pipoca (Figuras 7 e 8).

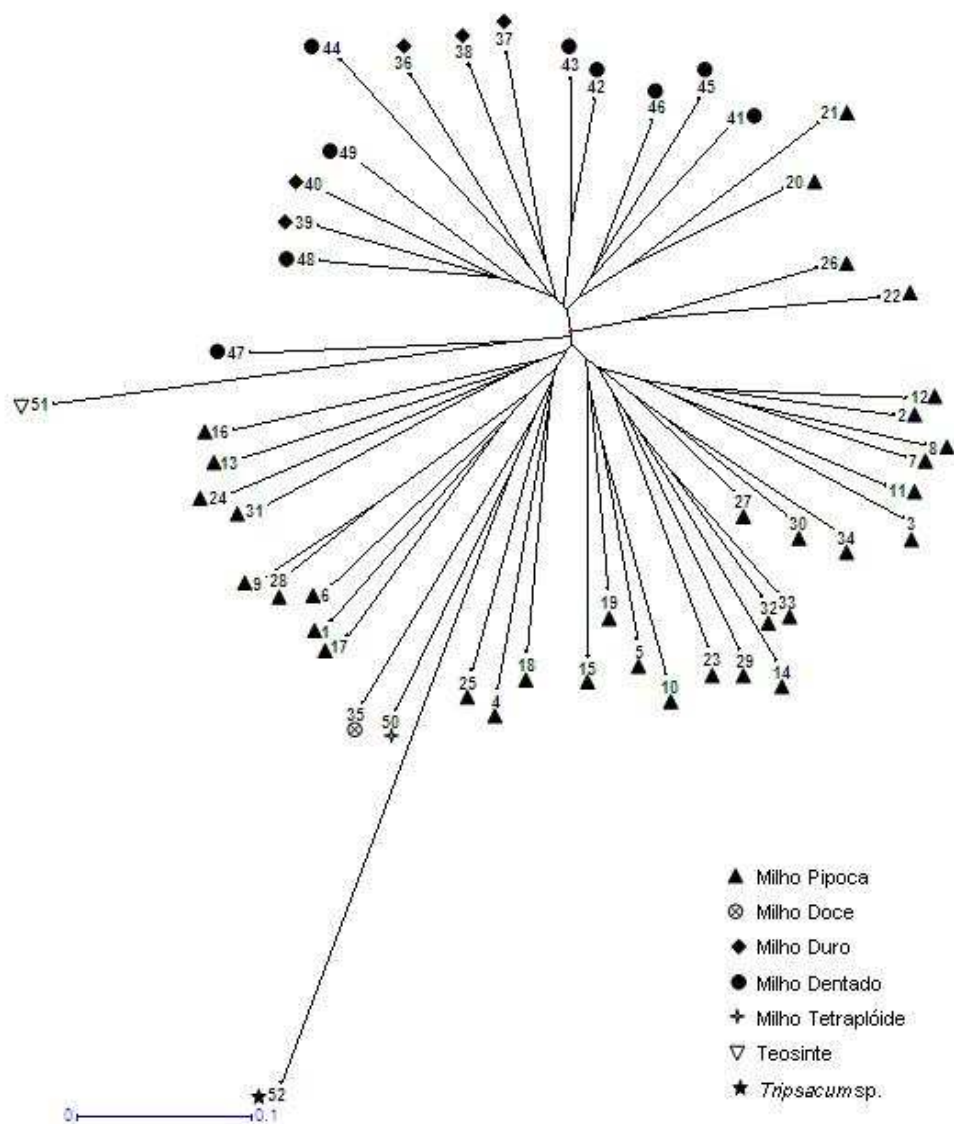


Figura 7 – Agrupamento por Neighbor-Joining para marcadores ISSR, com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, em genótipos de milho comum (dentado, duro e tetraploide), milho pipoca, milho doce e ancestral (teosinte e *Tripsacum* sp.).

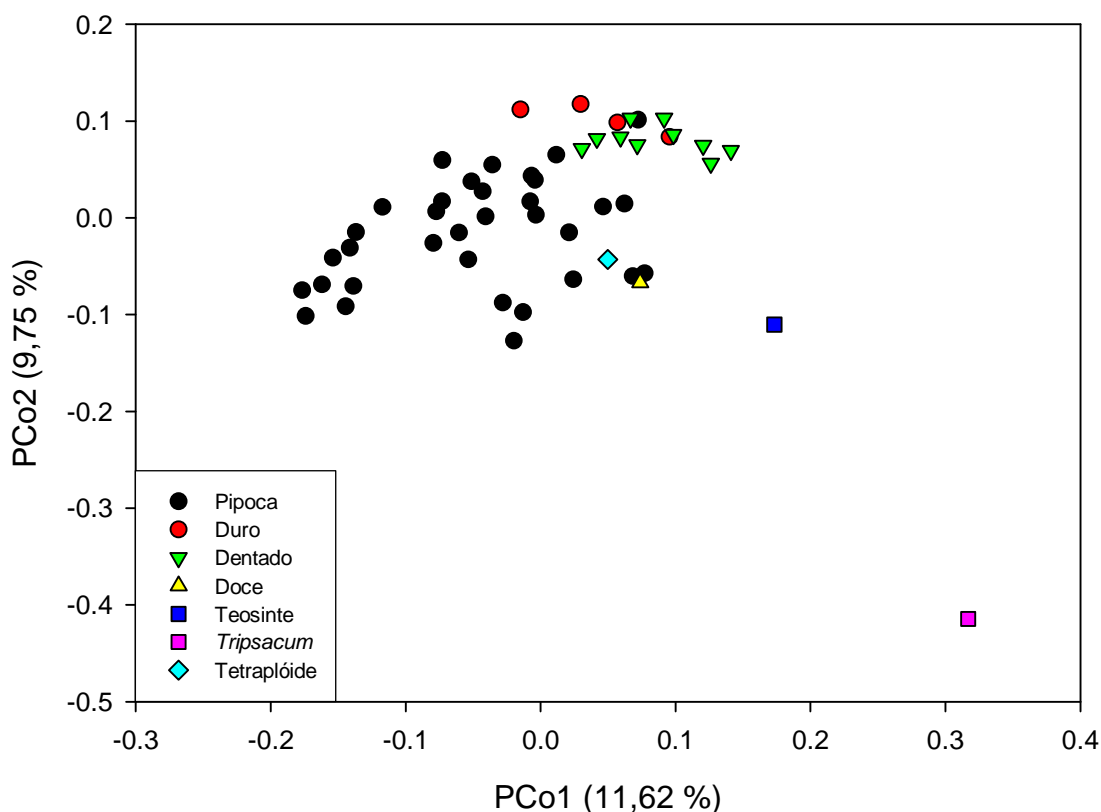


Figura 8 – Agrupamento por PCoA para marcadores ISSR, com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, em genótipos de milho comum (dentado, duro e tetraploide), milho pipoca, milho doce e ancestral (teosinte e *Tripsacum* sp.).

Neste sentido, a técnica RAPD, para este estudo, foi considerada insatisfatória para a formação de grupos heteróticos, sendo considerada, para fins de resultado, somente a técnica ISSR, possibilitando, assim, a comparação com a acurácia dos resultados obtidos por outros autores.

No entanto, outros trabalhos desenvolvidos pela técnica RAPD têm sido considerados aceitáveis, como exemplo, cita-se o trabalho de Vilela *et al.* (2008) que, por meio de marcadores RAPD, avaliaram o impacto da seleção recorrente na variabilidade genética da população UNB-2U e observaram que a seleção recorrente não proporcionou o estreitamento genético da população sob seleção. Outro trabalho é o de Carvalho *et al.* (2004), em que estudaram a divergência genética entre 81 acessos de milho comum por marcador RAPD e obtiveram, como resultado, que o tipo de agricultura praticada pelos pequenos agricultores de milho tem contribuído para a manutenção da variabilidade genética e que o

isolamento de produção é uma prática regular. E, em ambos os estudos, a técnica RAPD mostrou-se satisfatória.

Quanto aos resultados obtidos pela técnica ISSR, com base nas premissas de alguns autores (Goloubinoff *et al.*, 1993; Eubanks, 1997; Poggio *et al.*, 2000; Doebley, 2004) que corroboram a “hipótese do teosinte”, juntamente com a introgressão do *Tripsacum* sp. no milho, associando-as com os resultados aqui obtidos pela técnica ISSR, tem-se nova fundamentação (baseada em marcadores ISSR) para inferir sobre a genealogia do milho. É sensato inferir que o teosinte seja o ancestral do milho. Também que a diferenciação molecular entre o milho comum e o pipoca denota tratar-se de conjuntos gênicos distintos, a despeito de ambos serem da mesma espécie. Como os marcadores ISSR permitem detectar diferenças em nível de dinucleotídeos, essas ponderações são aceitáveis e atestam a eficiência da técnica ISSR, com discriminações sutis no genoma de espécies com mesma classificação botânica. Com isso, torna-se factível a realização de debates sobre a ancestralidade de milho pipoca em relação aos tipos de milho comum.

O dendrograma obtido por Neighbor-Joining revela que o teosinte está mais próximo do milho (de uma forma geral) em relação ao *Tripsacum* sp., além de o teosinte encontrar-se posicionado entre o milho comum (dentado e duro) e o milho pipoca (Figuras 7 e 8). Este resultado é apoiado pelo que foi obtido por Fu *et al.* (2009), com base no gene PSY1, quando puderam aferir, com a árvore obtida por Neighbor-Joining, que o teosinte (*Zea luxuriantes*) é ancestral do *Tripsacum* sp. e *Zea*, e que o *Tripsacum* sp. é ancestral do *Zea huehuetenangensis*, *Zea mexicana*, *Zea parviglumis* e *Zea diploperennis*, estando estes teosintes mais relacionados ao milho.

