

GRUPOS HETERÓTICOS EM GERMOPLASMA DE MILHO-PIPOCA

CÁSSIO VITTORAZZI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
NOVEMBRO – 2016

GRUPOS HETERÓTICOS EM GERMOPLASMA DE MILHO-PIPOCA

CÁSSIO VITTORAZZI

“Tese 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 Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Antonio Teixeira do Amaral Júnior

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
NOVEMBRO – 2016

GRUPOS HETERÓTICOS EM GERMOPLASMA DE MILHO-PIPOCA

CÁSSIO VITTORAZZI

“Tese 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 Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 25 de novembro de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Ana Paula Candido Gabriel Berilli (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – IFES/*Campus* Itapina

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Dr. Janeo Eustáquio de Almeida Filho (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof. Antonio Teixeira do Amaral Júnior (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UENF
Orientador

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor, e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá...”

De alguma maneira você chega lá!”

(Ayrton Senna da Silva)

Aos meus pais Vera Lúcia e Elísio e à minha irmã Cátia.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por me concederem esta oportunidade de realização.

À UENF, pela infraestrutura concedida e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho, e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Antônio Teixeira do Amaral Júnior, pela orientação, pela oportunidade concedida e por proporcionar o meu crescimento profissional.

Aos Professores do programa de Genética e Melhoramento de Plantas, por todo conhecimento transmitido.

Ao Senhor José Daniel secretário do Programa, pela eficiência, pelo seu magnífico trabalho e dedicação.

Aos grandes amigos de todas as horas Thiago Rodrigues e Weverton Rodrigues pela fiel amizade e grande companheirismo de sempre.

Aos companheiros do “Reino *King Size*” Lucas, Valdinei, Validoro, Doutor Fernando e os agregados Leonardo e Wallace, pelas infinitas horas de descontração e alegria vividas.

Aos colegas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, pelo auxílio na execução dos trabalhos e desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Técnicos, e funcionários da UENF, em especial Geraldo Carvalho, pela amizade e pelos conhecimentos de campo, e à Marcela Boechat pelos preciosos ensinamentos na área molecular transmitidos durante nosso convívio.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1. Aspectos gerais do milho-pipoca	5
3.2. Diversidade genética na cultura do milho-pipoca.....	6
3.3. Medidas de dissimilaridade e técnicas de agrupamentos	7
3.4. Grupos heteróticos em milho-pipoca.....	9
3.5. Marcadores moleculares.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Material genético.....	13
4.2. Delineamento experimental	13
4.3. Época de cultivo e tratos culturais.....	13
4.4. Características morfoagronômicas avaliadas	17
4.5. Análise estatística e genética das parcelas das características morfoagronômicas	18
4.5.1. Análise de variância (Anova)	18
4.5.2. Identificação dos grupos heteróticos baseada em informações morfoagronômicas	19
4.6. Análises moleculares e divergência genética	20

4.6.1. Preparo das amostras para avaliação.....	20
4.6.2. Extração de DNA	21
4.6.3. Quantificação do DNA das amostras	22
4.6.4. Seleção dos primers SSR-ESTs	23
4.6.5. Reação da polimerase em cadeia (PCR)	24
4.6.6. Eletroforese capilar	24
4.6.7. Análise dos dados moleculares	25
4.6.8. Análise estrutural e determinação dos grupos heteróticos.....	25
4.7. Identificação dos grupos heteróticos baseada em dados moleculares	26
4.8. Identificação de grupos heteróticos baseada na utilização simultânea de informações morfoagronômicas e moleculares.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Análises de variâncias e de médias	29
5.2. Identificação de grupos heteróticos fundamentada em características morfoagronômicas	31
5.3. Identificação de grupos heteróticos fundamentada em marcadores moleculares.....	35
5.4. Identificação dos grupos heteróticos fundamentada em dados morfoagronômicos e moleculares	46
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMO

VITTORAZZI, Cássio, D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Novembro de 2016. Grupos heteróticos em germoplasma de milho-pipoca. Orientador: Antonio Teixeira do Amaral Júnior. Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Helaine Christina Cancela Ramos.

Considerando que a cultura do milho-pipoca possui reduzida base genética, decorrente de sua provável evolução proveniente de seleções apenas do milho comum tipo “flint”, torna-se sobremaneira importante o conhecimento a respeito da formação de grupos heteróticos. Com o avanço das técnicas moleculares e utilização cada vez mais frequente de marcadores genéticos altamente informativos, a realização de estudos visando à detecção da variabilidade existente diretamente em nível de DNA tem sido densamente utilizada. O Banco Ativo de Germoplasma de Milho-Pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) contém acessos oriundos de diferentes regiões do Brasil e do exterior, incluindo Centros de Diversidade da espécie. Isto posto, julga-se oportuno o desenvolvimento desta pesquisa, no intento de identificar grupos heteróticos de milho-pipoca, utilizando-se da representatividade genotípica do Banco de Germoplasma da UENF, com o objetivo de contribuir para a formação de híbridos nacionais. Para o desenvolvimento deste trabalho foram analisados 38 genótipos de milho-pipoca, de origem diversa, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Foram realizadas três análises considerando

diferentes metodologias para identificação de grupos heteróticos para os acessos analisados, sendo, a identificação dos grupos heteróticos baseada em informações morfoagronômicas, em que foram analisadas dez características morfoagronômicas de importância para a cultura do milho-pipoca. Os dados fenotípicos foram analisados com base em técnicas multivariadas, em que foram extraídas as matrizes de distâncias genéticas generalizada de Mahalanobis e com base no algoritmo de Gower. Após a estimação das matrizes de distâncias genéticas foram realizados os agrupamentos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward. Identificação dos grupos heteróticos baseada em dados moleculares, através da utilização de 15 iniciadores microssatélites (SSR-ESTs), submetidos a eletroforese capilar. Os dados genotípicos foram processados para a realização de uma análise estrutural e determinação do número de grupos por meio de um método heurístico baseado em algoritmos de agrupamento bayesiano e duas análises de agrupamentos (UPGMA e Ward) baseados em três algoritmos de distâncias genéticas, índice ponderado, índice não ponderado e índice de Smouse e Peakall. A terceira metodologia empregada foi a identificação de grupos heteróticos baseada na utilização simultânea de informações morfoagronômicas e moleculares, em que, as variáveis morfoagronômicas e moleculares foram analisadas simultaneamente, sendo extraída a matriz de distância genética pelo algoritmo de Gower, e posterior aplicação dos métodos de agrupamentos UPGMA e Ward. Todos os pontos de corte para determinação do número de grupos em cada agrupamento foi definido conforme expressão proposta por Mojena. A consistência dos métodos de agrupamentos foi avaliada pelos coeficientes de correlação cofenética (CCC), em que as significâncias dos CCC foram examinadas pelo teste de Mantel. Houve variabilidade genética entre os acessos de milho-pipoca analisados, demonstrando que há possibilidade de exploração dessa variabilidade para desenvolvimento de novas cultivares. Houve concordância entre as técnicas multivariadas de agrupamento utilizadas, principalmente quando houve utilização de informações genotípicas oriundas dos marcadores microssatélites. Houve identificação de possíveis grupos heteróticos presentes nos acessos de milho-pipoca estudados, sobretudo no que diz respeito à coloração do grão.

ABSTRACT

VITTORAZZI, Cássio, D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, November 2016. Heterotic groups popcorn germoplasm. Advisor: Antonio Teixeira do Amaral Júnior. Counselors: Alexandre Pio Viana and Helaine Christina Cancela Ramos.

Whereas that the popcorn culture has reduced genetic base, due to its likely evolution from selections only from common corn type "flint", it is particularly important knowledge about the formation of heterotic groups. Evaluations aiming to diversity studies to identify heterotic groups were basically made from phenotypic information on morphological characteristics. With advances in molecular techniques and increasingly frequent use of highly informative genetic markers, the studies aiming to detect the existing directly on DNA level variability has been heavily used. The Active Germplasm Bank of Popcorn at Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) contains hits from different regions of Brazil and abroad, including species diversity centers. That said, it considers it useful to the development of this research, in an attempt to identify heterotic groups of popcorn, using genotypic representation of the Germplasm Bank of UENF, in order to contribute to the formation of national hybrids. For the development of this study were analyzed 38 genotypes of popcorn, different in origin, belonging to the Active Germplasm Bank Popcorn at UENF. Were three analyzes considering different methodologies to identify heterotic groups for access analyzed, the identification of heterotic groups based on morphological and

agronomic information, which were analyzed ten morphological and agronomic characteristics of importance to the popcorn culture. Phenotypic data were analyzed based on multivariate techniques that were extracted matrices of widespread genetic Mahalanobis distances and based on the Gower algorithm. After the estimation of the matrix of genetic distances were performed groupings by hierarchical methods UPGMA and Ward. Identification of heterotic groups based on molecular data, by using primers 15 microsatellite (SSR-ESTs) was subjected to capillary electrophoresis. Genotypic data were processed to perform a structural analysis and determination of the number of groups by means of a heuristic method based on Bayes clustering algorithms and two cluster analysis (UPGMA and Ward) based on three algorithms genetic distances weighted index, unweighted index and Smouse and Peakall index. The third methodology was the identification of heterotic groups based on the simultaneous use of morpho-agronomic and molecular information, in that the morpho-agronomic and molecular variables were analyzed simultaneously being pulled from the matrix of genetic distance by Gower algorithm, and later application of the methods of UPGMA and Ward groupings. All cutoff points for determining the number of groups in each cluster was defined as expression proposed by Mojena. The consistency of clustering methods was evaluated by cophenetic correlation coefficient (CCC), in which the significances of CCC were examined by Mantel's test. There was genetic variability among popcorn analyzed accessions, demonstrating that it is possible to exploit this variability for the development of new cultivars. There was agreement between the multivariate techniques used grouping, especially when there was use of genotypic information from the microsatellite markers. There identifying possible heterotic groups present in the popcorn access studied, particularly with regard to color grain.

1. INTRODUÇÃO

Considerando que a cultura do milho-pipoca possui reduzida base genética, decorrente de sua provável evolução proveniente de seleções apenas do milho comum tipo “*flint*”, propalada por Kantety et al. (1995), torna-se sobremaneira importante o conhecimento a respeito da formação de grupos heteróticos.

As avaliações visando aos estudos de diversidade para identificação de grupos heteróticos eram realizadas basicamente a partir de informações fenotípicas relativas às características morfológicas.

Com o avanço das técnicas moleculares e utilização cada vez mais frequente de marcadores genéticos altamente informativos, a realização de estudos visando à detecção da variabilidade existente diretamente em nível de DNA tem sido densamente utilizada (Cruz et al., 2012).

Apesar de se constituir em um dos pilares do melhoramento de plantas para as mais diversas culturas, ainda não é amplamente difundido o uso de marcadores moleculares na identificação de variabilidade genética para a constituição de grupos heteróticos em milho-pipoca, o que desfavorece o desenvolvimento de genótipos superiores para grande parte das áreas produtivas.

Nos E.U.A., Santacruz-Varela et al. (2004) utilizaram 29 marcadores morfológicos, 18 locos isoenzimáticos e 31 locos SSRs para avaliar a 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, com base em análise de agrupamentos e de componentes principais. Pela aglomeração dos genótipos, foi proposto o reconhecimento de três grupos heteróticos, a saber: i) “*Yellow Pearl Popcorn*”, que representa o mais importante grupo comercial dos E.U.A. e que teria sido derivado de introduções da raça *Curagua* do Chile na Inglaterra, no século XIX; ii) “*North American Pointed Rice Popcorns*”, que provavelmente originou-se de um complexo de raças tradicionais de milho-pipoca da América Latina; e iii) “*North American*” e “*North American Early Popcorns*”, que têm grande relação com os tipos “*flint*” de milho comum do norte dos E.U.A.

Por sua vez, em milho comum, cujos programas de melhoramento receberam maior atenção por parte dos pesquisadores, autores têm demonstrado a eficiência de identificação de grupos heteróticos por procedimentos RFLP (Pinto et al., 2003), AFLP (Oliveira et al., 2004) e, mais recentemente, por SSR (Barata e Carena, 2006).

Propostas de grupos heteróticos com auxílio de marcadores microssatélites SSR foram realizadas por Reif et al. (2003), que obtiveram a formação de grupos heteróticos concordantes com a genealogia de compostos subtropicais “*flint*” e “*dent*” provenientes de germoplasma do CIMMYT.

Atualmente, o Banco de Germoplasma de Milho-pipoca da UENF conta com dezenas de acessos de milho-pipoca, incluindo: i) populações de ciclos de seleção recorrente da UENF, UEM e Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas - MG); ii) compostos nacionais e variedades do país e do exterior que deram origem aos genótipos melhorados no país, obtidos por intercâmbio com a Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas - MG), UEM, UFV, IAC e CIMMYT; iii) raças de diversos países da América Latina, provenientes do CIMMYT; iv) linhagens dos programas de melhoramento de milho-pipoca da UFV, UEM e UENF; v) híbridos recomendados por empresas nacionais e internacionais, provenientes do IAC e da *Pioneer*, além de linhagens desenvolvidas a partir destes híbridos comerciais; e vi) híbridos simples do cruzamento entre linhagens do próprio programa da UENF. Os principais cultivares e híbridos de milho-pipoca recomendados no país constam no Banco de Germoplasma da UENF.

Isto posto, julga-se oportuno o desenvolvimento desta pesquisa, no intento de identificar grupos heteróticos de milho-pipoca, utilizando-se da

representatividade genotípica do Banco de Germoplasma da UENF, com o objetivo de contribuir para a formação de híbridos nacionais.

2. OBJETIVOS

a) Proceder à análise comparada da diversidade genética de genótipos de milho-pipoca nacionais, em relação aos procedentes de outros países, testando os variados modelos para estimação de diversidade genética.

b) Identificar grupos heteróticos de milho-pipoca a partir de informações fenotípicas e genotípicas, por meio da utilização de marcadores moleculares de interesse para o melhoramento, em condições tropicais.

c) Identificar genótipos de interesse para formação de híbridos de variedades, bem como na constituição de compostos para uso em programas de seleção recorrente, além das opções de geração de linhagens para futura formação de híbridos simples, simples modificados, duplos e triplos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais do milho-pipoca

Originário da subfamília *Panicoide*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L., de forma semelhante ao milho comum, o milho-pipoca [*Zea mays* L. var. *everta* (Sturtev) L. H. Bailey], porém, difere do milho comum, por possuir grãos menores, maior prolificidade e menor vigor da planta. A principal diferença do milho-pipoca em relação ao milho comum consiste na capacidade do grão de se expandir dando origem à pipoca (Brunson, 1937; Hallauer e Carena, 2009). A expansão do grão ocorre quando este é submetido à pressão de 135 psi, decorrente do aquecimento em torno de 177 °C (Hoseney et al., 1983; Silva et al., 1993).

Na comparação com o milho comum, as plantas de milho-pipoca possuem um sistema radicular menos desenvolvido, o que torna a planta mais suscetível ao acamamento e à seca. Além disso, geralmente as cultivares de milho-pipoca são mais prolíficas, superprecoces na maturação e na secagem dos grãos (Fantin et al., 1991; Hallauer, 2001).

É sabido que os caracteres agronômicos do milho-pipoca correlacionam-se negativamente com os caracteres de qualidade da pipoca (Willier e Brunson, 1927; Pacheco et al., 1998; Hallauer, 2001; Daros et al., 2004; Rangel et al., 2011). Esta correlação negativa indica que a seleção direta com qualquer uma destas características resulta na baixa expressão da outra característica de

maneira recíproca. Alguns atributos específicos para uma determinada característica parecem favorecer esta em relação às demais.

Informações sobre a cultura do milho-pipoca são escassas, havendo desinformação oficial sobre áreas de plantio, produção, valores e quantidades de importação (Resh et al., 2015), assim como sobre variedades e híbridos em fase de melhoramento ou desenvolvidos no país (Pipolo et al., 2002; Amaral Junior et al., 2013). De todo modo, o Brasil é sobremaneira dependente de genótipos desenvolvidos no exterior, embora seja um alimento bastante apreciado no Brasil; sabendo-se que sua produção está aquém do potencial de demanda, comprovado pelo grande volume de grãos importados (Ribeiro et al., 2012). Por conseguinte, o lançamento de cultivares de milho-pipoca é de fundamental importância para mitigar a dependência por genótipos de países estrangeiros e atender a demanda dos produtores e consumidores.

3.2. Diversidade genética na cultura do milho-pipoca

Os estudos sobre diversidade genética eram realizados basicamente a partir de informações fenotípicas relativas às características morfológicas e agronômicas da cultura estudada. Baseada na utilização de marcadores moleculares, a detecção de variabilidade existente em nível de DNA, novas perspectivas em relação aos estudos de diversidade e identificação de grupos heteróticos foram engrandecidas com os recentes progressos da Biologia Molecular (Cruz et al., 2011).

Para a caracterização de genótipos para estudos de diversidade e identificação de grupos heteróticos, os marcadores microssatélites derivados de sequências expressas ou simplesmente microssatélites gênicos (SSR-ESTs) têm sido usados com maior frequência, por apresentarem vantagens, como: i) são encontrados com frequência no genoma; ii) estão presentes em muitos organismos eucarióticos; iii) são codominantes; e iv) apresentam elevado grau de polimorfismo (Ek et al., 2005; Agarwal et al., 2008; Xu e Crouch 2008; Almeida et al., 2011).

Existem vários métodos de análise de diversidade genética para formação de grupos heteróticos, incluindo a análise de variância, correlação, regressão e

técnicas de análise multivariada. Apesar disso, a formação de grupos de linhagens com base nos valores fenotípicos pode ser falha, devido à influência do meio ambiente e, com isso, podem não representar o verdadeiro padrão heterótico das linhagens (Badu-Apraku et al., 2006). Por esse motivo, foram desenvolvidos e propostos métodos mais eficazes de agrupamento genético, um deles é a partir da utilização dos marcadores moleculares, aumentando a precisão e confiabilidade dos agrupamentos de linhagens.

Miranda et al. (2008), identificando a variabilidade genética e possíveis grupos heteróticos em populações de milho-pipoca, destacaram que algumas populações de genótipos brasileiros apresentavam elevada variabilidade genética, permitindo, assim, a exploração dos efeitos aditivos e não aditivos para rendimento de grãos, sendo possível o aumento da produção de grãos, utilizando variedades locais. Porém, é difícil a obtenção de híbridos comerciais a partir de variedades locais, porque estes apresentam um baixo desempenho para capacidade de expansão.

Carvalho et al. (2013) afirmam que os estudos de diversidade genética e identificação de grupos heteróticos envolvendo populações de milho-pipoca devem ser avaliados com um objetivo de médio a longo prazo, pois os resultados serão obtidos por meio de linhagens derivadas dessas populações, resultando em híbridos superiores desenvolvidos a partir de cruzamentos direcionados. Para tanto, o uso de marcadores moleculares, aliado a uma boa caracterização morfológica tende a ser eficiente na identificação de acessos mais divergentes, diminuindo o tempo necessário para desenvolvimento de novos cultivares.

3.3. Medidas de dissimilaridade e técnicas de agrupamentos

Os estudos de diversidade genética podem ser baseados em diversos métodos multivariados como, por exemplo, análise de componentes principais e por variáveis canônicas, além dos métodos aglomerativos. As metodologias baseadas nos modelos de agrupamentos dependem, fundamentalmente, de medidas de dissimilaridade estimadas previamente, como a distância euclidiana ou a generalizada de Mahalanobis, bem como por algoritmos como o de Gower, dentre outras. As análises de agrupamento têm o objetivo de reunir as

observações em vários grupos, apresentando homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre os grupos formados. Esta metodologia é composta primeiramente por estimação de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre as observações, seguida da adoção de uma técnica de agrupamento para a identificação dos grupos formados (Cruz et al., 2012).

Para o desenvolvimento com sucesso de um programa de melhoramento genético, é basilar a existência de variabilidade entre os acessos que formam a população-base. As cultivares de desempenhos superiores e divergentes entre si dependem dessa variabilidade. Avaliações de informações fenotípicas (características agrônômicas e morfológicas) e genotípicas (marcadores moleculares), dentre outras, quantificam essa divergência. As medidas de dissimilaridade expressam as informações múltiplas de cada acesso, representando a diversidade existente no conjunto de genótipos avaliados (Cruz, et al., 2011).

A importância das medidas de dissimilaridade em estudos de diversidade e identificação de grupos heteróticos, se dá ao passo que os estudos visem à assimilação de genitores importantes para técnicas de hibridação. A averiguação desses genitores divergentes tende a apresentar heterose e genótipos com elevada superioridade na F_1 , pelos genes complementares que proporcionam tais fatos. Genitores com baixa distância genética ou geneticamente próximos tendem a não apresentar heterose considerável, enfatizando a importância dos estudos de diversidade realizados por meio das metodologias de aplicação das medidas de dissimilaridade (Mohammadi e Prasana, 2003; Borém e Miranda, 2005; Cruz e Carneiro, 2006; Mingoti, 2007).

Dias (1998) expõe que as técnicas de análises de agrupamento são puramente exploratórias e visam à geração de hipóteses sobre o padrão de agrupamento formado, podendo ser suplementada ou complementada por outras técnicas de visualização, através de dendrogramas ou gráficos em duas ou três dimensões.

Dentre as abordagens para elaboração dos agrupamentos, três merecem destaque. As técnicas que produzem dendrogramas, por meio da estimação das medidas de dissimilaridade e consequente formação dos grupos por processos aglomerativos ou de divisão. A segunda abordagem envolve partições em um grupo em que os acessos possam se mover para fora ou para dentro deste e de

outros grupos em diferentes estágios de análise. A última é a técnica baseada em dispersão gráfica considerando as posições relativas de cada acesso em gráficos bi ou tridimensionais (Cruz et al., 2011).

Sneath e Sokal (1973) sugerem uma classificação desses métodos de agrupamento em diversas categorias: métodos aglomerativos e divisivos, hierárquicos e não hierárquicos; métodos com sobreposição e sem sobreposição; métodos sequenciais e simultâneos, critérios locais e globais e métodos de otimização (soluções diretas e interativas), agrupamentos ponderados e não ponderados, adaptativos e não adaptativos.

3.4. Grupos heteróticos em milho-pipoca

Grupos heteróticos podem ser definidos como uma coleção de germoplasma que quando cruzada com acessos pertencentes a outro grupo, tende a apresentar maiores níveis de heterose que quando cruzada com acessos pertencentes ao seu próprio grupo (Lee, 1995). Uma classificação de linhagens em distintos grupos heteróticos é importante ferramenta para o desenvolvimento de híbridos superiores (Akinwale et al., 2014). Além disso, esses estudos de relação genética entre os grupos heteróticos ancoram planejamentos de cruzamentos específicos para formação de híbridos voltados à resistência de pragas e doenças (Hallauer et al., 2010). Segundo Melani e Carena (2005), a precisão na seleção dos genitores e na identificação dos grupos heteróticos, corresponde no sucesso do desenvolvimento de linhagens e cultivares superiores de milho.

Os grupos heteróticos podem ser considerados como um conjunto de genótipos com rica herança genética, de elevado coeficiente de parentesco, apresentando uma tendência à semelhança para as principais características da cultura e forte capacidade geral de combinação. Os membros de grupos heteróticos em cada cultura podem aumentar significativamente a produtividade da cultura empregada (Zuo-Mei et al., 2010).

Nos E.U.A., Santacruz-Varela et al. (2004) utilizaram 29 marcadores morfológicos, 18 locos isoenzimáticos e 31 locos SSRs para avaliar a 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, com base em análise de agrupamentos 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. e que teria sido derivado de introduções da raça *Curagua* do Chile na Inglaterra, no século XIX; ii) “*North American Pointed Rice Popcorns*”, que provavelmente originou do complexo de raças tradicionais de milho-pipoca da América Latina; e iii) “North American” e “North American Early Popcorns”, que têm grande relação com os tipos “flint” de milho comum do norte dos E.U.A.

No início de um programa de melhoramento de milho-pipoca nos EUA, Larish e Brewbaker (1999) identificaram três grupos heteróticos, constatando a variabilidade da utilização de cruzamentos direcionados entre germoplasmas provenientes de países de clima temperado e acessos provindos de países que apresentam clima considerado tropical.

Utilizando informações fenotípicas pela avaliação das características morfológicas e genotípicas com base em informações de marcadores moleculares, pode-se ter uma eficiente forma de determinação dos grupos heteróticos em milho-pipoca, visando ao desenvolvimento de cultivares superiores. Tal pretensão tem intento fundamental atualmente, em decorrência da carência de informações sobre a determinação de grupos heteróticos em milho-pipoca.

3.5. Marcadores moleculares

Segundo Hallauer et al. (2010), para a obtenção de híbridos superiores, o primeiro passo é a identificação de genótipos divergentes. Na concepção de diversos pesquisadores, esse procedimento pode ser obtido com resultados mais confiáveis quando se utilizam marcadores moleculares, por permitirem uma inequívoca representação das diferenças genômicas das populações (Legesse et al., 2007; Balestre et al., 2008).

Marcadores moleculares podem ser definidos como uma característica capaz de ser herdável presente no DNA e que, conseqüentemente, diferencia dois ou um grupo com mais indivíduos (Dias-Salman et al., 2009).

Uma identificação rápida e precisa de acessos superiores pode ser facilitada por marcadores moleculares em comparação com marcadores morfológicos, pois apresenta a vantagem de fornecerem um número ilimitado de polimorfismos que são distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma (Guimarães e Moreira, 1999).

Há tempos, estudos vêm sendo realizados com o auxílio dos marcadores moleculares. Pejic et al. (1998), ao trabalharem com diferentes tipos de marcadores para comparar a eficiência na estimativa de similaridade genética entre linhagens de milho comum, observaram que marcadores microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeat*) revelaram o mais alto nível de polimorfismo por único loco marcador, devido à sua natureza codominante e elevado número de alelos por loco. Esses marcadores ainda apresentam a vantagem de serem de fácil manipulação e automatização (Senior e Heun, 1993; Konstantinov e Drinic, 2000).

Segundo Hedrich (2001), os marcadores estabelecidos como os microssatélites (SSR) são bastante promissores para determinação de grupos dentro das espécies, pois fundamentam-se em locos altamente variáveis.

As vantagens da utilização dos marcadores SSR para análises de distância genética no melhoramento de milho também foram apresentadas por Silva et al. (2009), destacando que a utilização desta técnica pode reduzir o número de cruzamentos necessários, pois podem direcionar quais são os cruzamentos mais promissores. No mesmo sentido, Pinheiro et al. (2003) destacaram que a caracterização molecular da diversidade genética de germoplasma pode fornecer informações úteis para induzir os cruzamentos mais promissores, reduzindo desta maneira os gastos, por meio da identificação e seleção dos melhores parentais direcionados para os cruzamentos.

A utilização de marcadores moleculares para a identificação de grupos heteróticos é contestada por alguns autores, por fornecer conhecimento sobre a divergência de todo o genoma e não apenas das características de interesse para a cultura estudada. Em contraste, o uso de marcadores moleculares tem sido bastante eficiente na identificação de grupos heteróticos em linhagens derivadas

de populações oriundas de clima temperado, em que a genealogia das linhagens é extensamente conhecida, além de apresentar uma base genética estreita (Barrios et al., 2009). Porém, Balestre et al. (2008) ratificaram que para a identificação de grupos heteróticos, a utilização de dialelos revelou ser mais promissora que o uso de marcadores moleculares isoladamente, demonstrando a possibilidade de aliar as duas metodologias para obtenção de resultados mais robustos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material genético

Para o desenvolvimento deste trabalho foram analisados 38 genótipos de milho-pipoca, de origem diversa, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Milho-pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, os quais estão identificados na Tabela 1.

4.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado para a implantação do experimento foi blocos ao acaso, com quatro repetições contidas em uma época de plantio. As parcelas foram compostas por uma linha de 5,00 metros de comprimento, dispostas a um espaçamento entre linhas de semeadura de 0,60 m e distribuídas a 0,30 m entre plantas.

4.3. Época de cultivo e tratos culturais

O plantio do experimento para a avaliação fenotípica dos genótipos foi realizado no mês de outubro de 2015, na Estação Experimental da UENF no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos

Goytacazes, na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro. Foram semeadas três sementes por cova, a fim de garantir a germinação de todas as parcelas, à profundidade de 0,05 m. Aos 21 dias após a emergência, realizou-se o desbaste, deixando uma planta de maior vigor por cova, resultando uma população final de aproximadamente 55.555 plantas.ha⁻¹. Foi realizada uma adubação no plantio com 800 kg.ha⁻¹ de fertilizante mineral na formulação 04-14-08 (N-P-K), aos 15 dias após a semeadura realizou-se uma adubação de cobertura de 300 kg.ha⁻¹ de fertilizante mineral na formulação 20-00-20 (N-P-K) e, aos 30 dias após a emergência, realizou-se uma segunda adubação de cobertura, aplicando 200 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, na forma de ureia. Todas as adubações foram recomendadas de acordo com a análise química realizada em laboratório especializado anteriormente à implantação do experimento, do solo da área de cultivo experimental.

Tabela 1 - Descrição dos genótipos de milho-pipoca pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da UENF utilizadas experimentalmente para realização das análises fenotípicas.

Genótipos	Tipo	Variedade Originária	Adaptação Climática	Instituição	CE
P1	Linhagem	Híbrido Zélia	Temperado/Tropical	UEM	26.67
P2	Linhagem	Composto CMS-42	Temperado/Tropical	UEM	19.33
P3	Linhagem	Composto CMS-42	Temperado/Tropical	UEM	17.67
P4	Linhagem	Raças Sul-Americanas	Temperado/Tropical	UEM	19.33
P5	Linhagem	Híbrido Zaeli	Temperado/Tropical	UEM	26.33
P6	Linhagem	Híbrido Zaeli	Temperado/Tropical	UEM	23.67
P7	Linhagem	Híbrido Zaeli	Temperado/Tropical	UEM	24.67
P8	Linhagem	Híbrido IAC112	Temperado/Tropical	UEM	22.67
P9	Linhagem	Híbrido IAC112	Temperado/Tropical	UEM	27.33
P10	Linhagem	Híbrido IAC112	Temperado/Tropical	UEM	25.33
L51	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	16.00
L 52	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	15.67
L 53	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	29.33
L 54	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	19.00
L 55	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	24.67
L 59	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	19.00
L 61	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	5.00
L 63	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	21.67
L 65	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	19.00
L 66	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	22.33

Cont. Tabela 1

Genótipos	Tipo	Variedade Originária	Adaptação Climática	Instituição	CE
L 69	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	20.33
L 70	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	21.00
L 71	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	15.67
L 74	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	19.33
L 75	Linhagem S7	BRS-Angela	Tropical	UENF	18.33
L 76	Linhagem S7	Viçosa	Temperado/Tropical	UENF	23.33
L 77	Linhagem S7	Beija-flor	Temperado/Tropical	UENF	23.33
L 80	Linhagem S7	Viçosa	Temperado/Tropical	UENF	6.33
L 88	Linhagem S7	Viçosa	Temperado/Tropical	UENF	15.33
BOYA 462	PPA	RAS (Bolívia)	Temperado/Tropical	CIMMYT	8.00
URUG 298 Roxo	PPA	RAS (Uruguai)	Temperado/Tropical	CIMMYT	20.67
URUG 298 Amarelo	PPA	RAS (Uruguai)	Temperado/Tropical	CIMMYT	23.00
BOZM 260	PPA	RAS (Bolívia)	Temperado/Tropical	CIMMYT	9.33
CHZM 13 0136	PPA	RAS (Chile)	Temperado/Tropical	CIMMYT	12.67
ARZM 05 083	PPA	RAS (Argentina)	Temperado/Tropical	CIMMYT	5.00
ARZM 07 049	PPA	RAS (Argentina)	Temperado/Tropical	CIMMYT	11.67
ARZM 13 050	PPA	RAS (Argentina)	Temperado/Tropical	CIMMYT	15.33
PARA 172	PPA	RAS (Paraguai)	Temperado/Tropical	CIMMYT	9.33

CE – Capacidade de expansão (mg.ml^{-1}); PPA - População de polinização aberta; RAS – Raça da América do Sul.