O *Tripsacum* sp., ao ser agrupado próximo ao milho tetraploide, permite uma abordagem interessante: a definição da origem poliploide destas espécies (*Zea* e *Tripsacum* sp.). Isso fundamenta que o evento de poliploidia possa ter ocorrido antes da divergência entre o *Tripsacum* sp. e *Zea*, mas após a divergência entre o milho e o sorgo. (Gaut *et al.*, 2000)

Importa, nesse momento, refletir, com base nos resultados aqui obtidos e de pesquisas anteriores, qual o tipo de milho surgiu primeiro. Segundo Eberhart (1979). a variedade do milho pipoca proveio do milho duro. Erwin, em 1949, também sugeriu que o milho pipoca tenha sido originado por mutação do milho

duro; porém, alguns autores mencionam que o mais antigo milho encontrado em tumbas pré-históricas é do tipo pipoca (Zinsly e Machado, 1980). Na Figura 7, visualiza-se que o *Tripsacum* sp. se encontra alocado próximo ao milho doce, e pode-se notar que o milho doce e o *Tripsacum* sp. foram agrupados com o milho pipoca. Em relação ao milho doce, por ter sido representado por apenas um indivíduo, não se pode afirmar que está mais relacionado com o ancestral *Tripsacum* sp. No entanto, constatou-se que o *Tripsacum* sp. possui marcas que são mais comuns ao milho doce e ao milho pipoca do que em relação ao milho comum. Talvez uma pesquisa, com resultados mais condizentes e com a maior semelhança de marcas ISSR do *Tripsacum* sp. para com o milho doce e milho pipoca, detectadas no presente trabalho, seja a de Poggio *et al.* (2005), em que sugeriram que o teosinte (*Zea mays parviglumis*) não é o único ancestral do milho e que a introgressão de *Tripsacum* sp. no milho não pode ser desconsiderada. Contudo, na pesquisa realizada por Poggio *et al.* (2005), por exemplo, foram utilizados somente milho comum e espécies relacionadas, não permitindo a inferência sobre os tipos de milho (comum, farináceo ou pipoca) ancestrais que possam ter participado da genealogia de *Zea mays*, dificultando a comparação com o presente estudo.

Porém, a pesquisa aqui realizada com os marcadores ISSR reforça proposições evolutivas de outros autores, isto é, que o teosinte é o ancestral mais próximo do milho e que não se pode descartar a possibilidade de introgressão de genes do *Tripsacum* sp. Gloubinoff *et al.* (1993), verificaram que o teosinte está mais relacionado com o milho comum do que com o *Tripsacum* sp. e, em consonância com Eubanks (1997), Poggio *et al.* (2000) e Poggio *et al.* (2005), comparando a relação entre milho comum, teosinte e *Tripsacum* sp., atestam a hipótese de que a hibridação entre o teosinte e *Tripsacum* sp. foi crucial na evolução do milho, não sendo o teosinte o único ancestral do milho. Destaca-se ainda que enquanto a introgressão do teosinte ocorreu para todos os tipos de milho, é possível que a introgressão de genes do *Tripsacum* sp. tenha ocorrido de forma mais abundante no milho doce e pipoca.

Quanto à formação de grupos por marcadores ISSR, pode-se verificar a separação em dois grupos distintos, nos quais se visualiza uma clara diferença entre o grupo do milho comum e o grupo do milho pipoca (Figuras 7 e 8), apesar de dois indivíduos pertencentes ao tipo pipoca terem sido agrupados com o milho

comum (dentado e duro), quais sejam: Boya 462 (número 26) e Beija-Flor (número 25). O milho pipoca Boya 462 pertence à região da Colômbia, foi doado pelo CIMMYT, e não foram encontrados relatos sobre os parentais. O milho Beija-Flor é uma variedade brasileira não melhorada e pertence ao banco de germoplasma da UFV (Universidade Federal de Viçosa).

Apesar da eficiência em separar o milho pipoca do milho comum, quando foram avaliados os representantes apenas do grupo de milho do tipo comum, conforme esta pesquisa, verifica-se que não foi possível a separação entre os milhos dentados (incluindo semidentado) e duro (incluindo semiduro), tanto pela análise por Neighbor-Joining quanto por PCoA. Tal lacuna não permitiu, portanto, inferir sobre a proximidade de qual grupo de milho comum (dentado ou duro) está mais relacionado com o milho pipoca. Caso semelhante foi evidenciado por Souza *et al.* (2008), ao efetuarem a análise comparativa da diversidade genética entre linhagens de milho, com base em marcadores RAPD e SSR, que também não obtiveram sucesso na separação dos grupos em dentado (e semidentado) e duro (e semiduro).

O que se pode verificar é que os acessos do tipo dentado e duro estão muito próximos, geneticamente. Como exemplo, cita-se o acesso Saracura, cedido pela Embrapa Milho o Sorgo, que é um composto de 36 variedades de milho, sendo selecionado desde 1986, para adaptação a solos encharcados, estando, atualmente, no 18º ciclo de seleção que foi agrupado próximo ao CIMMYT-11, que é um milho do tipo duro.

Para possibilitar a separação destes indivíduos, sugere-se utilizar outros iniciadores, que amplifiquem regiões relacionadas às características particulares dos grãos de cada grupo.

Os acessos, Dente de Burro, Maya, Maya Antigo e Azteca, foram relatados por Fidelis *et al.* (2005) como formas antigas de milho comum, que passaram por melhoramento, tendo sido lançadas no mercado por volta de 1960 e multiplicadas por pequenos agricultores.

Em se tratando de populações antigas, houve o agrupamento entre representantes de Centralmex, Cateto Amarelo, Maya, Dente de Burro e Azteca. Centralmex, composto obtido pelo Dr. Ernesto Paterniani na ESALQ/USP, em Piracicaba, teve na origem a recombinação de vários materiais Tuxpenos, de grãos dentados, originários do México. O Cateto Amarelo é do tipo dentado, com

o endosperma amarelo, porém não se tem conhecimento sobre sua origem. O acesso Maya é uma variedade Tuxpeno de grãos dentados gerada pelo IAC. Dente de Burro é uma população do tipo dentado, com endosperma amarelo. Pelas considerações de Fidelis *et al.* (2005), Dente de Burro, Maya e Azteca são materiais que passaram por seleções e, certamente, tiveram modificações nas frequências gênicas, distanciando-os de seus progenitores ancestrais.

Quanto ao acesso Azteca, da raça Tuxpeno de porte alto, dentado, apresentando a coloração do endosperma amarelo-alaranjado, utilizado como um dos parentais da variedade BR 106, o agrupamento não revelou proximidade com BR 106, que se classifica como semidentado, apresentando porte baixo e coloração do endosperma amarelo-alaranjada. Segundo Benchimol *et al.* (2000), BR 106 foi desenvolvido por intercruzamento de um composto brasileiro de maturação tardia (desenvolvido por intercruzamento de três populações) com uma população Mexicana com maturação precoce, seguido por três gerações de recombinação e seleção para planta com altura baixa e maturação precoce. Apesar de BR 106 conter em sua genealogia genes do acesso Azteca, provavelmente estes acessos não ficaram próximos devido às seleções e aos procedimentos de melhoramento aplicados ao BR 106, que constitui um cultivar recomendado.

Quanto aos materiais de raça Cateto, duas variedades de grão duro – Cateto Colômbia e o Cateto Sete Lagoas – ficaram alocadas próximo. O Cateto Roxo e o Cateto Amarelo ficaram separados dos outros catetos. O Cateto Roxo é do tipo semiduro, mas apresenta pericarpo marrom, enquanto os outros catetos apresentam o pericarpo incolor. Cateto Amarelo é o único do tipo dentado.

Merece destacar, de acordo com análise por Neighbor-Joining (Figura 7), a maior proximidade de Maya Antigo e o teosinte, denotando que, dentre os tipos de milho comum avaliados nesse trabalho, Maya Antigo, provavelmente, seja o mais remoto e possa conter fluxo de genes de teosinte ou, mesmo, de *Tripsacum* sp.

5.3. Divergência genética no Milho Pipoca

Considerando somente os 34 acessos de milho pipoca, com os mesmos 15 iniciadores de ISSR, um total de 126 fragmentos de DNA foi contabilizado com

uma média de 8,4 fragmentos por iniciador, sendo que 100 destes foram polimórficos (79,4%). A média de dissimilaridade encontrada foi de 79,9%. Neste estudo, verificou-se que o percentual de polimorfismo variou de 50,0 a 100%. O iniciador que apresentou maior quantidade de marcas polimórficas foi (GA)₈YC, com 11 fragmentos, enquanto o iniciador que expressou maior quantidade de fragmentos amplificados foi (GA)₈T, com 14 bandas. Dentre os iniciadores, os que expressaram, de forma relativa, maior percentual proporcional, de polimorfismo – 100% – foram: (CT)₈TG, (GT)₆CC e (GAA)₆AA (Tabela 8).

Tabela 8 – Fragmentos amplificados com oligonucleotídeos ISSR em milho pipoca.

Oligonucleotídeo	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Percentagem de Polimorfismo
(CT) ₈ RC	8	6	75
(CT) ₈ TG	4	4	100
(GA) ₈ T	14	9	64,3
(GA) ₈ YC	12	11	91,6
(CTC) ₅ RC	10	8	80
(GTC) ₆	8	6	75
(GA) ₆ CC	6	3	50
(GT) ₆ CC	7	7	100
(CAC) ₃ GC	8	5	62,5
(AG) ₈ YT	9	7	77,8
(AC) ₈ CT	7	5	71,4
(AC) ₈ YG	9	8	88,9
(CT) ₈ RG	8	6	75
(GGAT) ₃ GA	8	7	87,5
(GAA) ₆ AA	8	8	100
TOTAL	126	100	-
MÉDIA	8,4	6,7	79,9

Com base na matriz de dissimilaridade, os acessos mais similares foram PR 023 e TATU 2, distantes em 0,14. O acesso PR 023 possui o grão amarelo e, segundo Scapim *et al.* (2006), é derivado de híbridos norte-americanos e argentinos. O acesso TATU 2 contém grãos com o endosperma branco e foi disponibilizado à UEM por um produtor rural da região oeste do Paraná (região de Cascavel). Ambos os acessos são cultivados no Paraná. Em referência aos acessos mais divergentes, TATU 2 e Zélia, foram separados por uma distância de 0.48, sendo a distância média entre os acessos de 0,36 ($\pm 0,050$). O híbrido Zélia, desenvolvido pela Pioneer Hi-Bred, apresenta grãos tipo americano, endosperma

amarelo, elevado potencial de produção, capacidade de expansão de 35 mL.g^{-1} , mas é suscetível às principais doenças (*Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Physopella zea*, *Exserohilum turcicum*, *Phaeosphaeria maydis*, “Corn stunt” – enfezamento, e *Cercospora zea-maydis*). (Pionner, 2009)

Considerando o ponto de corte em 0,36 no dendrograma UPGMA, que permitiu a maior dispersão dos acessos, obteve-se a formação de cinco grupos (Figura 9).

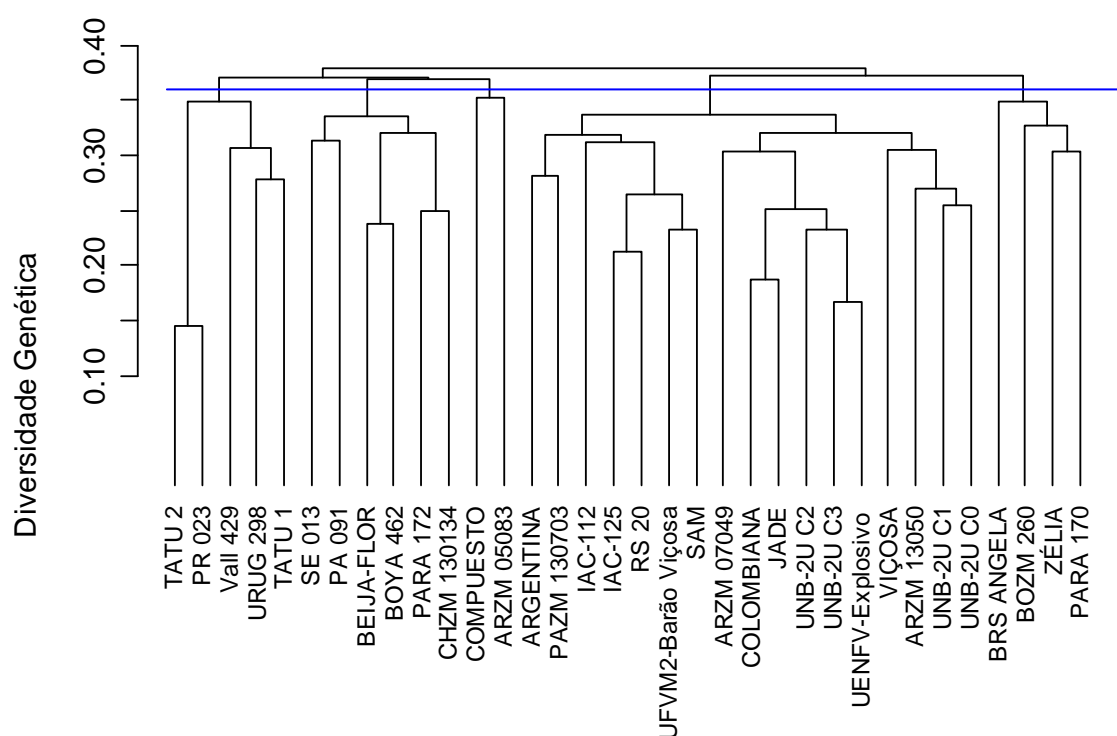


Figura 9 – Agrupamento por UPGMA para marcadores ISSR, com base no complemento aritmético do Índice de Jaccard, entre 34 acessos de milho pipoca.

TATU 1 e TATU 2 foram reunidos no primeiro grupo, apesar de apresentarem alguma distinção, como na cor do endosperma. São acessos oriundos da UEM, que foram disponibilizados por produtores rurais na região oeste do Paraná àquela instituição. Neste mesmo grupo, encontram-se PR 023 (variedade derivada de híbridos norte-americanos, desenvolvida na região noroeste do Paraná), podendo-se presumir que esses indivíduos contêm genes de ancestral comum, ou ainda que a adaptação ao clima tropical do oeste do Paraná possa ter provocado uma aparência genética entre esses três acessos.

No segundo grupo, foram reunidos os acessos SE 013 e PA 091, contrastando com os resultados de Silva *et al.* (2009) que, em análise da diversidade genética em milho pipoca, constataram a proximidade entre PR 023 e PA 091, justificada por serem variedades de polinização aberta, derivadas de híbridos norte-americanos. Porém, a justificativa de Silva *et al.* (2009) é pouco robusta para sustentar a proximidade genômica entre PR 023 e PA 091, sobretudo, porque, naquele mesmo estudo, esses acessos estiveram presentes em grupos distintos pelo método do Tocher.

No terceiro grupo, houve a reunião de duas raças, sendo uma da Argentina e outra do México

No quarto grupo, encontram-se os acessos brasileiros comerciais IAC-112, IAC-125, UFVM2 Barão Viçosa, RS 20 e Jade (Tabela 9). Apenas BRS Angela e Zélia, dentre os comerciais, não se reuniram aos demais acessos do quarto grupo, obtidos e comercializados no Brasil. BRS Angela apresenta o endosperma na cor branca, enquanto que, nos demais acessos comerciais, a matriz do endosperma é laranja. Em relação ao híbrido triplo Zélia, trata-se de material originado por cruzamento entre linhagens de clima temperado e tropical (Munhoz *et al.*, 2009), já os demais materiais comerciais são de clima tropical.

Nota-se que, no quarto grupo, também estão presentes os acessos SAM (*South American Mushroom*), Argentina, ARZM 13050, Colombiana e PAZM 130134, provavelmente por possuírem ancestral comum.

Oportuno destacar que o híbrido IAC-112 se originou da combinação de linhagens da variedade SAM, com linhagens provenientes do híbrido intervarietal Guarani x UFV Amarelo. A variedade SAM foi introduzida pelo IAC, em 1941, proveniente de *South American*, raça de origem Argentina e melhorada nos Estados Unidos da América. (Sawazaki, 1995)

Em consonância com o que ocorreu no presente trabalho, com a presença de parte dos materiais comerciais no quarto grupo, também Munhoz *et al.* (2009), ao avaliarem, por marcadores RAPD, a diversidade entre os acessos de milho pipoca, verificaram o agrupamento de materiais comerciais, bem como o isolamento de Beija-Flor e de Zélia. Em pesquisa utilizando características agrônômicas, Miranda *et al.* (2003), com base em dispersão gráfica e no método de otimização de Tocher, verificaram que Beija-Flor e Zélia ficaram dispostos em grupos distintos.

Tabela 9 – Características dos materiais melhorados no Brasil.

Cultivar	Tipo de material	Origem	Empresa
Zélia	Híbrido triplo	Linhas melhoradas	Pioneer Hi-bred
Jade	Híbrido triplo	Linhas melhoradas	Pioneer Hi-bred
Viçosa	Variedade	Sintetizado de variedades locais ("landraces") e cruzamento de híbridos norte-americano	Programa de Melhoramento de milho pipoca do departamento de Genética da Universidade Federal de Viçosa
BRS Angela	Variedade	Obtidas por seleção recorrente do composto CMS-43	Embrapa - Milho e Sorgo
UFVM2 Barão Viçosa	Variedade	-	Programa de Melhoramento de milho pipoca do departamento de Genética da Universidade Federal de Viçosa
RS 20	Variedade	Provavelmente obtida por gerações avançadas de híbrido norte-americano (Sawazaki, 1995)	Proveniente da FEPAGRO
IAC-112	Híbrido simples modificado	Oriundo da combinação de linhagens da variedade SAM, com linhagens provenientes do híbrido intervietal Guarani X UFV Amarelo	Instituto Agronômico de Campinas, IAC
IAC-125	Híbrido triplo (topcross)	Linhas Melhoradas, resistentes à toxicidade de alumínio.	Instituto Agronômico de Campinas, IAC

Ainda tomando por base o trabalho de Silva *et al.* (2009) que fez uso de microssatélites, ocorreu uma situação contundente: todos os genótipos comerciais desenvolvidos no país estiveram alocados em um único grupo, pelos métodos de Tocher e UPGMA.

A reunião, no quarto grupo do presente trabalho, da quase totalidade dos cultivares recomendados no país, associada aos demais resultados com marcadores moleculares e características morfoagronômicas, torna-se motivo de alerta para os poucos melhoristas de milho pipoca do Brasil, evidenciando a necessidade de aumentar a diversidade genética entre os programas de melhoramento nas instituições públicas e privadas.

O quinto grupo reuniu quatro indivíduos, sendo dois comerciais: o híbrido triplo Zélia e a variedade BRS Angela. O híbrido Zélia foi desenvolvido pela Pioneer Hi-Bred, e apresenta grãos tipo americano, endosperma amarelo, tendo sido oriundo do cruzamento de linhas temperadas e tropicais. (Pionner, 2009) Por sua vez, o BRS Angela, desenvolvido pela Embrapa - Milho e Sorgo, por meio de ciclos de seleção recorrente intrapopulacional, a partir do cruzamento entre CMS-

43 com a população Angela (BRA 065901), possui, como característica relevante, a cor branca do endosperma, o que dificulta sua aceitação no mercado, apesar da elevada capacidade de expansão dos grãos. Os outros dois são BOZM 260, da Bolívia, e Para 170.

Um fato interessante no agrupamento dos acessos é que, com exceção do Zélia, os demais apresentam a coloração do endosperma branca, podendo indicar que marcas encontradas nestes indivíduos provavelmente referem-se a ancestrais em comum ou a materiais de origem comum, que pode agrupar os indivíduos que apresentam coloração do endosperma branca.

A análise por coordenadas principais (PCoA) confirma os resultados obtidos por UPGMA, em que os cultivares comerciais revelaram proximidade genética com materiais em fase de recomendação (Figura 10). Ao contrário, os materiais não comerciais mostraram maior dispersão e podem constituir fonte de genes de interesse para programas de melhoramento, visando à ampliação da base genética e, mesmo, à introgressão de genes de resistência a doenças, além de outras opções de uso (Figura 10).