4.4. Características morfoagronômicas avaliadas

Foram analisadas dez características morfoagronômicas de importância para a cultura do milho-pipoca:

i) altura média de plantas (AP), obtida pela média de cinco plantas competitivas dentro de cada parcela, sendo definida pela mensuração do nível do solo até o ponto de inserção da folha bandeira, expressa em metros (m);

ii) altura média de espigas (AE), obtida pela média de cinco plantas competitivas dentro de cada parcela, sendo definida pela medida do nível do solo ao ponto de inserção da primeira espiga ou espiga superior e expressa em metros (m);

iii) diâmetro médio de colmo (DC), obtido pela média de cinco plantas competitivas em cada parcela, definido pelo diâmetro do colmo da planta acerca de 0,50 m acima do nível do solo, este definido por meio da utilização de paquímetro digital, expresso em centímetros (cm);

iv) comprimento médio de pendão (CP), obtido pela média de cinco pendões em cada parcela, definido pelo comprimento do pendão do ponto de inserção da primeira ramificação até o ápice da ramificação principal, expresso em centímetros (cm);

v) número médio de ramificações do pendão (NRP), obtido pela média da contagem do número de ramificações dos pendões de cinco plantas em cada parcela;

vi) dias para o florescimento (FLOR), definido pelo número de dias a partir da semeadura até o ápice de florescimento da parcela, sendo definido quando 50% das plantas da parcela apresentavam florescimento masculino e feminino conjuntamente;

vii) massa média de 100 grãos (M100), definida pela massa média de 100 grãos, aleatoriamente, de duas repetições em cada parcela, obtida com auxílio de balança semi-analítica Shimadzu[®], modelo BL3200H, expressa em gramas (g);

viii) comprimento médio de espigas (CESP), obtido pela média do comprimento de cinco espigas aleatoriamente em cada parcela, definido com auxílio de régua graduada, expresso em centímetros (cm);

ix) número médio de fileiras de grãos por espigas (NFE), definido pelo cômputo do número de fileiras de grãos em cinco espigas aleatórias em cada parcela; e

x) número médio de grãos por fileira em espigas (NGF), obtido pela contagem do número de grãos por fileira em cinco espigas aleatoriamente em cada parcela.

4.5. Análise estatística e genética das parcelas das características morfoagronômicas

4.5.1. Análise de variância (Anova)

As análises estatísticas das variáveis para as características morfoagronômicas foram realizadas com o auxílio do *software* Genes (Cruz, 2013), onde foram realizadas as análises necessárias para o estudo de identificação dos grupos heteróticos para o germoplasma estudado.

A análise de variância para o delineamento em blocos ao acaso foi realizada respeitando o seguinte modelo estatístico:

$$\gamma_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$$

em que:

γ_{ij} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i no bloco j ;

μ : média geral do experimento;

g_i : efeito do genótipo i , $i = 1, 2, \dots, 38$, sendo NID $(0, \sigma_g^2)$;

b_j : efeito do bloco j , $j = 1, 2, \dots, 4$, sendo NID $(0, \sigma_b^2)$; e

e_{ij} : erro experimental associado à observação γ_{ij} , sendo NID $(0, \sigma^2)$.

Os componentes de variância foram estimados considerando todos os efeitos aleatórios.

4.5.2. Identificação dos grupos heteróticos baseada em informações morfoagronômicas

As variáveis fenotípicas foram analisadas com o auxílio do *software* Genes (Cruz, 2013), em que na plataforma de análises multivariadas foram extraídas as matrizes de distâncias genéticas por meio de diferentes algoritmos, sendo uma a distância generalizada de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936), expressa por:

$$D_{ii'}^2 = \delta_{ii'}' \varphi^{-1} \delta_{ii'}$$

em que:

$D_{ii'}^2$: é a distância generalizada de Mahalanobis entre os acessos i e i' , sendo $i = 1, 2, \dots, g$;

$\delta_{ii'}'$: [$d_1 d_2 \dots d_v$], sendo $d_j = Y_{ij} - Y_{i'j}$;

Y_{ij} : é a média do i -ésimo acesso em relação à j -ésima variável, sendo $j = 1, 2, \dots, p$; e

φ^{-1} : é a inversa da matriz de variâncias e covariâncias residuais.

A segunda distância genética foi estimada com base no algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

em que:

k : número de variáveis ($k=1, 2, \dots, p$);

i e j : dois indivíduos que representem o acesso;

W_{ijk} : peso dado à comparação ijk , atribuindo valor 1 para comparações válidas e valor 0 para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); e

S_{ijk} : contribuição da variável k na similaridade entre os indivíduos i e j com valores entre 0 e 1, sendo $S_{ijk} = \frac{1 - |x_{ik} - x_{jk}|}{R_k}$, em que x_{ik} e x_{jk} são os valores da variável k para os indivíduos i e j , respectivamente, e R_k é o intervalo (valor máximo menos valor mínimo), da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo [0, 1] e pesos iguais.

Após a estimação das matrizes de distâncias genéticas pelo *software* R (versão 3.0.1; R Core Team, 2013) foram realizados os agrupamentos pelos métodos hierárquicos, sendo o método da ligação média entre grupos ou UPGMA e o método da variância mínima de Ward (Ward, 1937) utilizados para as características fenotípicas. O ponto de corte para determinação do número de grupos em cada agrupamento foi definido conforme expressão proposta por Mojena (1977):

$$PC = \hat{\mu}_\alpha + k\hat{\sigma}_\alpha$$

em que:

PC : ponto de corte do dendrograma determinado para a identificação do número de grupos;

$\hat{\mu}_\alpha$: média dos pontos de fusão;

$\hat{\sigma}_\alpha$: desvio padrão dos pontos de fusão entre dois grupos presentes no dendrograma; e

k : é uma constante estabelecida arbitrariamente, sendo $k = 1,25$, utilizada de acordo com o proposto por Milligan e Cooper (1985).

A consistência dos métodos de agrupamentos foi avaliada pelos coeficientes de correlação cofenética (CCC), onde as significâncias dos CCC foram examinadas pelo teste de Mantel (Mantel, 1967).

4.6. Análises moleculares e divergência genética

4.6.1. Preparo das amostras para avaliação

Para realização das análises moleculares, no mês de novembro de 2015 na Unidade de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UAP-UENF), foram semeadas em bandeja de isopor para mudas contendo substrato comercial, duas sementes de cada genótipo por célula, em que aos 14 dias após a semeadura, foi coletada uma amostra composta por folhas jovens de cada genótipo analisado.

Cada amostra coletada foi devidamente identificada, recoberta com papel alumínio e imediatamente imersa em nitrogênio líquido. Logo após, todas as amostras foram armazenadas em ultrafreezer à temperatura constante de $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

4.6.2. Extração de DNA

As amostras de folhas jovens coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido com a finalidade de fazer a extração do DNA genômico. Todo o processo de extração seguiu o protocolo descrito a seguir:

(i) Preparo da solução de extração (CTAB 2%):

- 100mL de TRIS 1M (pH 8,0);
- 280 mL de NaCl 5M (80 g de NaCl);
- 80 mL de EDTA 0,25M (40 ml de EDTA 0,5M);
- 20 g de CTAB; e
- Completar o volume para 1 L com água ultrapura.

(ii) Solução de extração CTAB 2% (para 24 amostras):

- 22,5 mL de CTAB 2%;
- 0,45 g de PVP; e
- 22,5 μ L de β -mercaptoetanol.

Protocolo:

1. Pesar de 20 a 40 mg de tecido foliar;
2. Macerar as amostras em nitrogênio líquido;
3. Transferir o macerado para *ependorf* de 2 mL;
4. Adicionar 700 μ L da solução de extração;
5. Incubar em banho-maria por 50 minutos, a 65 °C, homogeneizando a cada 10 minutos;
6. Deixar esfriar à temperatura ambiente;
7. Adicionar 600 μ L de CIA (na proporção de 24:1 de clorofórmio: álcool isoamílico);
8. Agitar por 1 minuto, com auxílio de vórtex, até completa homogeneização;
9. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos;
10. Transferir o sobrenadante para *ependorf* de 1,5 mL;
11. Adicionar 500 μ L de isopropanol (acondicionado a 5 °C);
12. Inverter suavemente (precipitação do DNA é visível);
13. Acondicionar a -20 °C de 30 minutos a 3 horas ou *over night* a 4 °C;
14. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm;

15. Descartar o sobrenadante (atenção necessária para não descartar o *pellet*);
16. Adicionar 500 μL de etanol 70%, centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante em seguida (atenção para não descartar o *pellet*). Repetir o procedimento uma vez;
17. Deixar o *pellet* secar à temperatura ambiente;
18. Ressuspender o *pellet* em 200 μL de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10mM + EDTA 1mM) contendo RNase (para 24 amostras: 5 mL de H₂O ultrapura + 40 μL de RNase); e
19. Incubar em banho-maria a 37 °C por 30 minutos ou até o *pellet* se dissolver completamente.

4.6.3. Quantificação do DNA das amostras

A quantificação do DNA extraído nas amostras foi realizada através do fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen), capaz de quantificar amostra entre 10 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respeitando as diretrizes do protocolo descrito abaixo baseado nas instruções do fabricante do Kit Qubit dsDNA HS (*High Sensitivity*). Para tanto, adotou-se o seguinte protocolo:

1. Preparar a solução de trabalho (*Working Solution*) com o fluoróforo na proporção de 1:200;
2. Para a quantificação usa-se uma curva padrão com valor de 0 a 200, utilizando duas soluções padrão, na quantidade de 10 μL do padrão e 190 μL da solução de trabalho;
3. Adicionar 10 μL de cada padrão Qubit ao tubo apropriado e misturar em vórtex por 2-3 segundos, tomando cuidado para não criar bolhas. Pipetar com precisão, pois é fundamental para garantir a exatidão da análise;
4. Pipetar nos tubos 199 μL da solução e 1 μL do DNA extraído de cada amostra. O DNA pode ser diluído 5, 10 ou 20 vezes, dependendo da amostra;

5. Ligar o aparelho. Na tela inicial do Qubit 2.0 Fluorometer, pressione *DNA*, e em seguida, selecione *dsDNA Alta Sensibilidade* como o tipo de ensaio. A tela *Padrões* é exibida automaticamente. Se você já tiver realizado uma calibração para o ensaio selecionado, o aparelho irá pedir para escolher entre ler novos padrões ou usar a calibragem anterior;
6. Na tela *Padrões*, pressione *Yes* para executar uma nova calibração ou pressione *No* para utilizar a última calibração;
7. Para uma nova calibração, insira o tubo contendo padrão 1 no aparelho, feche a tampa e pressione *Read*. A leitura vai demorar cerca de 3 segundos;
8. Remova o padrão 1;
9. Insira o tubo contendo padrão 2, feche a tampa e pressione *Read*.
10. Remova o padrão 2;
11. A tela *Sample* será automaticamente exibida;
12. Insira um tubo de amostra no aparelho, feche a tampa e pressione *Read*; e
13. Após a conclusão da medição, o resultado é exibido na tela.

O valor obtido corresponde à concentração da amostra que foi diluída (em ng.mL^{-1}). Para calcular a concentração da amostra original, realizou-se o seguinte cálculo:

Concentração da amostra = valor QF x (200); em que: Valor QF = o valor dado pelo aparelho, e X = microlitros da amostra adicionada.

4.6.4. Seleção dos *primers* SSR-ESTs

Com base no Banco de Dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), que apresenta as sequências desenvolvidas e mapeadas por Sharopova et al. (2002) para a espécie *Zea mays* L., foram identificados os iniciadores microssatélites (SSR-ESTs). Procurou-se selecionar uma quantidade de importância significativa distribuída em cada cromossomo da cultura, para uma adequada amostragem do genoma.

De posse de 193 iniciadores selecionados, foi realizada uma triagem em *bulk* dos genótipos analisados, a fim de identificar os *primers* que apresentaram bandas polimórficas. Selecionaram-se, então, 15 *primers* polimórficos para a realização das análises moleculares nos genótipos, individualmente.

4.6.5. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Conhecendo as temperaturas ótimas de anelamento para cada um dos iniciadores sintetizados e pré-selecionados, foi realizado um *screening* com a finalidade de selecionar os *primers* com base no grau de polimorfismo e na qualidade das amplificações, por meio de eletroforese em gel de agarose Metaphor[®].

As reações de amplificação (PCR) foram feitas em um volume final de 13 μL por reação, contendo 1,5 reação 10X (*Thermo Scientific, Fermentas, USA*), 1,0 μL de MgCl_2 a 25 nM (*Thermo Scientific, Fermentas, USA*), 1,5 μL de dNTP a 2 mM (*Aldrich Sigma, USA*), 1,0 μL de *primer R+F* (*Aldrich Sigma, USA*), 0,12 μL de Taq DNA polimerase (*Thermo Scientific, Fermentas USA. 5 U. μL^{-1}*) e 2,0 μL de DNA (5 ng. μL^{-1}), além de 5,88 μL de água ultra purificada. As amplificações foram feitas obedecendo a cada respectiva temperatura ideal de anelamento (T_m) dos iniciadores, em um termociclador *Applied Biosystems/ Veriti 96 well*. Foi utilizado um programa de 35 ciclos, obedecendo às seguintes temperaturas e tempo: 94 °C durante 4 minutos (desnaturação inicial); 94 °C por 1 minuto (desnaturação cíclica); temperatura específica de cada iniciador (58 a 65) em °C, por 1 minuto (anelamento); 72 °C por 3 minutos (extensão cíclica); 72 °C por 7 minutos (extensão final); e 4 °C *forever*.

4.6.6. Eletroforese capilar

De posse dos 15 pares de iniciadores selecionados, estes foram submetidos à eletroforese capilar, utilizando-se do *Fragment Analyser (Advanced Analytical)*.