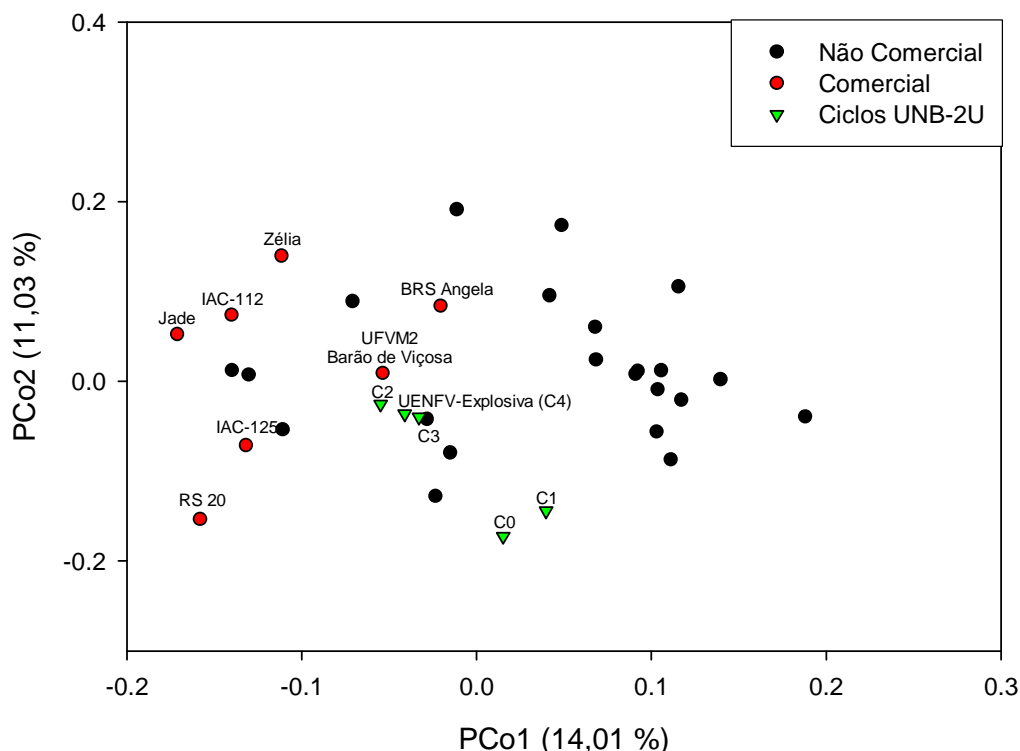


Figura 10 – Agrupamento por PCoA para marcadores ISSR, com base no complemento aritmético do Índice de Jaccard, de genótipos comerciais de milho pipoca (IAC-112, IAC-125, Zélia, Jade, RS 20, BRS Angela, UFVM2-Barão de Viçosa), gerações de seleção recorrente de UNB-2U (C0, C1, C2 e C3), UENFV-Explosiva (ciclo C4 de UNB-2U), e materiais não comerciais de polinização aberta.

Pelo exposto, pode-se inferir que cinco grupos foram formados, sendo: i) o grupo I, constituído por duas raças e três variedades de polinização aberta, todas sul-americanas; ii) o grupo II, formado por três variedades de polinização aberta e três raças, todas sul-americanas; iii) o grupo III, constituído por duas raças, sendo uma da Argentina e outra do México; iv) o grupo IV, que reuniu cinco cultivares (três híbridos e duas variedades), uma variedade em fase de recomendação (UENFV-Explosiva), quatro gerações de seleção recorrente com UNB-2U, duas variedades de polinização aberta (SAM e Viçosa) e quatro raças (três da Argentina e uma do Paraguai); e v) o grupo V, composto por dois cultivares (o híbrido Zélia, e a variedade de polinização aberta, BRS Angela) e duas raças (uma da Bolívia e outra do Paraguai).

Há que se destacar que houve maior dispersão genética dos materiais não comerciais (raças, variedades de polinização abertas não melhoradas e variedades de polinização aberta em fase de recomendação), seguida pelos comerciais. E, por fim, com as menores dispersões, obtiveram-se os ciclos de seleção recorrente de UNB-2U, sendo os três últimos ciclos bastante próximos (revelando até mesmo alguma sobreposição), embora com um pequeno distanciamento para os dois primeiros ciclos, isto é, um pouco afastados entre si. (Figura 10)

Li *et al.* (2004) examinaram a diversidade genética em relação a 56 linhagens de milho pipoca representantes de ampla base genética da cultura, além de 21 linhagens de milho comum, provenientes de diferentes grupos heteróticos de programas de melhoramento da China. Os autores verificaram a formação de agrupamentos diferenciados entre as linhagens de milho pipoca e comum, sendo que sete grupos heteróticos foram identificados, havendo grande concordância das linhagens intragrupos com estudos prévios de melhoramento.

Santacruz-Varela *et al.* (2004) utilizaram 29 marcadores morfológicos, 18 locos isoenzimáticos e 31 locos SSRs na avaliação da relação entre germoplasma de milho pipoca representativos das Américas. O estudo incluiu 56 populações dos E.U.A. e de nove países da América Latina, que foram dispersas em grupos, como base em análise de agrupamento e de componentes principais. Pela aglomeração dos genótipos, foi proposto o reconhecimento de três grupos, a saber: i) “Yellow Pearl Popcorn”, que representa o mais importante grupo comercial dos E.U.A.; ii) “North American Pointed Rice Popcorns”, que

provavelmente originou de complexo de raças tradicionais de milho pipoca da América Latina; e iii) “North American and North American Early Popcorn”, que têm grande relação com os tipos duro de milho comum do norte dos E.U.A.

Deve ser enfatizada que a quantificação da variabilidade genética ou, por outros termos, das diferenças entre as contrapartes alélicas de locos gênicos entre indivíduos é um dos pilares do melhoramento de plantas: para a identificação de genótipos geneticamente distantes, visando à utilização de distintos conjuntos gênicos em cruzamentos, para a obtenção de híbridos e segregantes superiores; ou para avaliar o grau de erosão genética ou mesmo para conhecer a amplitude da base genética de formas cultivadas ou em fase de domesticação e adaptação. (Miranda *et al.*, 2003; Dandolini *et al.*, 2008; Munhoz *et al.*, 2009)

5.3.1. Divergência genética entre os acessos de Milho Pipoca do Programa de Melhoramento da UENF (UNBs)

Na análise individual com as populações UNBs (UNB-2U C0, UNB-2U C1, UNB-2U C2, UNB-2U C3 e C4 ou UENFV-Explosiva), fez-se uso de 14 iniciadores – o iniciador (GA)₆CC, por não fornecer marcas polimórficas, foi descartado. Com estes, obteve-se um total de 83 fragmentos de DNA, com média de 5,9 fragmentos por iniciador, sendo que 43 destes foram polimórficos (51,8%). Os iniciadores que apresentaram maior quantitativo de marcas polimórficas foram (AC)₈YG, (GA)₈T e (CT)₈RG, com cinco fragmentos polimórficos cada.

Pelo complemento aritmético do Índice de Jaccard, obteve-se uma distância mínima de 0,17 entre as populações UNB-2U C3 e UENFV-Explosiva (C4), e uma distância máxima entre as populações UNB-2U C0 e UNB-2U C2, com o valor de 0,34 (Tabela 10). A distância média entre as populações foi 0,28 ($\pm 0,049$).

Tabela 10 – Distância genética ente os acessos UNBs de milho pipoca, com base no complemento aritmético do Índice de Jaccard para marcadores ISSR.

	UNB-2U C0	UNB-2U C1	UNB-2U C2	UNB-2U C3
UNB-2U C1	0,26866	-		
UNB-2U C2	0,33803	0,30986	-	
UNB-2U C3	0,31884	0,27536	0,26471	-
UENFV-Explosiva (C4)	0,32432	0,29730	0,22222	0,17391

Pelo agrupamento hierárquico UPGMA, obteve-se um coeficiente de correlação cofenética de 0.92. Um corte realizado na distância de 0.28, considerando-se o ponto de mudança abrupta, possibilitou a formação de dois grupos: i) um formado por UNB-2U C0 e UNB-2U C1, e ii) o segundo constituído por UNB-2U C2, UNB-2U C3 e UENFV-Explosiva (C4) (Figura 11).

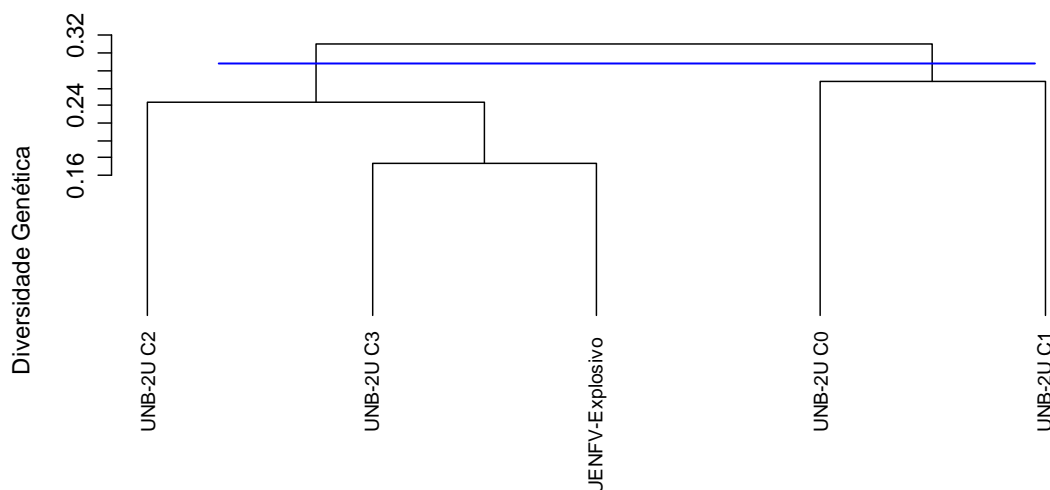


Figura 11 – Dendrograma por UPGMA das populações UNBs, com base em marcadores ISSR, utilizando, como estimativa de distância, o complemento aritmético do Índice de Jaccard.

Cumprе rememorar que o programa iniciou-se com a variedade de polinização aberta, UNB-2U, originada de UNB-2, após dois ciclos de seleção massal em Campos dos Goytacazes. A população UNB-2 originou-se de seleção em um ‘Composto indígena’, que a ESALQ/USP doou à UNB de Brasília. Com isso, gerou-se a população UNB-1, que foi cruzada com a variedade de milho pipoca Americana, cujas progênies selecionadas foram cruzadas com uma variedade de grãos amarelos e resistentes à helmintosporiose. Após dois ciclos de seleção massal, foi obtida uma população formada por plantas resistentes e de grãos amarelos. Tal população foi retrocruzada três vezes com a variedade Americana, originando a população UNB2.

O programa de melhoramento teve impulso, quando Pereira e Amaral Júnior (2001) avaliaram o potencial da população UNB-2U, possibilitando identificar a estratégia de melhoramento mais eficiente para obtenção de variedade melhorada. Pereira e Amaral Júnior (2001) utilizaram o Delineamento I (Comstock e Robinson, 1948), e avaliaram 92 famílias de irmãos completos e de meios-irmãos em dois ambientes contrastantes, com o intuito de definir a

estratégia de melhoramento que maximizasse os ganhos desejados. Os resultados evidenciaram a existência de suficiente variabilidade genética para a capacidade de expansão e de produção de grãos, e que os maiores ganhos, para estas características, seriam as possíveis seleções recorrentes entre famílias de irmãos completos.

Daros *et al.* (2002) implementaram o 1º ciclo de seleção recorrente na população UNB-2U, obtendo 75 famílias de irmãos completos, avaliando-as em dois ambientes (Campos dos Goytacazes e Itaocara, RJ). Os resultados revelaram a possibilidade de progresso genético de 10,39%, para a capacidade de expansão, e 4,69%, para a produção de grãos, com o este ciclo.

Diante dos resultados obtidos com o 1º ciclo de seleção na população-base, Daros *et al.* (2004a) implementaram o 2º ciclo, utilizando famílias endogâmicas S_1 . A seleção das famílias superiores, realizada com base no índice de seleção de Smith (1936) e Hazel (1943), proporcionou ganhos preditos de 26,95%, para a produção de grãos, e de 17,8%, para a capacidade de expansão.

O fato de as populações UNB-2U C0 e UNB-2U C2 serem as mais distantes, geneticamente, pode ser justificado pela estratégia de empregar a seleção em progênies S_1 para compor o ciclo C2. Para o milho pipoca, uma cultura mais frágil que o milho comum, os efeitos da depressão endogâmica são mais acentuados (Simon *et al.*, 2004), favorecendo mudanças abruptas nas frequências alélicas e, conseqüentemente, no comportamento da população sob seleção.

Por outro entendimento, a distinção dos grupos pode ser atribuída ao fato de que o avanço de ciclos (de C1 para C2), por meio de famílias endogâmicas S_1 , proporcionou os ganhos preditos mais expressivos, tanto para a produção de grãos quanto para a capacidade de expansão (respectivamente, 26,95% e 17,80%, conforme Daros *et al.*, 2004b), favorecendo maior diferenciação na variabilidade genética em relação à geração anterior.

Santos *et al.* (2007), ao obterem o 3º ciclo de seleção recorrente na população UNB-2U de milho pipoca, detectaram, novamente, suficiente variabilidade genética a ser explorada em ciclos futuros. Foram avaliadas 192 famílias de meios-irmãos e, com o emprego do índice de Mulamba e Mock (1978), verificou-se a possibilidade de ganhos genéticos de 7,16%, para a capacidade de expansão, e de 10,00%, para a produção de grãos.

Vilela *et al.* (2008), por meio de marcadores RAPD, avaliaram o impacto da seleção recorrente na variabilidade genética da população UNB-2U (UNB-2U C0, UNB-2U C1 e UNB-2U C2) e concluíram que a seleção recorrente, por diferentes estratégias de melhoramento (massal, irmãos-completos e famílias S₁), não proporcionou o estreitamento genético da população sob seleção.

É oportuna a repetição da análise dos resultados de Vilela *et al.* (2008), pelas informações aqui obtidas para as dispersões gráficas dos ciclos, com base nas Figuras 10 e 11. Pelos resultados atuais, é inegável que houve um afastamento genético dos ciclos CO e C1 em relação aos C2, C3 e C4 (esse último, denominado UENFV-Explosiva). Pode-se afirmar que há variação entre C2, C3 e C4, sobretudo, C2 em relação aos ciclos posteriores.

Todavia, a análise mais acurada da Figura 10 clarifica que há forte similaridade entre C2, C3 e C4, provavelmente decorrente da parecença de indivíduos entre os sucessivos ciclos, em razão do tamanho maior que passou a ser adotado na obtenção das progênies, bem como da percepção de que o mais importante é a seleção em valores absolutos e não em proporções percentuais.

Nesse aspecto, a seleção, em termos absolutos, de 30 progênies, oriundas da avaliação de famílias nos ciclos, que variaram em 192 a 200, em vez de focar na seleção percentual, pode ter favorecido a possibilidade de ocorrência de indivíduos mais semelhantes entre os ciclos consecutivos.

Com relação aos consequenciais ganhos seletivos, Freitas Júnior *et al.* (2009) concluíram o 3º ciclo e obtiveram o 4º ciclo de seleção recorrente na população UNB-2U, desta vez, com famílias de irmãos completos. Os autores constaram a possibilidade de progressos genéticos de 8,50%, para a capacidade de expansão e 10,55%, para o rendimento de grãos, com o uso do índice de Mulamba e Mock (1978).

Na consecução do 5º ciclo de seleção recorrente, Rangel (2009) obteve valores preditos de médias das progênies de irmãos completos de 29,30 mL.g⁻¹ e de 2.920,93 kg.ha⁻¹, para a capacidade de expansão e rendimento de grãos, respectivamente. Associando-se essas predições às respectivas herdabilidades, com base nas médias das parcelas, com estimativas de 0,9680 e 0,6247, obtêm-se os ganhos truncados em valores absolutos de 2,77 mL.g⁻¹ e 219,4133 Kg.ha⁻¹. Isso revela uma situação promissora para a recomendação de cultivar para o Norte e Noroeste Fluminense.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Mediante o ajuste de metodologia de PCR, foi utilizada a técnica *Touchdown*, que proporcionou maior eficiência na amplificação das bandas. Pela análise por Neighbor-Joining e PCoA, foi possível verificar a separação dos ancestrais dos demais genótipos, o que ratifica a proximidade do teosinte com o milho em relação ao *Tripsacum* sp.; e também a possibilidade de separação entre o milho comum e o pipoca, constatando-se que o *Tripsacum* sp. possui marcas que são mais comuns ao milho doce e ao milho pipoca do que em relação ao milho comum. Considerando somente os milhos pipoca, pelo método de agrupamento UPGMA, obteve-se a formação de cinco grupos, sendo que o quarto grupo uniu os acessos brasileiros comerciais IAC-112, IAC-125, UFVM2 Barão Viçosa, RS 20 e Jade, com exceção do BRS Angela e Zélia, evidenciando um estreitamento da base genética e a necessidade de aumentar a diversidade genética nos programas de melhoramento, realizados por instituições públicas e privadas.

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir, de forma resumida, que:

- a) A técnica *Touchdown*-PCR proporcionou, à cultura do milho, melhores resultados na amplificação de bandas;
- b) A técnica ISSR possibilitou a separação entre os ancestrais e os demais genótipos, ratificando a proximidade do teosinte ao milho em geral, quando

comparada ao *Tripsacum* sp. e possibilitou a separação do milho comum e do pipoca;

c) A formação de grupos heteróticos possibilitou observar um possível estreitamento da base genética entre os cultivares de milho pipoca disponíveis comercialmente;

d) Pela divergência genética da população de milho pipoca UNB-2U, houve maior afastamento genético entre os ciclos C0 e C1 em relação aos C2, C3 e UENFV-Explosiva (C4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, C.G.; Schuster, I.; Amaral Júnior, A.T.; Scapim, C.A.; Vieira, E.S.N. (2008) Heterotic groups in tropical maize germoplasm by test crosses and simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, 7(4):1233-1244.
- Ajmone-Marsan, P.; Castiglioni, P.; Fusari, F.; Kuiper, M.; Motto, M. (1998) Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 96:219-227.
- Alexander, D.E.; Creech, R.G. (1977) Breeding special industrial and nutritional types. In: Sprague, G.F.; Fucillo, D.A. *Corn and corn improvement*. Madison, American Society of Agronomy, p. 363-386.
- Almeida, C.C.S. (2003) *Análise citogenética e molecular em milho (Zea mays subsp. mays), teosinto (Zea mays subsp. mexicana) e seus híbridos*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Porto Alegre – RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 57p.
- Amaral Júnior, A.T.; Casali, V.W.D.; Cruz, C.D.; Finger, F.L. (1996) Utilização de variáveis canônicas e de análise de agrupamentos na avaliação da divergência genética entre acessos de moranga (*Cucurbita maxima Duchesne*). *Horticultura Brasileira*, 14:182-184.