As amostras foram preparadas em volume de 24 μL , utilizando 4 μL de material amplificado e 20 μL de tampão, distribuídas em placas específicas para o aparelho, contendo cada placa 96 poços para a eletroforese capilar. O *Fragment Analyser* (AATI) permite detectar alelos com segurança, com diferenças de até cinco pares de bases. Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se o marcador *DNA Ladder*, contendo uma variação de 35 a 500 pb. As amostras foram transportadas para os capilares, onde foram submetidos à corrida de 110 minutos em uma corrente de 8,0 Kw. Ao fim, as imagens foram analisadas para determinação dos alelos.

4.6.7. Análise dos dados moleculares

Para as variáveis moleculares obtidas pela amplificação dos iniciadores SSR-ESTs foram convertidos em código numérico para cada alelo por loco. Tal matriz numérica foi desenvolvida, atribuindo valores de 1 até o número máximo de alelos no loco, como descrito no exemplo a seguir: para um loco que apresenta três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 para as formas homozigotas (A1A1, A2A2 e A3A3) e 12, 13 e 23 para as heterozigotas (A1A2, A1A3 e A2A3). Respaldo nessa matriz numérica, com auxílio do programa *Power Marker*, versão 3.25 (Liu e Muse, 2005), estimou-se a diversidade genética com base no número de alelos (N_a), o número de alelos efetivos (N_e) e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

4.6.8. Análise estrutural e determinação dos grupos heteróticos

Utilizando um método heurístico baseado em algoritmos de agrupamento bayesiano, em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy-Weinberg e à ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população, foi determinado o número de grupos entre os genótipos estudados, com o auxílio do *software* STRUCTURE na versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).

Para a realização das análises, empregaram-se critérios, como o modelo (“*no admixture model*”) e frequências correlacionadas, usando-se “*Burnin Period*”

= 10.000, com extensão MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) de 50.000 repetições, com número de grupos (k) predeterminados variando de 1 a 10. A máxima probabilidade de adesão entre os grupos foi determinada por um limite de 0,75. Foi utilizada a proposta de Evanno et al. (2005) para inferir o real valor de K na população, utilizando marcadores SSR-ESTs, pois a distribuição da verossimilhança $L(k)$ não apresenta o verdadeiro valor de K . Para esta inferência o *software* STRUCTURE HARVESTER versão 0.6.94 (Earl e Von, 2016) foi utilizado para o processamento dos arquivos de resultados do STRUCTURE, versão 2.3.4.

4.7. Identificação dos grupos heteróticos baseada em variáveis moleculares

Os dados genotípicos foram analisados com o auxílio do *software* Genes (Cruz, 2016), onde se realizaram duas análises de agrupamentos (UPGMA e Ward) baseados nos seguintes algoritmos de distâncias genéticas:

a) Índice ponderado:

$$S_{ii'} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^L p_j c_j$$

em que:

$p_j = \frac{a_j}{A}$: peso associado ao loco j , determinado por:

a_j : número total de alelos do loco j ,

A : número total de alelos estudados.

b) Índice não ponderado:

$$S_{ii'} = \frac{1}{2L} \sum_{j=1}^L c_j$$

em que:

L : número total de locos estudados; e

c_j : número de alelos comuns entre os pares de acessos i e i' .

c) Índice d^2 de Smouse e Peakall (Smouse e Peakall, 1999):

$$d_{ii'}^2 = \frac{1}{2L} \sum_{j=1}^L \sum_{k=1}^{a_j} (y_{ijk} - y_{i'jk})^2$$

em que:

y_{ijk} : refere-se à quantidade de alelos k no loco j que o indivíduo i apresenta.

Após a estimação das matrizes de distâncias genéticas, através da utilização do *software* R (versão 3.0.1; R Core Team, 2013) foram realizados os agrupamentos pelos métodos hierárquicos da ligação média entre grupos ou UPGMA e da variância mínima de Ward (Ward, 1937), para os 38 genótipos de milho-pipoca. O ponto de corte para determinação do número de grupos em cada agrupamento foi definido conforme expressão proposta por Mojena (1977):

$$PC = \hat{\mu}_\alpha + k\hat{\sigma}_\alpha$$

em que:

PC : ponto de corte do dendrograma determinado para a identificação do número de grupos;

$\hat{\mu}_\alpha$: média dos pontos de fusão;

$\hat{\sigma}_\alpha$: desvio padrão dos pontos de fusão entre dois grupos do dendrograma;

e

k : é uma constante estabelecida arbitrariamente, sendo $k = 1,25$, utilizada de acordo com o proposto por Milligan e Cooper (1985).

A consistência dos métodos de agrupamentos foi avaliada pelos coeficientes de correlação cofenética (CCC), em que as significâncias dos CCC foram examinadas pelo teste de Mantel (Mantel, 1967).

4.8. Identificação de grupos heteróticos baseada na utilização simultânea de informações morfoagronômicas e moleculares

As variáveis morfoagronômicas e moleculares foram analisadas simultaneamente pelo procedimento proposto por Franco et al. (1998), denominado *Ward-Modified Location Model* (MLM), para o qual foi utilizado o *software* SAS (SAS Institute, 2003), com base no algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

em que:

k : número de variáveis ($k=1, 2, \dots, p$);

i e j : dois indivíduos que representem o acesso;

W_{ijk} : peso dado à comparação ijk , atribuindo valor 1 para comparações válidas e valor 0 para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); e

S_{ijk} : contribuição da variável k na similaridade entre os indivíduos i e j com valores entre 0 e 1. Para uma variável qualitativa (nominal), se o valor da variável k é o mesmo para ambos os indivíduos, i e j , então $S_{ijk} = 1$, caso contrário, é igual a 0. Para uma variável quantitativa (contínua), $S_{ijk} = \frac{1-|x_{ik}-x_{jk}|}{R_k}$, em que x_{ik} e x_{jk} são os valores da variável k para os indivíduos i e j , respectivamente, e R_k é o intervalo (valor máximo menos valor mínimo), da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo [0, 1] e pesos iguais.

Após a estimação da matriz de distância genética, por meio da utilização do *software* R (versão 3.0.1; R Core Team, 2013) foram realizados os agrupamentos pelos métodos hierárquicos da ligação média entre grupos ou UPGMA e da variância mínima de Ward (Ward, 1937), para os 38 genótipos de milho-pipoca. O ponto de corte para determinação do número de grupos em cada agrupamento foi definido conforme expressão proposta por Mojena (1977):

$$PC = \hat{\mu}_\alpha + k\hat{\sigma}_\alpha$$

em que:

PC : ponto de corte do dendrograma determinado para a identificação do número de grupos;

$\hat{\mu}_\alpha$: média dos pontos de fusão; e

$\hat{\sigma}_\alpha$: desvio padrão dos pontos de fusão entre dois grupos do dendrograma;

k : é uma constante estabelecida arbitrariamente, sendo $k = 1,25$, utilizada de acordo com o proposto por Milligan e Cooper (1985).

A consistência dos métodos de agrupamentos foi avaliada pelos coeficientes de correlação cofenética (CCC), em que as significâncias dos CCC foram examinadas pelo teste de Mantel (Mantel, 1967).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises de variâncias e de médias

Pelos resultados da análise de variância, notou-se que apenas três características morfológicas - altura média de plantas (AP), altura média de espigas (AE) e diâmetro médio de colmo (DC) - não revelaram diferença significativa para os 38 germoplasmas de milho-pipoca avaliados, para com as dez características morfoagronômicas analisadas (Tabela 2). Resultados contrastantes foram encontrados por Pandit et al. (2016), em que, com base na estimativa da divergência entre vinte genótipos de milho, observaram maior variação para as características de altura de plantas e de espigas. Com relação à característica dias para o florescimento (FLOR), corroboram-se as diferenças entre os genótipos estudados.

Em geral, os valores dos coeficientes de variação experimental para as características avaliadas foram satisfatórios, apresentando valores considerados baixos para comprimento médio do pendão (CP) e dias para o florescimento (FLOR), bem como valores médios para número de ramificações do pendão (NRP) e número médio de fileiras de grãos por espigas (NFE), além de estimativas de magnitudes elevadas para massa média de 100 grãos (M100), comprimento de espigas (CESP) e número de grãos por fileiras (NGF), conforme escala de classificação de coeficientes de variação de Pimentel Gomes (1990).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância com os respectivos quadrados médios e graus de liberdade (GL), estimativas dos coeficientes de variação experimental (CV%) e das médias para as características avaliadas, no ensaio em delineamento em blocos ao acaso. Campos dos Goytacazes, RJ.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio ^{1/}									
		AP	AE	DC	CP	NRP	FLOR	P100	CESP	NFE	NGF
Blocos	3	0,92	0,81	172,35	148,67	76,02	179,71	47,57	29,62	20,10	69,61
Genótipos	37	0,032 ^{ns}	0,04 ^{ns}	2,29 ^{ns}	81,94 ^{**}	151,19 ^{**}	96,86 ^{**}	18,40 ^{**}	16,15 ^{**}	9,64 ^{**}	146,97 ^{**}
Resíduo	111	0,053	0,044	26,38	102,05	65,21	169,67	46,97	59,51	25,75	223,38
Média		1,56	0,93	16,14	34,96	18,74	58,57	7,75	11,02	12,54	22,27
CV(%)		14,80	22,58	10,06	9,14	13,63	7,03	27,96	22,13	12,80	21,22

^{1/}AP = Altura média de plantas (m); AE = Altura média de espigas (m); DC = Diâmetro médio de colmo (cm); CP = Comprimento médio de pendão (cm); NRP = Número médio de ramificações do pendão; FLOR = Número de dias para o florescimento; P100 = Massa média de 100 grãos (g); CESP = Comprimento de espiga (cm); NFE = Número de fileiras de grãos; NG = Número de grãos por fileira; ^{ns} = Não significativo pelo teste F, a 1 e 5 % de probabilidade; ^{**} = Significativo pelo teste F, a 1 % de probabilidade.

As diferenças significativas para os germoplasmas estudados apresentadas por sete variáveis mostraram ser possível a implementação de estudos de diversidade entre esses genótipos baseados em dados morfológicos. Por conseguinte, foram utilizadas as médias das características que apresentaram significância, descartando-se as características que não apresentaram diferenças significativas.

5.2. Identificação de grupos heteróticos fundamentada em características morfoagronômicas

A partir das matrizes de distâncias de Mahalanobis e de Gower, obtiveram-se os agrupamentos pelos métodos UPGMA e Ward, respectivamente Figuras 1 e 2, em que constam a dispersão dos 38 genótipos de milho-pipoca.

O método de agrupamento baseado na ligação média não ponderada (UPGMA), obtido pela matriz de distância de Mahalanobis (Figura 1), demonstrou a divisão dos genótipos em dois grupos, sendo um grande grupo formado por 31 genótipos. O segundo grupo foi formado por cinco genótipos, sendo todos derivados de raças originárias de países da América do Sul, como: Paraguai, Uruguai, Argentina e Bolívia. Os genótipos L88 e BOYA 462 não revelaram ligação a quaisquer genótipos, apresentando-se isolados, a saber: esses genótipos apresentam médias de capacidade de expansão de 15,33 e 8,00 mg.ml⁻¹, respectivamente (Tabela 1).

No intento de realizar cruzamentos entre genótipos efetivamente distintos, para a fidedigna capitalização da complementação alélica, o cruzamento entre os genótipos do grupo maior com os cinco genótipos do segundo grupo, pode ser uma alternativa voltada à seleção e exploração da heterose. Nesse caso, a realização do cruzamento entre os genótipos do primeiro grupo com BOYA 462, pode ser considerada oportuna, uma vez que estes apresentaram a menor similaridade para o agrupamento realizado baseado na matriz de distância de Mahalanobis (Figura 1).

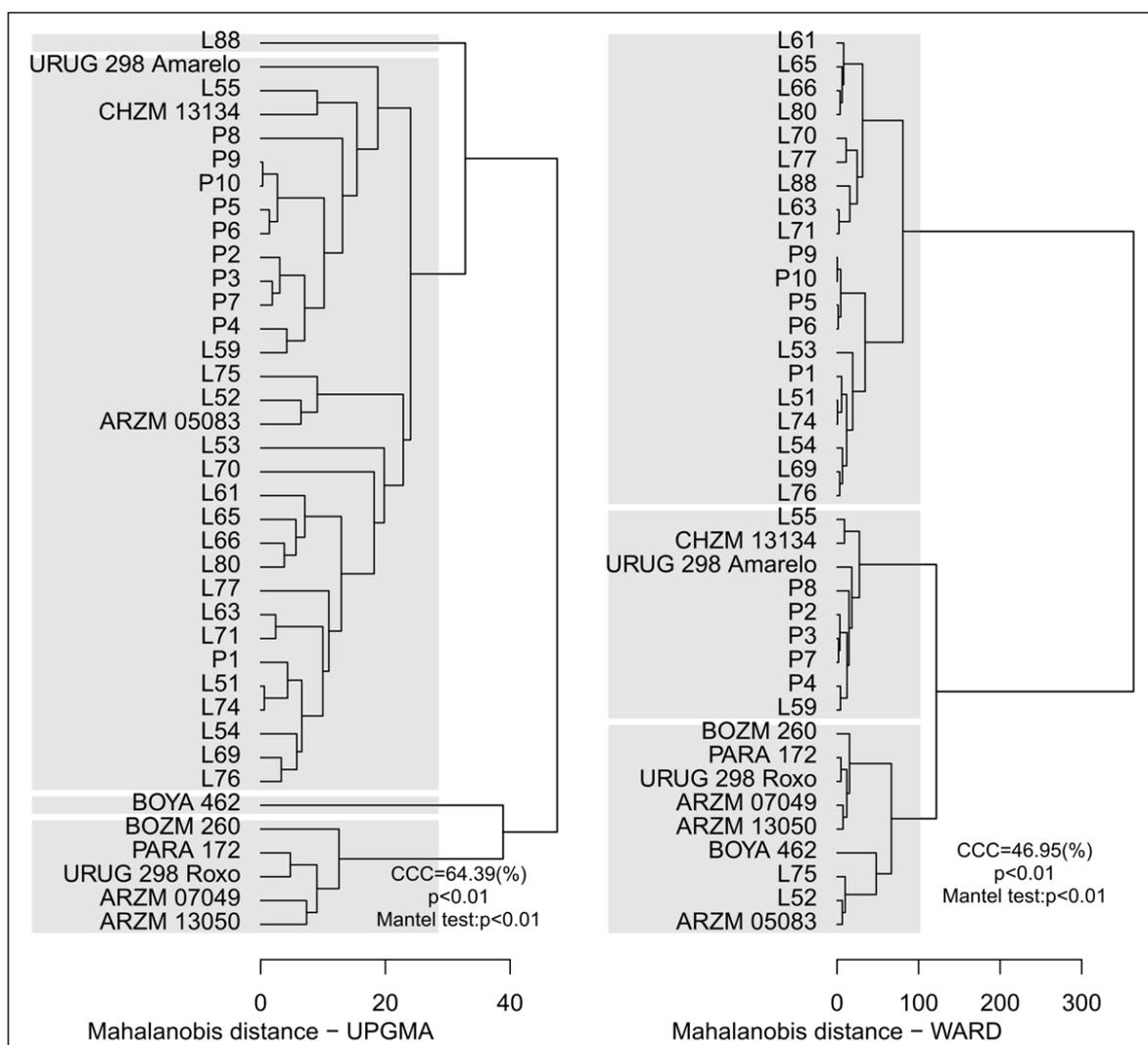


Figura 1 – Dendrogramas obtidos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward, baseados nas distâncias genéticas de Mahalanobis, para 38 genótipos de milho-pipoca com ponto de corte determinado com base no proposto por Mojena (1977) e coeficiente de correlação cofenética (CCC).