- Anderson, T.W. (1984) *An introduction to multivariate statistical analysis*. 2 ed. New York: John Wiley, 451p.
- Austin, D.F.; L.M.; Veldboom, L.R.; Hallauer, A.R. (2000) Genetic mapping in maize with hybrid progeny across testers and generations: grain yield and grain moisture. *Crop Science*, 40:30-39.
- Balestre, M.; Machado, J.L.; Lima, J.C.; Souza, J.C.; Nóbrega Filho, L. (2008) Genetic distance estimates among single cross hybrids and correlation with specific combining ability and yield in corn double cross hybrids. *Genetics and Molecular Research*, 7(1):65-73.
- Barata, C.; Carena, M. (2006) Classification of North Dakota maize inbred lines into heterotic groups base on molecular and testcross data. *Euphytica*, 151:339-349.
- Barbé, T.C.; Amaral Júnior, A.T.; Gonçalves, L.S.A.; Rodrigues, R.; Scapim, C.A. (2009) Association between advanced generations and genealogy in recombined inbred lines of snap bean by the Ward-Modified Location Model. *Euphytica*, DOI: 10.1007/s10681-009-0089-z.
- Beadle, G.W. (1939) Teosinte and the origin of maize. *J. Hered*, 30:235-247.
- Beadle, G.W. (1978) Teosinte and the origin of maize. *In*: Walden, D.B. (ed.). *Maize breeding and genetics*. New York, Jhon Wiley & Sons, 8:113-141.
- Benchimol, L.L.; Souza Jr, C.L.; Garcia, A.A.F.; Kono, P.M.S.; Mangolin, C.A.; Barbosa, A.M.M.; Coelho, A.S.G.; Souza, A.P. (2000) Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. *Plant Breeding*, 119:491-496.
- Bernardo, R. (2008) Molecular markers and selection for complex traits plants : learning from the last 20 years. *Crop Science*, 48:1649-1664.

- Birchler, J.A.; Auger, D.L.; Riddle, N.C. (2003) In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* 15:2236-2239.
- Borém, A.; Caixeta, E.T. (2006) *Marcadores Moleculares*. Viçosa, MG, p.374.
- Borém, A.; Miranda, G.V. (2005) *Melhoramento de plantas*. Viçosa, MG: UFV, 525p.
- Bruce, A.B. (1910) The mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science*, 32(827):627-628.
- Bruel, D.C.; Carpentieri-Pípolo, V.; Ruas, C.F.; Gerage, A.C.; Souza, S.G.H. (2007) Assessment of genetic diversity in maize inbred lines using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 7:173-178.
- Brunson, A.M. (1937) Popcorn breeding. *Yearbook Agricultural*. 1:395-404.
- Buckler, E.S.; Holtsford, T.P. (1996) *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution*, 13:612-622.
- Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B.; Brito, G.G.; Sakiyama, N.S. (2006) Tipos de Marcadores Moleculares. *In*: Borém, A.; Caixeta, E.T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. Viçosa: Editora UFV, p. 09-78.
- Carpentieri-Pípolo, V.; Takahashi, H.W.; Endo, R.M.; Petek, M.R.; Seifert, A. (2002) Correlações entre caracteres quantitativos em milho pipoca. *Horticultura Brasileira*, 20(4):551–554.
- Carvalho, V.P.; Ruas, P.M.; Ruas, C.F.; Ferreira, J.M.; Moreira, R.M.P. (2002) Assessement of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2:577-568.

- Carvalho, V.P.; Ruas, C.F.; Ferreira, J.M.; Rosângela, M.P.M.; Ruas, P.M. (2004) Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetic and Molecular Biology*, 27(2):228-236.
- CEASA-Campinas (2009) *Boletim informativo diário de preços*: www.ceasacampinas.com.br/cotacoes/documentos/cotacao.pdf em 11/11/2009.
- Clark, R.M.; Wagler, T.N.; Quijada, P.; Doebley, J. (2006). A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture. *Nature Genetics*. 38(5):594-597.
- Cole-Rodgers, P.; Smith, D.W.; Bosland, P.W. (1997) A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. *Crop Science*, 37:1000-1002.
- Collard, B.C.Y.; Mackill, D.J. (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions the Royal Society*, 363:557-572.
- Comstock, R.E.; Robinson, H.F. (1948) The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics*, 4:254-266.
- Conab – Companhia Nacional de Abastecimento (2009) *Acompanhamento da safra Brasileira: grãos*. Décimo segundo levantamento, Brasília: <http://www.conab.gov.br> em 29/11/2009.
- Crossa, J.; Franco, J. (2004) Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica*, 137:19-37.
- Cruz, J.C.; Pereira Filho, I.A. (2008) *Milho – Cultivares para 2008/2009*. Embrapa Milho e Sorgo: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php> em 01/11/2008.

- Cruz, C.D.; Regazzi, A.J.; Carneiro, P.C.S. (2008) *Modelos biométricos aplicadas ao melhoramento genético*. 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, v.2. 585p.
- Cruz, C.D. (2005) *Princípios de genética quantitativa*; Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 394p.
- Cruz, C.D. (2006) *Programa Genes: Versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística*. 2. ed. UFV: Imprensa Universitária, 648p.
- Dandolini, T.S.; Scapim, C.A.; Amaral Júnior, A.T.; Mangolin, C.A.; Machado, M.F.P.S.; Mott, A.S.; Lopes, A.D. (2008) Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8:313-320.
- Daros, M.; Amaral Junior, A.T.; Pereira, M.G. (2002) Genetic gain for grain yield and popping expansion in a full-sib recurrent selection in popcorn. *Crop Breeding And Applied Biotechnology*, 2:339-344.
- Daros, M.; Amaral Júnior, A.T.; Pereira, M.G.; Santos, F.S.; Gabriel, A.P.C., Freitas Júnior, S.P. (2004a) Recurrent selection in inbred popcorn families. *Scientia Agricola*, 61:609-614.
- Daros, M.; Amaral Júnior, A.T.; Pereira, M.G.; Santos, F.S.; Scapim, C.A.; Freitas Júnior, S.P.; Daher, R.F.; Ávila, M.R. (2004b) Correlações entre caracteres agronômicos em dois ciclos de seleção recorrente em milho-pipoca. *Ciência Rural*, 34:1389-1394.
- Davenport, C.B. (1908) Degeneration, albinism and inbreeding. *Science*, 28(718):454-455.
- Dennis, E.S; Sachs, M.M.; Gerlach, W.L.; Finnegan, E.J.; Peacock, W.J. (1985) Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase 2 (*Adh2*) gene of maize. *Nucleic Acids Research*, 13:727-743.

- Doebley, J.; Stec, A. (1993) Inheritance of the Morphological Differences Between Maize and Teosinte: comparison of results for two F₂ populations. *Genetics*, 134:559-570.
- Doebley, J.F.; Goodman, M.M.; Stuber, C.W. (1984) Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). *Syst Bot*, 9:203–218
- Doebley, J. (2004) The Genetics of Maize Evolution. *Annual Review of Genetics* 38:37-59.
- Don, R.H.; Cox, P.T.; Wainwright, B.J.; Baker, K.; Mattick, J.S. (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19:14.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- East, E.M. (1936) Heterosis. *Genetics*, 21:375.
- Eathington, S.R.; Crosbie, T.M.; Edwards, M.D.; Reiter, R.S.; Bull, J.K. (2007) Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Science*, 47:154-163.
- Eberhart, S.A. (1979) *Ciba-Geigy Agrochemicals. Maize*. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy Agrochemicals. 105p.
- Embrapa Milho e Sorgo (2009) *Produtos – Milho: Variedade de milho*: <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/produtosmilho.php> em 29/11/2009.
- Engels, J.M.M. Ebert, A.W. Thormoann, I. Vicente M.C. (2006) Centre of crop diversity and/or origin, genetically modified crops and implications for plant genetic resources conservation. *Genetic Resources and Crop Evolutions*, 53:1675-1688.

- Erwin, A.T. (1949) The origin and history of popcorn. *Agron. J.*, 41:53-56.
- Eubanks, M.W. (1997) Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 94:707-712.
- Eyre-Walker, A.; Gaut, R.L.; Hilton, H.; Feldman, D.L.; Gaut, B. (1998) Investigating the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:4441-4446.
- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Tradução de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos da Silva. Viçosa: UFV, 279p.
- Faria, V.R.; Viana, J.M.S.; Sobreira, F.M.; Silva, A.C. (2008) Seleção recorrente recíproca na obtenção de híbridos interpopulacionais de milho-pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(12):1749-1755.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p.
- Fidelis, R.R.; Miranda, G.V.; Santos, I.C.; Galvão, J.C.C. (2005) Metodologia de seleção de cultivares de milho para eficiência na absorção e utilização de nitrogênio. *Revista Ceres*, 52(304):987-1002.
- Freitas Júnior, S.P.; Amaral Júnior, A.T.; Pereira, M.G.; Cruz, C.D.; Scapim, C.A. (2006) Capacidade combinatória em milho pipoca por meio de dialelo circulante. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:1599-1607.
- Freitas Júnior, S.P.; Amaral Júnior, A.T.; Rangel, R.M.; Viana, A.P. (2009) Genetic gains in popcorn by full-sib recurrent selection. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9:1-7.
- Freitas, F.O. (2001) *Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (Zea mays mays, L.) e feijão (Phaseolus vulgaris, L.)*.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, 144p.

Fu, Z.; Yan, J.; Zheng, Y.; Warburton, M.L.; Crouch, J.H.; Li, J.S. (2009) Nucleotide diversity and molecular evolution of the PSY1 gene in *Zea mays* compared to some other grass species. *Theoretical and Applied Genetics*, DOI: 10.1007/s00122-009-1188-x.

Galinat, W.C. (1974) Intergenomic mapping of maize, teosinte and *Tripsacum*. *Evolution*, 27:644-55.

Galinat, W.C. (1979) *Ciba-Geigy Agrochemicals*. Maize. Basle, Switzerland: Ciba-Geigy Agrochemicals. 105p.

Gaut, B.S.; d’Ennequin, M.L.T.; Peek, A.S.; Sawkins, M.C. (2000) Maize as model for the evolution of plant nuclear genomes. *PNAS*, 97(13):7008-7015.

Geraldi, I.O.; Miranda Filho, J.B.; Vencovsky, R. (1985) Estimates of genetic parameters for tassel characters in maize (*Zea mays* L.) and breeding perspectives. *Maydica*, 30:1.

Ghaderi, A.; Adams, M.W.; Nassib, A.M. (1984) Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in dry edible bean and faba bean. *Crop Science*, 24:37- 42.

Goloubinoff, P.; Paabo, S.; Wilson, A.C. (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archeological specimens. *PNAS*, 90:1997-2001.