Observou-se que quase todas as linhagens derivadas de genótipos nacionais se apresentaram alocadas em um grupo, destacando pela metodologia proposta por Mahalanobis que estes genótipos apresentam baixa distância genética entre elas. A única linhagem que se posicionou isoladamente foi L88, indicando tratar-se de genitor de interesse para a maior expressão heterótica na constituição de híbridos.

Analisando o dendrograma gerado pelo método de Ward, utilizando a matriz de distância de Mahalanobis (Figura 1), constata-se que os 38 genótipos foram distribuídos em três grupos: um, contendo vinte genótipos; e dois, compostos por nove genótipos cada.

O genótipo BOYA 462 pelo método de agrupamento de Ward com distância de Mahalanobis não se apresentou isoladamente; no entanto, está presente em um grupo composto por quatro genótipos (L52, ARZM 05083 e L75), onde foi possível notar que apresenta pequena similaridade genética para com os demais genótipos pertencentes ao grupo (Figura 1).

Notou-se que a mudança do método de agrupamento utilizado, com a distância genética de Gower e agrupamento pelo método de Ward (Figura 2), proporcionou a fragmentação do maior grupo composto por 31 genótipos no primeiro método analisado, distribuindo os genótipos em menores grupos com maior similaridade entre os componentes dos mesmos. Por outro lado, observou-se que os cinco genótipos que constituíram um grupo para os agrupamentos anteriores - PARA 172, URUG 298 Roxo, ARZM 07049, ARZM 13050 e BOZM 260 - permaneceram alocados em um mesmo grupo, demonstrando a efetiva similaridade entre estes indivíduos, independente da distância e do método de agrupamento empregado. O agrupamento realizado utilizando a metodologia de Ward pode ter sido mais eficiente na identificação de grupos mais divergentes, observado pela maior fragmentação dos grupos quando comparado ao método UPGMA.

Três grupos foram identificados com o agrupamento UPGMA, utilizando a matriz de distâncias de Gower (Figura 2). O maior grupo foi composto por 19 genótipos, um segundo grupo contendo 13 genótipos e um terceiro, com cinco genótipos, sendo todos derivados de raças originárias de países da América do Sul, como: Paraguai, Uruguai e Argentina, indicando a possibilidade destes genótipos de compartilharem um mesmo *pool* gênico, sendo dessa maneira geneticamente próximos. O genótipo BOYA 462 apresentou-se isoladamente, ratificando a dessemelhança deste para com os demais.

Observou-se que independentemente do método de agrupamento utilizado e do algoritmo de distância genética, quatro genótipos estiveram, recorrentemente, alocados no mesmo grupo - ARZM 13050, ARZM 07049, PARA 172 e URUG 298 Roxo -, acenando que se trata de genótipos com forte aparência genética, indicando que este grupo tende a ser um potencial grupo efetivamente heterótico para com os demais, sendo importantes para o direcionamento de cruzamentos de linhagens derivadas destas populações, pois tendem a favorecer a capitalização da interação alélica na expressão da heterose.

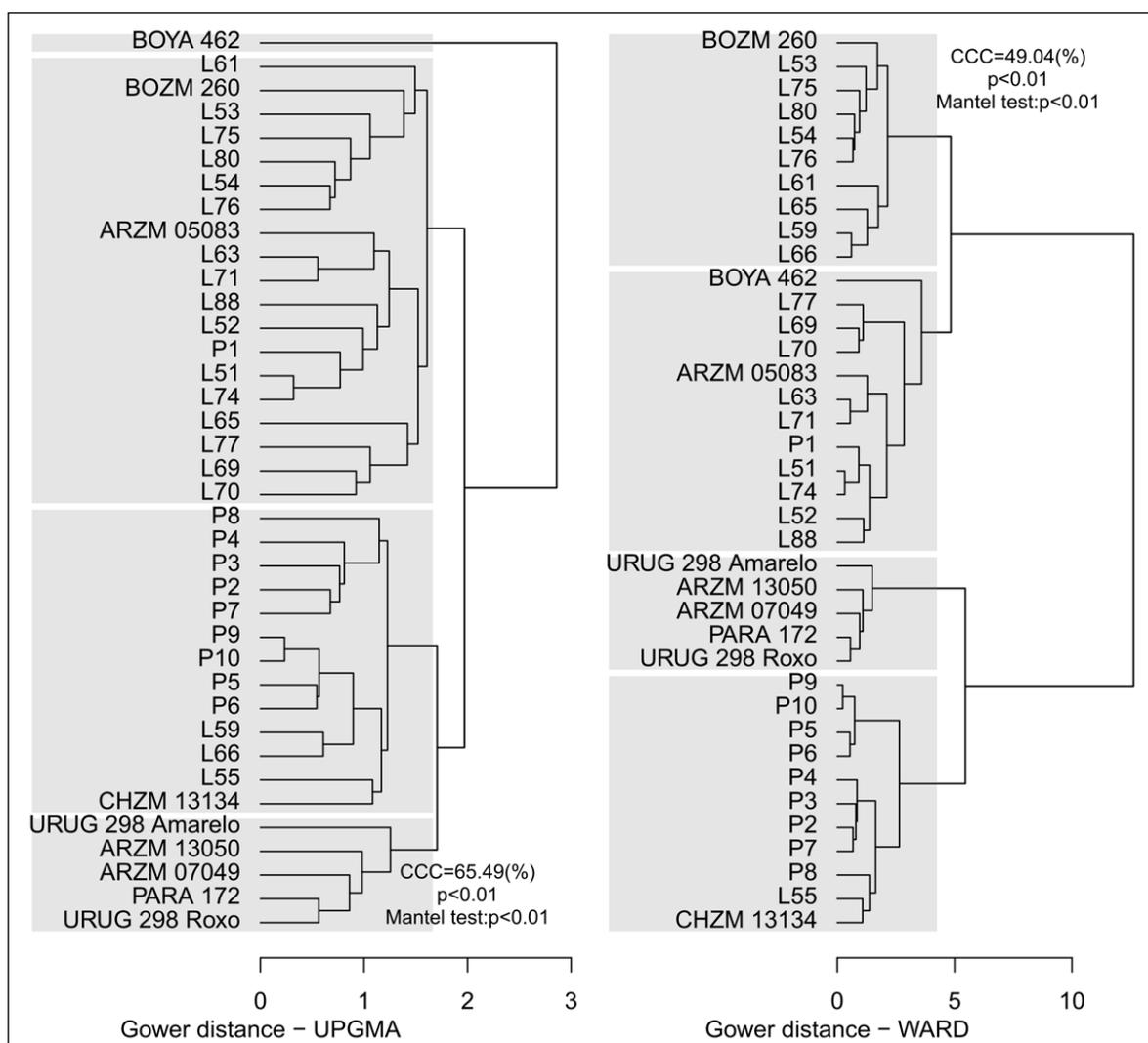


Figura 2 – Dendrogramas obtidos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward, baseados nas distâncias genéticas do algoritmo de Gower, para 38 genótipos de milho-pipoca com ponto de corte determinado com base no proposto por Mojena (1977) e coeficiente de correlação cofenética (CCC).

Os coeficientes de correlação cofenética (CCC) foram utilizados para verificar a consistência dos agrupamentos realizados. Para tanto, o teste de Mantel, realizado com 1.000 permutações, confirmou a associação entre as matrizes de distâncias e os métodos de agrupamentos, apresentando significância ($p > 0,01$) para os valores de CCC encontrados, que variaram de 46,95 % a 65,49 % (Figuras 1 e 2).

É importante a observação da magnitude dos valores do coeficiente de correlação cofenética, independentemente se todos apresentaram significância ($p > 0,01$), pois os valores próximos à unidade devem ser optados, uma vez que indicam a maior consistência dos padrões de agrupamentos realizados (Barroso e Artes, 2003; Cruz e Carneiro, 2006; Cargnelutti Filho et al., 2010). Diante disso,

pode-se afirmar que o método de agrupamento UPGMA apresentou melhor consistência do padrão de agrupamento, a partir das duas matrizes de distâncias genéticas - Mahalanobis e Gower -, em comparação com o método de agrupamento de Ward.

Observou-se que as principais características que contribuíram para os estudos de agrupamentos dos germoplasmas analisados foram as que envolvem morfologia de espigas e pendão das plantas. Salazar et al. (2016), realizando estudo sobre a diversidade fenotípica com 34 genótipos de milho, observaram que a diferenciação genotípica ocorreu, sobretudo, em decorrência da fenologia da planta e de características das espigas, corroborando com os resultados obtidos na presente pesquisa.

Os resultados aqui obtidos indicam elevada variabilidade entre os genótipos avaliados, sendo presumível a futura identificação de grupos heteróticos, o que permitirá subsequentemente, explorar eficientemente a heterose em programas de melhoramento. Esses resultados indicam que elevada gama de características potenciais e a variação fenotípica podem proporcionar uma boa fonte de identificação de grupos heteróticos e consequente aplicação do melhoramento genético da cultura por meio do desenvolvimento de cultivares melhoradas (Salazar et al., 2016).

Analisando os resultados obtidos pelo conjunto de dados fenotípicos processados pelas técnicas de agrupamentos utilizadas, pode-se sugerir a possível existência de pelo menos dois grupos heteróticos para os germoplasmas avaliados neste trabalho. Uma vez que, independentemente da técnica utilizada, um grupo de genótipos - ARZM 13050, ARZM 07049, PARA 172 e URUG 298 Roxo - apresentou forte similaridade genética, pode-se presumir que estes genótipos formam prováveis grupos heteróticos e os demais são formadores do outro grupo, sendo possível, assim, a realização de cruzamentos futuros entre esses grupos para a fidedigna exploração da heterose em milho-pipoca.

5.3. Identificação de grupos heteróticos fundamentada em marcadores moleculares

Na Tabela 3 está contida a representação dos 15 *primers* SSR-ESTs, com a temperatura média de anelamento para cada loco, as quais variaram de 59 a 65 °C. Com uma variação de dois a cinco alelos identificados por loco, foram totalizados 42 alelos para os 15 locos avaliados, através do *Fragment Analyser (Advanced Analytical)*, gerando uma média geral de 2,88 alelos por loco.

A quantificação do polimorfismo genético contido em cada loco da população estudada e a indicação do nível de informação e potencial de cada loco para detecção de diferenças entre os genótipos, com base em suas relações genéticas são definidas pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Botstein et al., 1980; Rajendran et al., 2014). De acordo com a classificação recomendada por Botstein et al. (1980), um loco é considerado altamente informativo quando apresenta valor de PIC > 0,5, moderadamente informativo quando $0,5 > \text{PIC} < 0,25$ e não informativo quando este valor for inferior a 0,25.

Tabela 3 - *Primers* SSR-ESTs e respectivas temperaturas médias de anelamento (TM°C), número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne) e conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Loco	TM°C	Na	Ne	PIC
umc1118	62,0	2	1,85	0,35
ole1	62,0	3	2,20	0,45
umc1252	63,0	3	1,52	0,30
umc1139	63,0	2	1,82	0,34
umc1982	63,0	3	1,88	0,43
phi96100	59,0	5	3,39	0,67
umc1073	64,0	2	1,98	0,37
umc2319	64,0	3	1,38	0,25
glb1	62,0	3	1,99	0,42
umc1241	63,0	2	1,73	0,33
umc2112	63,0	3	2,98	0,59
umc1130	63,0	2	1,82	0,36
bip2	64,0	3	2,09	0,45
umc1515	62,0	3	2,00	0,40
y1	65,0	3	2,94	0,59
Média Geral		2,80	2,10	0,42
Total		42		

Três locos microssatélites (20 %) apresentaram-se altamente polimórficos e 12 locos (80 %) podem ser considerados moderadamente polimórficos, sendo que todos os locos microssatélites (100 %) analisados podem ser considerados

informativos. A média geral do PIC foi de 0,42, indicando que há um moderado nível de polimorfismo. O maior e menor valor do PIC foi observado para os locos *phi96100* e *umc2319*, com magnitudes de 0,67 e 0,25, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Pena et al. (2016), encontrando valor médio de PIC de 0,40, analisando progênies de milho-pipoca em S₃. Os resultados da pesquisa aqui realizada são considerados satisfatórios, uma vez que Zhang et al. (2014) relataram que vários trabalhos envolvendo esse tipo de marcador codominante revelam baixos a médios níveis de polimorfismo. A causa do baixo valor de PIC é atribuída à seleção praticada contra as possíveis variações em regiões conservadas dos marcadores SSR-ESTs (Scott et al., 2000).

Média de conteúdo de informação polimórfica superior foi encontrada por Silva et al. (2015), analisando genótipos de milho-pipoca inferidos por marcadores SSR-ESTs, com valor de PIC de 0,53. Porém, observou-se a presença de loco com praticamente nulidade de informação polimórfica, no caso, com magnitude de 0,06, enfatizando a qualidade dos resultados obtidos neste estudo, uma vez que o loco que apresentou o menor valor de PIC foi bem superior a esse valor, a saber – UMC 2319 – com magnitude de 0,25. Romero-Severson et al. (2001) afirmam que o PIC pondera o número de alelos e a frequência relativa destes alelos; assim, menores valores de PIC sinalizam alta frequência de um ou dois alelos.

A Figura 3 contém a revelação do gel virtual via *Fragment Analyzer*, do loco *phi96100* para os 38 acessos de milho-pipoca analisados, em que é possível identificar cinco alelos para este loco, com base nos padrões de bandas formados.

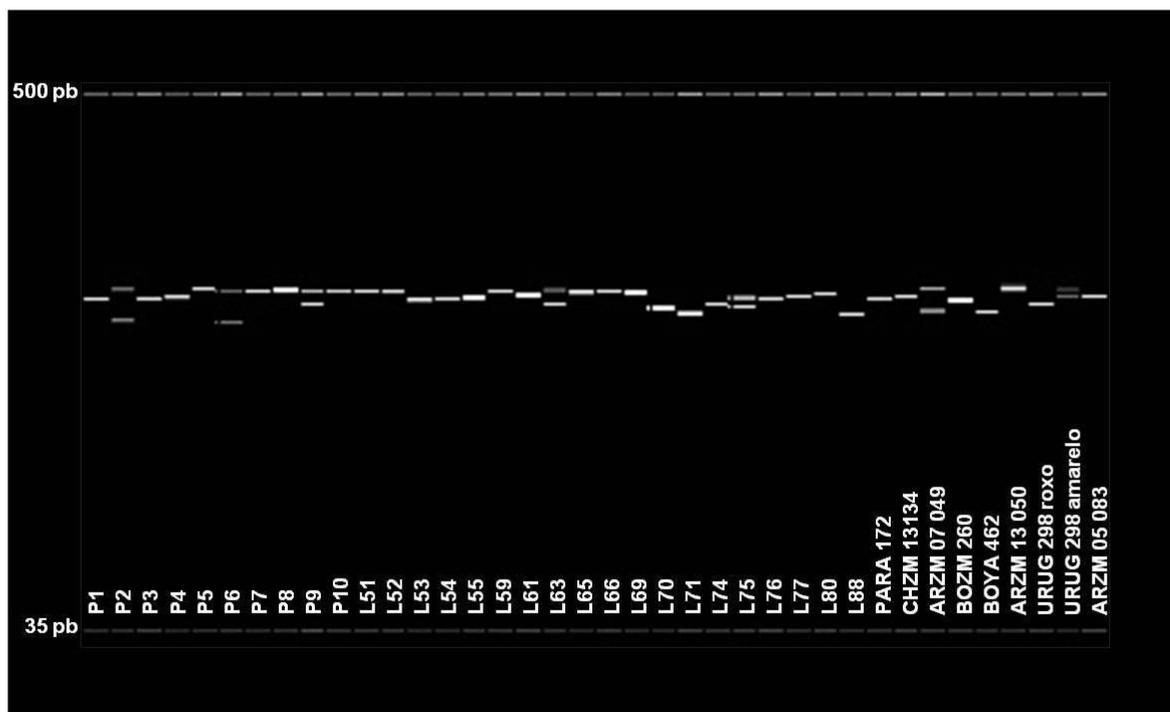


Figura 3 - Gel virtual gerado pelo *Fragment Analyzer*, para o loco *phi96100* em relação a 38 genótipos de milho-pipoca analisados.

A representação gráfica do loco *phi96100* está apresentada na Figura 4, em que foram selecionados aleatoriamente quatro genótipos, sendo três homozigotos e um heterozigoto, para ilustração dos cinco alelos possíveis para este loco, sendo identificados pela presença dos picos de acordo com a escala de pares de bases.

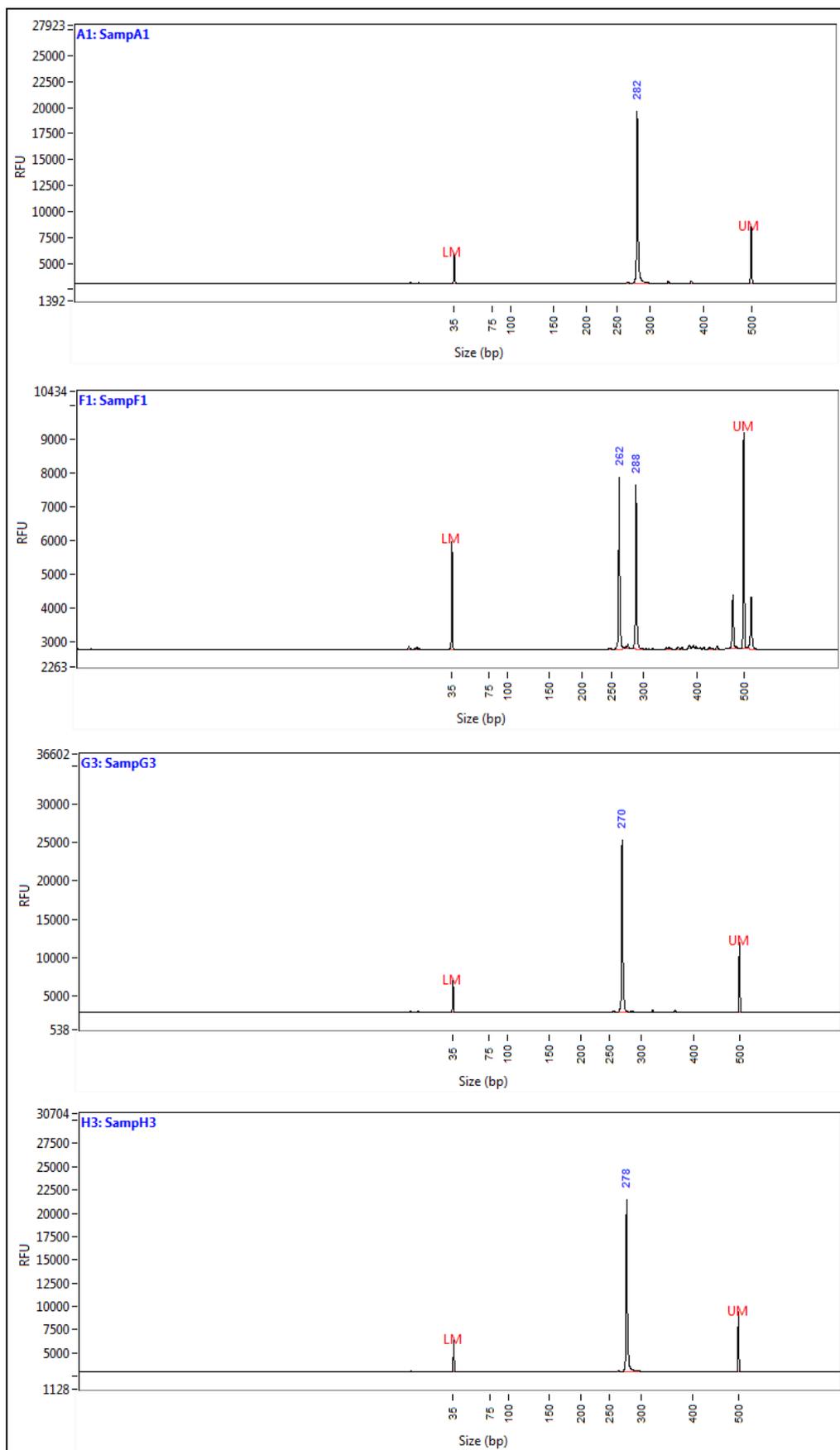


Figura 4 – Representação gráfica do loco *phi96100* em genótipos homocigotos e heterocigoto demonstrando suas cinco formas alélicas (alelo 1: 262bp; alelo 2: 270bp; alelo 3: 278bp; alelo 4: 282bp; e alelo 5: 288bp).

Como alternativa de classificação dos genótipos em diferentes grupos heteróticos, o *software Structure* na versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para a análise dos dados moleculares. Os 42 alelos encontrados foram utilizados para a inferência dos grupos genéticos para os 38 genótipos analisados, em que a abordagem bayesiana demonstrou a tendência na existência de três grupos, quando se observou maior valor de ΔK , sendo $K = 3$, identificado pelo pico apresentado na Figura 5, confirmado pela utilização do método de Evanno et al. (2005).

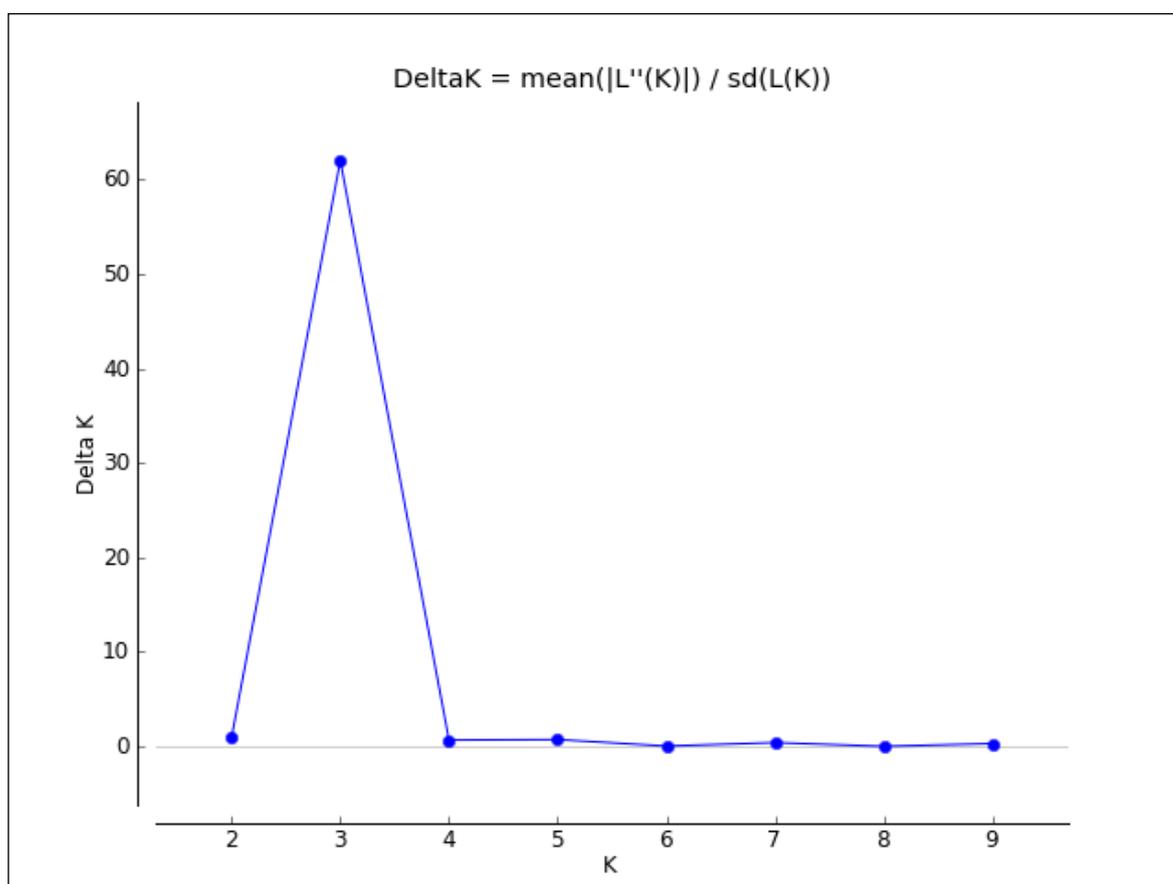


Figura 5. Valores de delta K (ΔK) para os respectivos números de grupos (K).

A curva de ΔK representa praticamente a nulidade nos demais pontos, exceto para o pico apresentado em $K=3$ (Figura 5). Essa determinação do número de grupo varia de acordo com a população de estudo. Nesse aspecto, Silva et al. (2015) determinaram valor de $K=2$, ao analisarem 31 acessos de milho-pipoca utilizando marcadores microssatélites. Quatro grupos foram apresentados por

Santos-Schneider (2013), avaliando 18 linhagens de milho-pipoca com o mesmo tipo de marcador.

A distribuição dos genótipos nos grupos heteróticos definidos pelo modelo bayesiano foi determinada pela probabilidade de adesão ao nível de probabilidade $> 0,75$, no entanto, alguns genótipos apresentaram probabilidades inferiores a $0,75$; dessa maneira, estes foram infligidos aos grupos de maior probabilidade de adesão superior (Figura 6). Observou-se que todos os genótipos alocados no grupo II, de coloração verde, apresentaram elevada aptidão a este grupo, a saber: L70, L66, L69, L71, L65, L61 e L63. Apenas alguns genótipos dos grupos I, de coloração vermelha, no caso, ARZM 13050 E BOYA 462 e três, na cor azul - L77, P4 e P6 - não apresentaram valores superiores a $0,75$, porém estes, em sua totalidade, exibiram valores maiores que $0,60$, considerados satisfatórios para alocação nestes grupos de maior probabilidade de adesão.

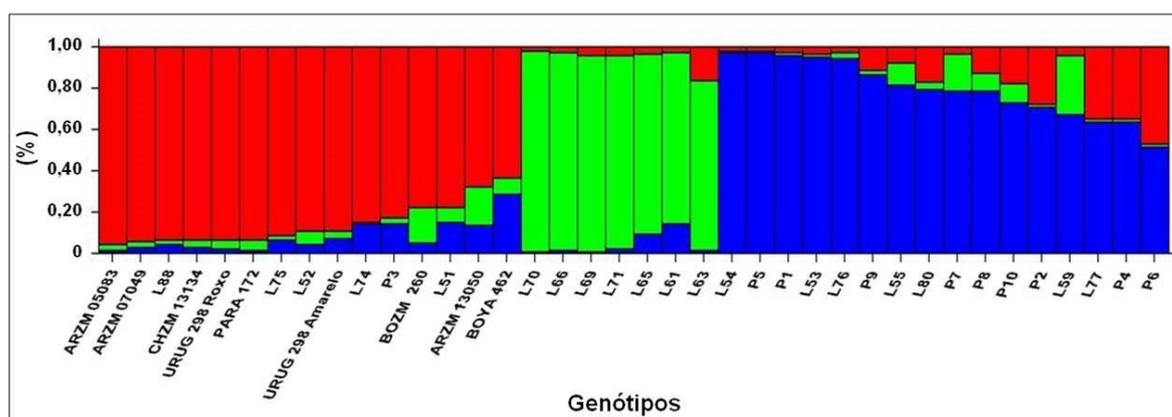


Figura 5 - Agrupamento pela inferência bayesiana de 38 genótipos de milho-pipoca com grupos identificados (K=3).

As populações de polinização aberta dos países Sul-Americanos - Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai -, foram todas alocadas no mesmo grupo, juntamente com algumas linhagens de diferentes origens, indicando a forte similaridade entre as raças Sul-Americanas, de forma análoga ao que ocorreu com os dados fenotípicos, donde se pode presumir que os alelos destas populações referem-se a um mesmo conjunto gênico ou, no mínimo, a conjuntos gênicos próximos. Isso revela, outrossim, a consistência dos marcadores moleculares como opção para a identificação de grupos heteróticos em milho-

pipoca, constituindo-se em ferramenta de interesse para futuros trabalhos com esse intento.

Todos os genótipos que compuseram o grupo II são derivados da variedade de milho-pipoca BRS Angela, que foi formada a partir de 33 genótipos distintos, sendo 28 de grãos com endosperma predominantemente branco e cinco, amarelo, do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo, sendo denominada material de origem tropical (Pacheco et al., 2004). O terceiro e maior grupo foi composto por 16 linhagens, todas derivadas de germoplasmas nacionais, indicando uma maior proximidade genética entre esses genótipos.

Santos-Schneider (2013) ressalta que a abordagem bayesiana empregada neste estudo para determinação de grupos divergentes pode ser eficiente em possível direcionamento de cruzamentos a partir de linhagens de milho-pipoca, para fins de obtenção de híbridos a partir da exploração de heterose.

Analisando diferentes populações de milho-pipoca, Bracco et al. (2009) apontaram que a técnica baseada em análises bayesianas para determinação de grupos pode ser eficiente na determinação de grupos heteróticos e consequente maximização de estratégias para aproveitamento dos recursos genéticos, visando ao desenvolvimento de genótipos superiores de milho-pipoca.

No anseio de confirmação dos resultados obtidos via análise apresentada anteriormente, foram realizadas duas análises de agrupamentos (UPGMA e Ward) baseadas no Índice Ponderado e Índice Não Ponderado, assim como Índice d^2 Smouse e Peakall (Figuras 6, 7 e 8, respectivamente).