Gonçalves, L.S.A.; Rodrigues, R.; Amaral Júnior, A.T.; Karasawa, M.; Sudré, C.P. (2008) Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, 7 (4):1289-1297.

- Gonçalves, L.S.A.; Rodrigues, R.; Amaral Júnior, A.T.; Karasawa, M.; Sudré, C.P. (2009) Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological. *Genetics and Molecular Research*, 8 (1):364-374.
- Goodnam, M.M. (1980) *Melhoramento e produção do milho no Brasil*: Botânica. Piracicaba/ESALQ, Marprint, 2ª impressão. 650 p. ilus.
- Goodman, M.M. (1990) Genetic and germplasm stocks worth conservating. *Journal of Heredity*, 81:11-16.
- Goodnam, M.M.; Smith, J.S.C. Botânica *In*: Paterniani, E. e Viegas, G. P. (1987) *Melhoramento e produção de milho*. Campinas, Fundação Cargill, 1:41-78.
- Gower, J.C. (1971) A general coefficient of similarity and of its properties. *Biometrics*, 27:857-874.
- Guia do Milho (2008) *Milho - Tecnologia do Campo á mesa*. Conselho de Informação sobre Biotecnologia. Embrapa Milho e Sorgo.
- Guimarães, C.T. (2003) Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento de milho. *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA.
- Hallauer, A.R.; Miranda Filho, J.B. (1988) *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Iowa State Univ. Press., Ames (Iowa), 468p.
- Hallauer, A.R. (1973) Hybrid development and population improvement in maize by reciprocal full-sib selection. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 2:84-101.
- Hazel, L.N. (1943) The genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics*, 28:476-490.

- Hilton, H.; Gaut, B.S. (1998) Speciation and Domestication in Maize and Its Wild Relatives: Evidence From the *Globulin-1* Gene. *Genetics*, 150:863-872
- Hyndman, D.L.; Mitsuhashi, M. (2003) PCR primer design. *Methods in Molecular Biology*, 226:81–88.
- Illis, H.H. (1983) From teosinte to maize: the catastrophic sexual transmutation. *Science*, 222:886-894.
- Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44:223-270.
- Kantety, R.V.; Zeng, X.; Bennetzen, J.; Zehr, B.E. (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding*, 1:365-373.
- Keeble, F.; Pellew, C. (1910) The mode of inheritance of stature and flowering time in peas (*Pisum sativum*). *J. Genet.*, 1:47-56.
- Koo, D.; Jiang, J. (2008) Extraordinary tertiary constrictions of *Tripsacum dactyloides* chromosomes: implications for karyotype evolution of polyploids driven by segmental chromosome losses. *Genetics*, 179:1119-1123.
- Kubista, M.; Andrade, J.M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jónak, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjoback, R.; Sjogreen, B.; Strombom, L.; Ståhlberg, A.; Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:95-125.
- Laborda, P.R. (2003) *Diversidade genética entre linhagens de milho tropical: estudo com base em marcadores moleculares*. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia – UNICAMP, 103p.

- Lamb, J.C.; Birchler, J.A. (2006) Retroelement genome painting: cytological visualization of retroelement expansions in the genera *Zea* and *Tripsacum*. *Genetics*, 173:1007-1021.
- Larish, L.L.B.; Brewbaker, J.L. (1999) Diallel analyses of temperate and tropical popcorns. *Maydica*, 44:279-284.
- Lemos, G.C.S. (2001) *Monitoramento morfoagronômico, molecular e citológico da introgressão de genes em tripsacóides*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 66p.
- Lemos, G.C.S.; Pereira, T.N.S.; Pereira, M.G.; Amaral Júnior, A.T. (2005) Biometric analysis of *Tripsacum*-maize hybrid populations.. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5:64-70.
- Li, Y.; Shi, Y.; Cao, Y.; Wang, T. (2004) Establishment of a core collection for maize germplasm preserved in Chinese National Genebank using geographic distribution and characterization data. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 51:845-852.
- Machado, P.F. (1997) *Efeitos das condições de colheita e secagem sobre a capacidade de expansão de milho pipoca*. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Viçosa – MG, UFV, 41p.
- Mangelsdorf, P.C.; Reeves, R.G. (1939) The origin of Indian corn and its relatives. *Agr. Exp. Sta. Bull*, 574:1-315.
- Mangelsdorf, P.C. (1974) *Corn: Its Origin. Evolution and Improvement*. Cambridge, MA: Belknap Press. 262p.
- Mangelsdorf, P.C.; Mc Neish, R.S.; Galinat, W.C. (1964) Domestication of corn. *Science*, 143: 538-545.

- Market, C.; Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45:753-763.
- Martins, M.; Tenreiro, R.; Oliveira, M.M. (2003) Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep*, 22:71-78.
- Martins, M.; Sarmiento, D.; Oliveira, M.M. (2004) Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep*, 23:492-496.
- Matsuoka, Y.; Vigouroux, Y.; Goodman, M.M.; Sanchez, J.; Buckler, G.E. (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedure of National Academy Science*, 99:6080-6084.
- Matta, F.P.; Viana, J.M.S. (2001) Teste de capacidade de expansão em programas de melhoramento de milho pipoca. *Science Agricola*, 58(4):845-851.
- Mattos, J.L.S. (2003) Gramíneas forrageiras anuais alternativas para a região do Brasil central. *Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais*, 2(1):52-70.
- Meyers, B.C.; Tingey, S.V.; Morgante, M. (2001) Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*, 11:1660-1676.
- Milach, S.C.K. (1998) *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.17-28.
- Mingoti, A.S. (2007) *Análise de dados através de métodos de estatística multivarida*. Belo Horizonte: Editora UFMG, 295p.

- Miranda, G.V.; Coimbra, R.R.; Godoy, C.L.; Souza, L.; Guimarães, L.J.; Melo, A.V. (2003) Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho de pipoca. *Pesq. Agropecuária Brasileira*, 38:681-688.
- Miranda, G.V.; Souza, L.V.; Galvão, J.C.C.; Guimarães, L.J.M.; Melo, A.V.; Santos, I.C. (2008) Genetic variability and heterotic groups of Brazilian popcorn populations. *Euphytica*: DOI 10.1007/s10681-007-959-9.
- Mohammadi, S.A.; Prasanna, B.M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- Moll, R.H.; Lonquist, J.H.; Fortuna, J.V.; Johnson, E.C. (1965) The relation of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics*, 52:139-144.
- Mulamba, N.N.; Mock, J.J. (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 7:40-57.
- Munhoz, R.E.F.; Prioli, A.J.; Amaral-Júnior, A.T.; Scapim, C.A.; Simon, G.A. (2009) Genetic distances between popcorn populations based on molecular markers and correlations with heterosis estimates made by diallel analysis for hybrids. *Genetics and Molecular Research*. 8(3):951-962.
- Núñez, M.; Villarroya, A.; Oller, J.M. (2003) Minimum distance probability discriminant analysis for mixed variables. *Biometrics*, 59:248-253.
- Oliveira, J. M. Vaz. (1984) *O milho*. LISBOA: Clássica, 214p.
- Oliveira, K.M.; Laborda, P.R.; Garcia, A.A.F.; Paterniani, M.E.A.G.; Souza, A.P. (2004) Evaluating genetic relationships between tropical maize inbred lines by means of AFLP profiling. *Hereditas*, 140:24-33.

- Ortiz, R.; Sevilla, R.; Alvarado, G.; Crossa, J. (2008) Numerical classification of related Peruvian highland maize races using internal ear traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55:1055-1064.
- Osipova, E.S.; Koveza, O.V.; Troitskij, A.V.; Dolgikh, Y.I.; Shamina, Z.B.; Gostimskij, S.A. (2003) Analysis of Specific RAPD and ISSR Fragments in Maize (*Zea Mays* L.) Somaclones and Development of SCAR Makers on Their Basis. *Russian Journal of Genetics*, 39:1412-1419.
- Pacheco, C.A.P.; Gama, E.P.; Guimarães, P.E.O.; Santos, M.X.; Ferreira, A.S. (1998) Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e CMS-43 de milho pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33(12):1995-2001.
- Pacheco, C.A.P.; Gama, E.E.G.; Parentoni, S.N.; Santos, M.S.; Lopes, M.A.; Ferreira, A.S.; Fernandes, F.T.; Guimarães, P.E.O.; Correa, L.A.; Meirelles, W.F.; Feldman, R.O.; Magnavaca, R. (2000) *BRS Angela: Variedade de milho pipoca*. Comunicado Técnico, Embrapa Milho e Sorgo, p.1-6.
- Pacheco, C.A.P.; Gama, E.E.G.; Parentoni, S.N.; Santos, M.S.; Guimarães, P.E.O. (2004) *Variedade de milho pipoca BRS Angela – novo ciclo de seleção*. Embrapa, Comunicado técnico 95, Embrapa Milho e Sorgo, p.1-4.
- Paes, M.C.D. (2006) Circular Técnica 75: Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Embrapa Milho e Sorgo*. Sete Lagoas, MG.
- Paterniani, M.E.A.G.Z. (2001) Use of heterosis in maize breeding: history, methods and perspectives – a review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 1(2):159-178.
- Paterniani, M.E.A.G.Z.; Guimarães, P.S.; Lüders, R.R.; Gallo, P.B.; Souza, A.P.; Laborda, P.R.; Oliveira, K.M. (2008) Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. *Bragantia*. 67(3):639-648.

- Paterniani, E.; Campos, M.S. (2005) Melhoramento do milho. *In: Borém, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas*. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, p. 491-552.
- Pereira, M.G.; Lee, M.; Bramel-Cox, P.; Woodman, W.; Doebley, J.; Whitkus, R. (1994) Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37(2):236-243.
- Pereira, M.G.; Amaral Júnior, A.T. (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1:03-10.
- Pereira, M.G.; Pereira, T.N.S. (2006) Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas. *In: Borém, A. e Caixeta, E.T. Marcadores Moleculares*. Viçosa: Editora UFV. p. 85-106.
- Perrier, X.; Jacquemoud-Collet J.P. (2006) DARwin Software: <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Pinto, R.M.C.; Souza Jr., C.L.; Carlini-Garcia, L.A.; Garcia, A.A.F.; Souza, A.P. (2003) Comparison between molecular markers and diallel crosses in the assignment of maize lines to heterotic groups. *Maydica*, 48:63-73.
- Pioneer (2009) Pioneer Sementes: <http://www.pioneersementes.com.br/ProdutosDetalheMilho.aspx?id=28> em 06/11/2009.
- Poggio, L.; Confalonieri, V.; Comas, C.; Gonzalez, G.; Naranjo, C.A. (2000) Evolutionary relationships in the genus *Zea*: analysis of repetitive sequences used as cytological FISH and GISH markers. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4):1021-1027.
- Poggio, L.; Gonzales, G.; Confalonieri, V.; Comas, C.; Naranjo, C.A. (2005) The genome organization and diversification of maize and its allied species

revisited: evidences from classical and Fish-Gish cytogenetic analysis. *Cytogenetic and Genome Research*, 109:259-267.

R – The R Project for Statistical Computing: www.r-project.org.

Randolph, L.F. (1955) History and origin of corn. II. Cytogenetic aspects of the origin and evolutionary history of corn. *In: Sprague, G.F. (ed.) Corn and corn improvement*. New York: Academic Press, p.16-61.

Rangel, R.M.; Amaral Junior, A.T.; Viana, A.P.; Freitas Júnior, S.P.; Pereira, M.G. (2007) Prediction of popcorn hybrid and composite means. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7:288-296.

Rangel, R.M.; Amaral Junior, A.T.; Scapim, C.A.; Freitas Junior, S.P.; Pereira, M.G. (2008) Genetic parameters in parents and hybrids of circulant diallel in popcorn. *Genetic and Molecular Research* 7(4):1020-1030.

Rangel, R.M. (2009) *Análise biométrica na população UENF de milho pipoca sob seleção recorrente*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 104p.

Reddy, M.P.; Sarla, N.; Siddiq, E.A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.

Reeves, R.C.; Mangelsdorf, P.C. (1942) A proposed taxonomic change in tribe *Maydeae* (family *Gramineae*). *American Journal of Botany*, 29:815-817.

Reif, J.C.; Melchinger, A.E.; Xia, X.C.; Warburton, M.L.; Hoisington, D.A.; Vasal, S.K.; Beck, D.; Bohn, M.; Frisch, M. (2003) Use of SSRs for establishing heterotic groups ins subtropical maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 107:947-957.

- Roux, K.H. (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research*, 4:185-194.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406-425.
- Santacruz-Varela, A.; Widrechner, M.P.; Ziegler, K.E.; Alvador, R.J.; Millard, M.J. and Bretting, P.K. (2004) Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science*, 44:456-467.
- Santos, F.S.; Amaral Junior, A.T.; Freitas Júnior, S.P.; Rangel, R.M.; Pereira, M.G. (2007) Predição de ganhos genéticos por índices de seleção na população UNB-2U sob seleção recorrente. *Bragantia*, 66:391-398.
- Santos, F.S.; Amaral Júnior, A.T.; Freitas Júnior, S.P.; Rangel, R.M.; Scapim, C.A.; Mora, F. (2008) Genetic gain prediction of the third recurrent selection cycle in a popcorn population. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 30:651-655.
- Sawazaki, E. (1995) *Melhoramento do milho pipoca*. Instituto Agrônomo, Campinas, 21p.
- Sawazaki, E.; Paterniani, M.E.A.G.Z.; Castro, J.L.de; Gallo, P.B.; Galvão, J.C.C.; Saes, L.A. (2000) Potencial de linhagens de populações locais de milho pipoca para síntese de híbridos. *Bragantia*, 59(2):143-151.
- Sawazaki, E. (2001) A cultura do milho pipoca no Brasil. *O Agrônomo*, 53:11-13.
- Sawazaki, E.; Fantin, G.M.; Dudienas, C.; Castro, G.de. (2003) Resistência de genótipos de milho pipoca a doenças. *Revista de Agricultura*, 78(1):149-164.
- Scapim, C.A.; Pacheco, C.A.P.; Tonet, A.; Braccini, A.L.; Pinto, R.J.B. (2002) Análise dialélica e heterose de populações de milho pipoca. *Bragantia*, 61:219-230.

- Scapim, C.A.; Pinto, R.J.B.; Amaral Junior, A.T.; Mora, F.; Dandolini, T.S. (2006) Combining ability of white grain popcorn populations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6:136-146.
- Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion. *Nature Reviews Genetics*, 5:63-69.
- Schulman, A.H. (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*, 158(3):313-321.
- Silva, T.A.; Pinto, R.J.B.; Scapim, C.A.; Mangolin, C.A.; Machado, M.F.P.S.; Carvalho, M.S.N. (2009) Genetic divergence in popcorn genotypes using microsatellites in bulk genomic DNA. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9:31-36.
- Silva, W.J.; Vidal, B.C.; Martins, M.E.Q.; Vargas, H.; Pereira, A.C.; Zerbetto, M.; Miranda, L.C.M. (1993) What makes popcorn pop. *Nature*, 362:417.
- Simon, G.A.; Scapim, C.A.; Pacheco, C.A.P.; Barth Pinto, R.J.; Braccini, A.L.; Tonet, A. (2004) Depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. *Bragantia*, 63:55-62.
- Smith, H.F. (1936) A discriminant function for plant selection. *Annals of Eugenics*, 7:240-250.
- Sneath, P.H.; Sokal, R.R. (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman, 573p.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *International Association for Plant Taxonomy*, 11:33-40.
- Souza, S.G.H.; Carpentieri-Pípolo, V.; Ruas, C.F.; Carvalho, V.P.; Ruas, P.M.; Gerage, A.C. (2008) Comparative analysis of genetic diversity among the

- maize inbred lines (*Zea mays* L.) obtained by RAPD and SSR markers. *Brazilian Archives of Biology and Tecnology*, 51(1):183-192.
- Souza Junior.; C.L. (1987) Reciprocal recurrent selection with half-sib progenies obtained alternately from non-imbred (S_0) and imbred (S_1) plants in maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 32:19-31.
- Sudré, C.P. ; Leonardecz, E.; Rodrigues, R.; Amaral Junior, A.T. ; Moura, M.C.L.; Gonçalves, L.S.A. (2007) Genetic resources of vegetable crops: a survey in the Brazilian germplasm collections pictured through papers published in the journals of the Brazilian Society for Horticultural Science. *Horticultura Brasileira*, 25:496-503.
- Takahashi, C.; Marshall, J.A.; Bennet, M.D.; Leitch I.J. (1999) Genomic relationships between maize and its wild relatives. *Genome*, 42:1201-1207.
- Tanksley, S.D.; McCouch, S.R. (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277:1063-1066.
- Tardin, F.D.; Pereira, M.G.; Gabriel, A.P.C.; Amaral Júnior, A.T.; Souza Filho, G.A. (2007) Selection index and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. *Crop Breeding and Applied Biotchnology*, 7:225-233.
- Tenaillon, M.J.; U'Ren, J.; Tenaillon, O.; Gaut, B.S. (2004) Selection versus demography: a multilocus investigation of the domestication process in maize. *Molecular Biology and Evolution*. 21:1214-1225.
- Vencovsky, R.; Barriga, P. (1992) Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto: SBG. 198p.
- Vigouroux, Y.; Mitchell, S.; Matsuoka, Y.; Hamblin, M.; Kresovich, S.; Smith, J. S. C.; Jaqueth, J.; Smith, O. S.; Doebley, J. (2005) An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. *Genetics*, 169:1617-1630.

- Vilela, F.O.; Amaral Junior, A.T.; Pereira, M.G.; Scapim, C.A.; Vianna, A.P.; Freitas Júnior, S.P. (2008) Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. *Acta Scientiarum Agronomy*, 30:25-30.
- Von Pinho, R.G. (2003) Produção de milho no Brasil e no mundo: Realidade e perspectiva. *Anais do Simpósio sobre Melhoramento e Perspectivas do Milho*. Lavras: UFLA.
- Wang, R.L.; Steca; Hey, J.; Lukens, L.; Doebley, J. (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398:236-239.
- Warburton, M.L.; Xianchun, X.; Crossa, J.; Franco, J.; Melchinger, A.E.; Frisch, M.; Bohn, M.; Hoisington, D. (2002) Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using scale fingerprinting methods. *Crop Science*, 42:1832-1840.
- Weatherwax, P. (1935) The pylogeny of *Zea mays*. *Amer. Midland Naturalist*, 16:1-71.
- Weber, A.; Clark, R.M.; Vaughn, L.; Sánchez-Gonzalez, J.J.; Yu, J.; Yandell, B.S.; Bradbury, P.; Doebley, J. (2007) Major regulatory genes in maize contribute to standing variation in teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics*, 177:2349-2359.
- Weber, A.; Briggs, W.H.; Rucker, J.; Baltazar, B.M.; Sánchez-Gonzalez, J.J.; Feng, P.; Buckler, E.S.; Doebley, J. (2008) The genetic architecture of complex traits in teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*): new evidence from association mapping. *Genetics*, 180:1221-1232.
- White, S.E.; Doebley, J.F. (1999) The molecular evolution of terminal *ear1*, a regulatory gene in the genus *Zea*. *Genetics*, 153:1455-1462.

- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Xia, X.C.; Reif, J.C.; Melchinger, A.E.; Frish, M.; Hoisington, D.A.; Beck, D.; Pixley, K.; Warburton, M.L. (2005) Genetic diversity among CIMMITY maize inbred lines investigated with SSR markers: II. Subtropical, Tropical Midaltitude, and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and European maize. *Crop Science Society of American*, 45:2573-2582.
- Ye, C.; Yu, Z.; Kong, F.; Wu, S.; Wang, B. (2005) R-ISSR as new tool for genomic fingerprinting, mapping, and gene tagging. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23:167-177.
- Zietkiewicz, E.; Rajalski, A.; Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183.
- Zinsly, J.R.; Machado, J.A. (1980) *Melhoramento e produção do milho no Brasil: Botânica*. Piracicaba/ESALQ, Marprint.