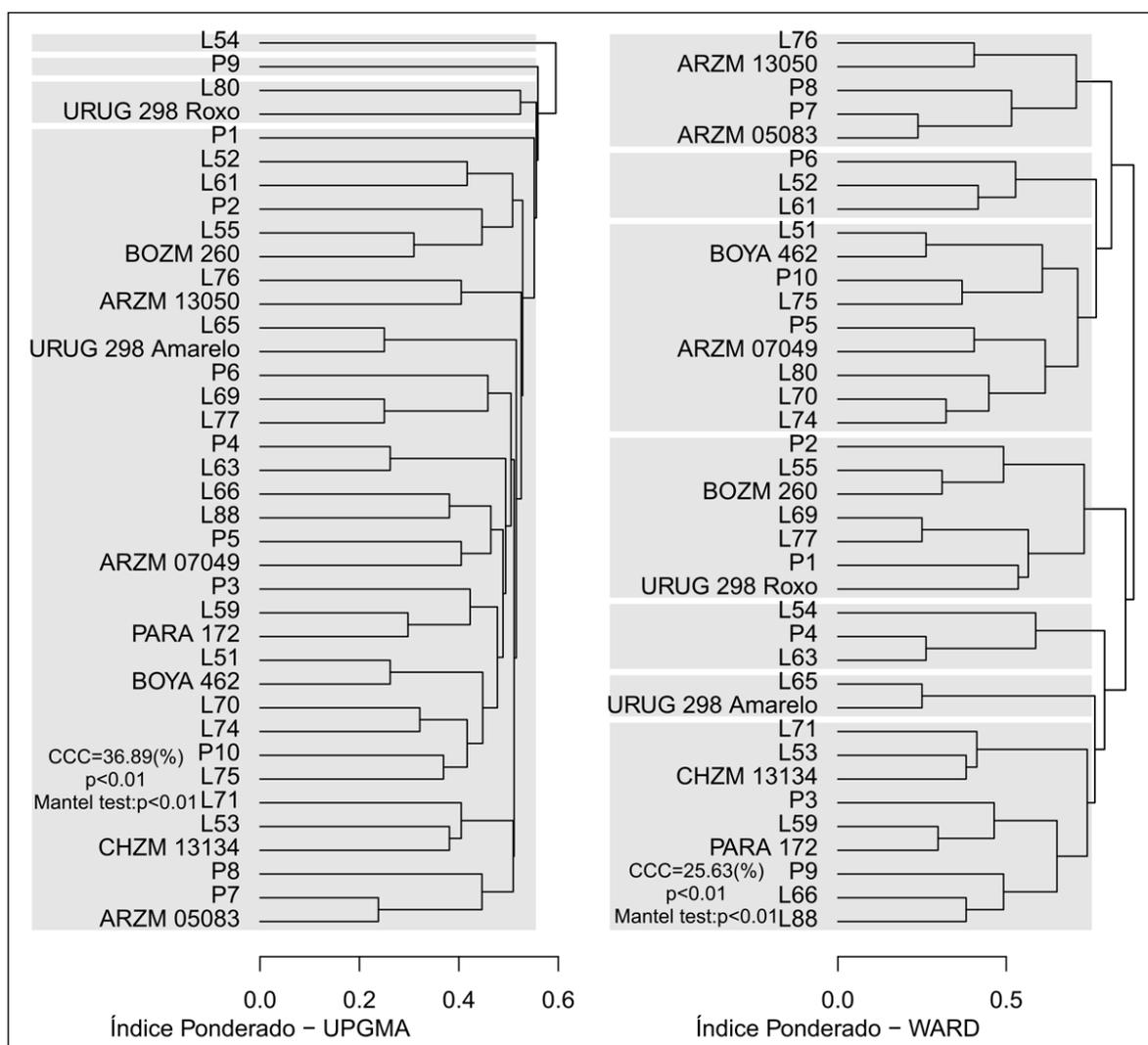


Figura 6 – Dendrogramas obtidos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward, baseado no Índice Ponderado, para 38 genótipos de milho-pipoca com ponto de corte determinado com base no proposto por Mojena (1977) e coeficiente de correlação cofenética (CCC).

Observou-se que os agrupamentos obtidos pelo método hierárquico UPGMA, realizado a partir das matrizes de dissimilaridade genéticas utilizando-se o índice ponderado e, também, o índice não ponderado, separaram apenas quatro genótipos de um grande grupo composto por 34 genótipos (Figura 6 e 7). Notou-se que o coeficiente de correlação cofenética obtido para estes dois agrupamentos foi relativamente baixo, com valores de 36,89 % para o índice ponderado e 37,77 % para o índice não ponderado, revelando a não consistência de tais agrupamentos para o conjunto de genótipos analisados.

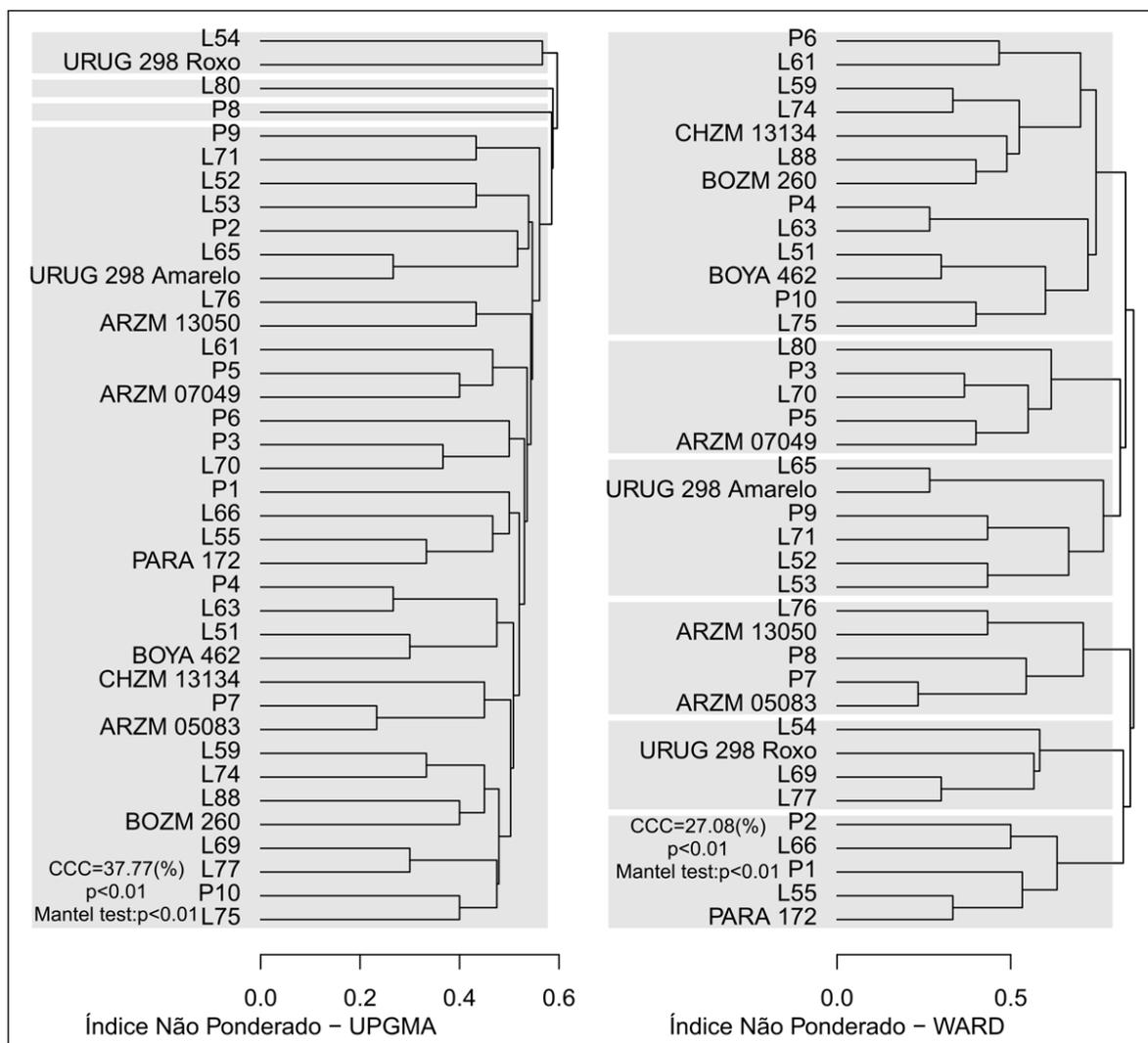


Figura 7 – Dendrogramas obtidos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward, baseados no Índice Não Ponderado, para 38 genótipos de milho-pipoca com ponto de corte determinado com base no proposto por Mojena (1977) e coeficiente de correlação cofenética (CCC).

Analisando os resultados obtidos pelo agrupamento de Ward, utilizando as matrizes de distâncias via índice ponderado e não ponderado, observou-se que houve maior distribuição dos genótipos, com a obtenção de sete grupos para o índice ponderado, e seis para o não ponderado (Figuras 6 e 7). Os baixos valores dos coeficientes de correlação cofenética apresentados por tais métodos de agrupamentos (25, 63 e 27,08 %), demonstram uma limitada consistência destas distâncias para serem utilizadas na aglomeração dos genótipos, inviabilizando a utilização desses algoritmos para a fidedigna constituição de grupos heteróticos.

Os resultados obtidos pelos métodos hierárquicos de agrupamentos baseados nos marcadores moleculares, considerando a medida de

dissimilaridade proposta por Smouse e Peakall (1999) revelaram maior consistência em comparação ao que ocorreu quando se utilizaram os índices ponderado e não ponderado, proporcionando valores de coeficiente de correlação cofenética satisfatórios, com percentuais de 68,33 e 59,17 %, para UPGMA e Ward, respectivamente (Figura 8).

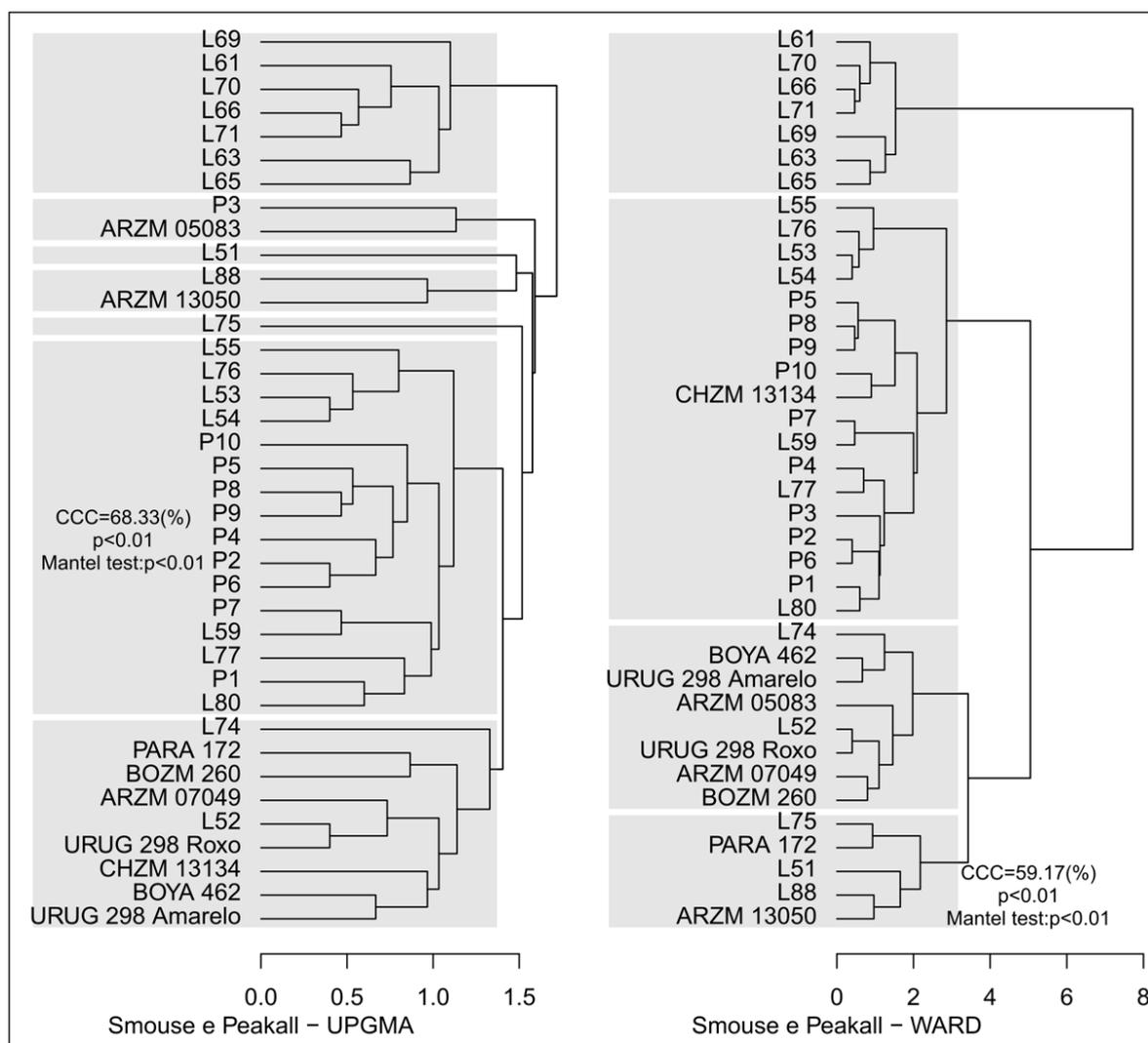


Figura 8 – Dendrogramas obtidos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward, baseados no Índice de Smouse e Peakall, para 38 genótipos de milho-pipoca com ponto de corte determinado com base no proposto por Mojena (1977) e coeficiente de correlação cofenética (CCC).

Com base no agrupamento utilizando a medida de distância de Smouse e Peakall (1999), notou-se que houve a formação de sete grupos pelo método UPGMA e quatro, pelo método de Ward (Figura 8). Em ambos os métodos de agrupamentos, foi observada a constituição de um grupo composto por sete

linhagens, confirmando a similaridade genética entre essas, bem como, destacando a dissimilaridade genética destas para com os demais germoplasmas analisados. Destaca-se que estas linhagens foram as mesmas formadoras do grupo II pelas análises com inferências bayesianas apresentadas na Figura 5.

A caracterização de grupos formados por germoplasmas que apresentam a característica de coloração branca de endosperma foi apresentada por Amaral Júnior et al. (2011), analisando a variabilidade genética de milho-pipoca em comparação com diferentes tipos de milho, utilizando marcadores ISSR. Os autores identificaram a formação de um grupo exclusivamente composto por genótipos de milho-pipoca com coloração de endosperma branco. Isso pode colaborar em uma possível identificação de grupos heteróticos de milho-pipoca baseada na coloração dos grãos.

As técnicas de agrupamentos empregadas, utilizando as medidas de dissimilaridade propostas por Smouse e Peakall (1999), revelaram forte similaridade entre as populações de milho-pipoca, uma vez que estas foram, em geral, relacionadas em grupos distintos das linhagens descendentes de germoplasma nacional (Figura 8). Isso pode influenciar no futuro desenvolvimento de genótipos superiores pelo cruzamento direcionado entre genitores derivados destes grupos divergentes, contornando a dificuldade exposta por Miranda et al. (2008), para os quais, as populações de milho-pipoca nacionais apresentaram heterose e variabilidade genética limitadas para capacidade de expansão.

5.4. Identificação dos grupos heteróticos fundamentada em variáveis morfoagronômicas e moleculares

As características morfoagronômicas e moleculares foram analisadas simultaneamente, para aplicação dos métodos de agrupamentos hierárquicos UPGMA e Ward, utilizando para tanto, a matriz de distância genética fornecida pelo algoritmo de Gower (Figura 9).

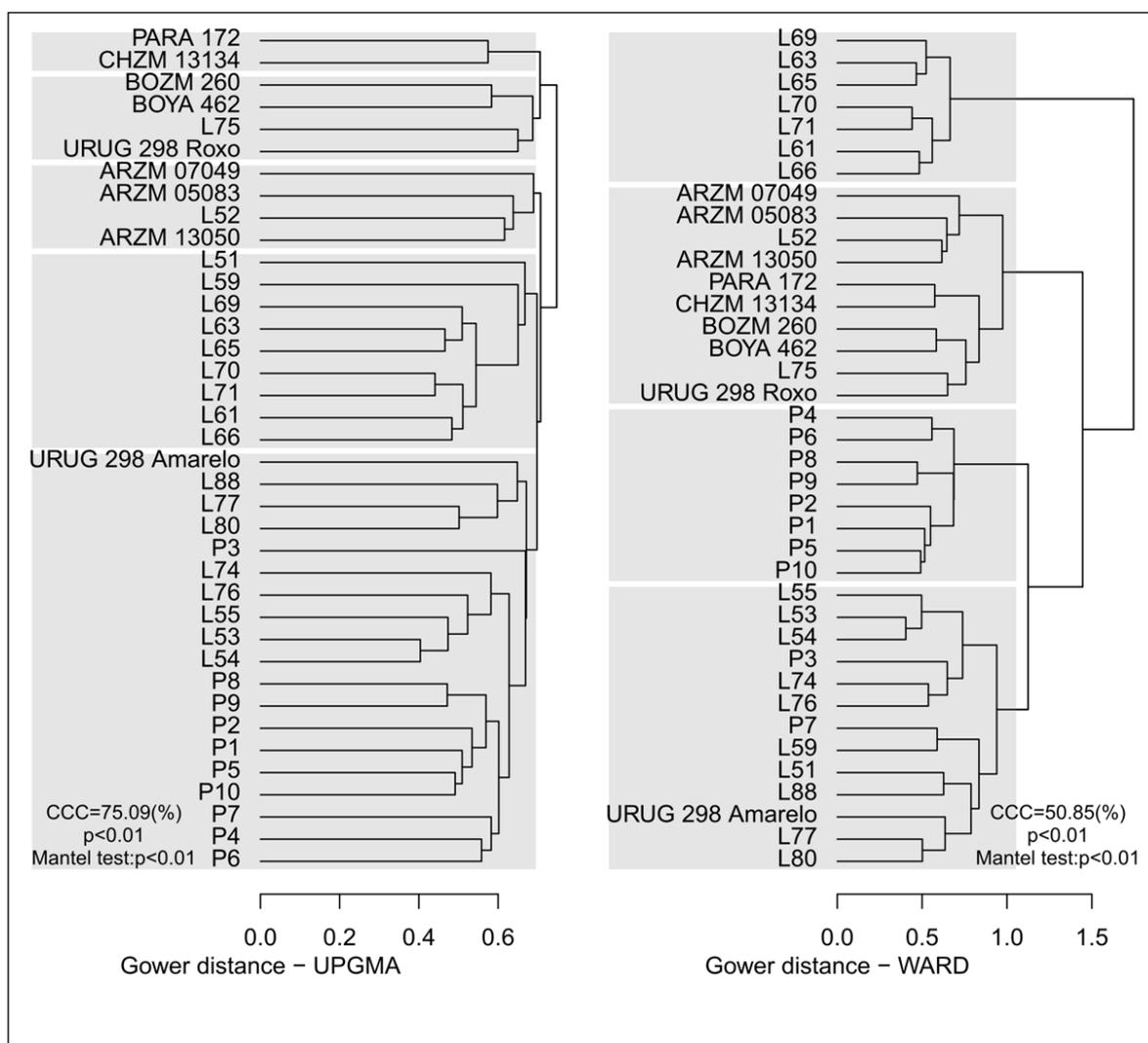


Figura 9 – Dendrogramas obtidos pelos métodos hierárquicos UPGMA e Ward, fundamentados nas distâncias genéticas do algoritmo de Gower, para 38 genótipos de milho-pipoca com ponto de corte determinado com base no proposto por Mojena (1977) e coeficiente de correlação cofenética (CCC).

Observou-se que com a utilização da matriz híbrida, com variáveis quantitativas e qualitativas, originou a separação dos 38 genótipos em cinco grupos para o método UPGMA e quatro grupos para o método de Ward (Figura 9). Notou-se uma grande semelhança com os agrupamentos analisados baseado nas medidas de dissimilaridade proposta por Smouse e Peakall (Figura 8), merecendo destaque a formação de um grupo composto pelas linhagens de milho-pipoca – L61, L63, L65, L66, L69, L70 e L71 - derivadas da variedade BRS-Angela (Pacheco, 2004), revelando a forte proximidade genética entre essas linhagens que apresentam como característica morfológica de maior destaque, a coloração branca dos grãos.

As populações de polinização aberta de milho-pipoca analisadas foram relacionadas em três grupos que apresentaram similaridade entre si, para o método UPGMA (Figura 9). No método proposto por Ward, as populações foram todas agrupadas em um único grupo, confirmando, assim, a similaridade entre elas. A exceção em ambos os agrupamentos foi o germoplasma URUG 298 Amarelo, o qual foi alocado em grupos juntamente com linhagens nacionais.

A distribuição dessas populações em grupos semelhantes, corroboram os dados apresentados por Silva et al. (2015), analisando a diversidade genética de banco de germoplasma de milho-pipoca, em que a utilização de marcadores microsatélites possibilitou a alocação dessas mesmas populações em um único grupo, exceto para o germoplasma ARZM 05 083.

Duas linhagens nacionais (L52 e L75) apresentaram-se unidas às populações originadas de outros países nos dois agrupamentos, permanecendo isoladas das linhagens nacionais, o que pode influenciar no direcionamento de possíveis cruzamentos direcionados com as linhagens posicionadas em grupos diferentes para composição de híbridos superiores.

Fundamentado nos agrupamentos moleculares provenientes de distância de Smouse e Peakall e das aglomerações decorrentes das informações morfoagronômicas e moleculares simultaneamente, pode-se presumir a constituição de três grupos heteróticos em milho-pipoca, merecendo destaque a formação do grupo composto pelas linhagens que apresentam como particularidade a coloração do grão, consistindo na principal diferença para com os demais germoplasmas considerados; e para os demais grupos, as características correspondentes a morfologia de grãos e espigas merecem destaque na contribuição para a diferenciação genotípica.

6. CONCLUSÕES

As conclusões possíveis resumem-se assim:

Houve variabilidade genética entre os acessos de milho-pipoca analisados, demonstrando que há possibilidade de exploração dessa variabilidade para desenvolvimento de novas cultivares.

Houve concordância entre as técnicas multivariadas de agrupamento utilizadas, principalmente quando houve utilização de informações genotípicas oriundas dos marcadores microssatélites.

Houve identificação de possíveis grupos heteróticos presentes nos acessos de milho-pipoca estudados, sobretudo no que diz respeito à coloração do grão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Report*, 27: 617–631.
- Akinwale, R.O., Badu-Apraku, B., Fakoredea, M.A.B., Vroh-Bi, I. (2014). Heterotic grouping of tropical early-maturing maize inbred lines based on combining ability in Striga-infested and Striga-free environments and the use of SSR markers for genotyping. *Field Crops Research*, 156: 48–62.
- Almeida, C., Amorim, E.P., Barbosa Neto, J.F., Cardoso Filho, J.A., Sereno, M.J.C.M. (2011). Genetic variability in populations of sweet corn, common corn and teosinte. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 64-69.
- Amaral Júnior, A.T., de Oliveira, É.C., Gonçalves, L.S.A., Scapim, C.A., Candido, L.S., Silva, T.R.C., Vittorazzi, C, Cunha, K.S. (2011). Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(69): 15462-15469.
- Amaral Júnior, A.T., Goncalves, L.S.A., Freitas Júnior, S.P., Candido, L.S., Vittorazzi, C., Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Silva, T.R.C., Pereira, M.G., Scapim,

- C.A., Viana, A.P., Carvalho, G.F. (2013). UENF 14: a new popcorn cultivar. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13: 218-220.
- Badu-Apraku, B., Menkir, A., Fakorede, M.A.B., Lum, A.F., Obeng-Antwi, K. (2006). Multivariate analyses of the genetic diversity of forty-seven *Striga* resistant tropical early maturing maize inbred lines. *Maydica*. 51: 551–559.
- Balestre, M., Von Pinho, R.G., Souza, J.C., Lima, J.L. (2008). Comparison of maize similarity and dissimilarity genetic coefficients based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 7: 695-705.
- 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.
- Barrios, S.C.L. Duarte, F.C., Souza Jr, C.L. (2009). Alocação de linhagens de milho em grupos heteróticos baseando-se em marcadores moleculares e cruzamentos dialélicos. In: *LV Congresso Brasileiro de Genética*. Águas de Lindóia.
- Barroso, L.P., Artes, R. (2003). *Análise multivariada*. Lavras: UFLA, 151p.
- Borém, A., Miranda, G.V. (2005). *Melhoramento de plantas*. Viçosa, MG. Editora UFV, 525p.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Bracco, M., Lia, V.V., Gottlieb, A.M., Hernández, J.C., Poggio, L. (2009). Genetic diversity in maize landraces from indigenous settlements of Northeastern Argentina. *Genetica*, 135(1): 39-49.

- Brunson, A.M. (1937). *Popcorn breeding*. Washington: Yearbook Agricultural, 1: 395-404.
- Cargnelutti Filho, A., Ribeiro, N.D., Burin, C. (2010). Consistência do padrão de agrupamento de cultivares de feijão conforme medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(3): 236-243.
- Carvalho, M.S.N., Mangolin, C.A., Scapim, C.A., Silva, T.A., Machado, M.F.P.S. (2013). Collection of popcorn as a reservoir of genes for the generation of lineages. *Molecular Biotechnology*, 53: 300-307.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2006) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3. ed. Viçosa: UFV, 586p.
- Cruz, C.D., Regazzi, A.J, Carneiro, P.C.S. (2012) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 4. ed. Viçosa: UFV, 514p.
- Cruz, C.D., Ferreira, F.M., Pessoni, L.A. (2011) *Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética*. Visconde do Rio Branco, MG. Suprema, 620p.
- Cruz, C.D. (2016). Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum Agronomy*. 38(4): 547-552.
- 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. (2004) Correlações entre caracteres agrônômicos em dois ciclos de seleção recorrente em milho-pipoca. *Ciência Rural*, 34: 1389-1394.
- Dias, L.A.S. (1998). Análises multidimensionais. In: Alfenas, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Viçosa-MG. Editora UFV. p. 405-475.
- Dias-Salman, A.K., Polaina, F., Malagro, J.R.W. (2009). Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. *Revista eletrônica de veterinária*. 10: 1-16.

- Earl, D.A., Von, H.B.M. (2016). Structure Harvest: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. Disponível em [http://link.springer.com/article/10.1007%2fs12686-011-09548-7].
- Ek, M., Eklund, M., Von Post, R., Dayteg, C., Henriksson, T., Weibull, P., Ceplitis, A., Isaac, P., Tuvešson, S. (2005). Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Hereditas*, 142: 86-91.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8): 2611-2620.
- Fantin, G.M., Sawazaki, E., Barros, B.C. (1991) Avaliação de genótipos de milho-pipoca quanto à resistência a doenças e à qualidade da pipoca. *Summa Phytopathologica*, 17(2): 91-104.
- Franco, J., Crossa, J., Villaseñor, J., Taba, S., Eberhart, S. A. (1998). Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, 38(6): 1688-1696.
- Guimarães, C.T., Moreira, M.A. (1999). Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: UFV, p. 715-740.
- Gower, J.C. (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. 27(4): 857-874.
- Hallauer, A.R. (2001) *Specialty corns*. CRC Press, 496p.
- Hallauer, A; Carena, M.J. (2009) Maize Breeding. In: *Cereals*. ed.: Carena, M.J. Springer. 425p.

- Hallauer, A. R., Carena, M. J., Miranda Filho, J.B. (2010). *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Originally published by Iowa State University Press, 1988 3rd ed. XVI, p.664.
- Hedrich, K., Harris, J., Kann, M. (2001). Mutational analysis in early-onset parkinsonism (EOP) including gene dosage studies. *American Journal of Human Genetics*, 69: 598-598.
- Hoseney, R.C., Zeleznak, K., Abdelrahman, A. (1983). Mechanism of Popcorn popping. *Journal of Cereal Science* 1: 43-52.
- 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.
- Konstantinov, K., Drinic, S.M. (2000). Heterosis in maize molecular markers polymorphism and probability of prediction. In: *Quantitative Genetics and Breeding Methods: The Way Ahead*, Paris, France, August 30-September, 1: 310-312.
- Larish, L.B., Brewbaker, J.L. (1999). Diallel analyses of temperature and tropical popcorn. *Maydica*, Bergamo, 44: 279-284.
- Lee, M. (1995). DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, 55: 265-344.
- Legesse, B.W., Myburg, A.A., Pixley, K.V., Botha, M. (2007). Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. *Hereditas*, 144: 10-17.
- Liu, K., Muse, S.V. (2005). PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21: 2128–2129.
- Mahalanobis, P.C. (1936). On the generalized distance in statistics. *Proceedings of the National Institute of Sciences*. Calcutta, 2: 49-55.

- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27: 209-220.
- Melani, M.D., Carena, M.J. (2005). Alternative maize heterotic patterns for the northern Corn Belt. *Crop Science*, 45: 2186-2194.
- Milligan, G.W. Cooper, M.C. (1985). An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. *Psychometrika*, 50: 159-179.
- Mingoti, A.S. (2007). Análise de dados através de métodos de estatística multivariada. Belo Horizonte, Editora UFMG, 295p.
- 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*, 162(3): 431-440.
- Mohammadi, S.A., Prasana, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
- Mojena, R. (1977). Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The computer journal*, 20(4): 359-363.
- 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.
- 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 de pipoca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 33: 1995-2001.
- Pacheco, C.A.P., Gama, E.E.G., Parentoni, S.N., Santos, M., Guimarães, P.D.O. (2004). Variedade de milho pipoca BRS Angela: novo ciclo de seleção. *Embrapa Milho e Sorgo*. Comunicado técnico.

- Pandit, M., Chakraborty, M., Haider, Z. A., Pande, A., Sah, R. P., & Sourav, K. (2016). Genetic diversity assay of maize (*Zea mays* L.) inbreds based on morphometric traits and SSR markers. *African Journal of Agricultural Research*, 11(24): 2118-2128.
- Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., Motto, M. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 1248-1255.
- Pena, G.F., Amaral Junior, A.T., Ribeiro, R.M., Ramos, H.C.C, Boechat, M.S.B, Santos, J.S., Mafra, G.S., Kamphorst, S.H., de Lima, V.J., Vivas, M., Souza Filho, G.A. (2016). Inference of genetic diversity in popcorn S₃ progenies. *Genetics and Molecular Research*, 15 (2): gmr.15028456.
- Pimentel Gomes, F. (1990). *Curso de estatística experimental*. 12. ed. São Paulo: Nobel, 467p.
- Pinheiro, J.B., Zucchi, M.I., Telles, F.L., Ázara, N.A. (2003). Diversidade genética molecular em acessos de açafrão utilizando marcadores RAPD. *Acta Scientiarum Agronomy*, 25: 195-199.
- Pinto, R.M.C., Souza Júnior, 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.
- Pípolo, C.V., Takahashi, H.W., Endo, R.M., Petek, M.R. (2002). Correlações entre caracteres quantitativos em milho pipoca. *Horticultura Brasileira*, 20: 551-554.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnell, Y.P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.

- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em [<https://www.Rproject.org/>].
- Rajendran, A., Muthiah, A., Joel, J., Shanmugasundaram, P., Raju, D. (2014). Heterotic grouping and patterning of quality protein maize inbreds based on genetic and molecular marker studies. *Turkish Journal of Biology*, 38: 10-20.
- Rangel, R.M., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Freitas Júnior, S.P., Candido, L.S. (2011). Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho-pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. *Revista Ciência Agronômica*, 42: 473-481.
- 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.
- Resh, F.S., Scapim, C.A., Mangolim, C.A., Machado, M.F.P.S, Amaral Junior, A.T. (2015). Genetic diversity of popcorn genotypes using molecular analysis. *Genetic and Molecular Research*, 14 (3): 9829-9840.
- Ribeiro, R.M., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Candido, L.S., Silva, T.R.C., Pena, G.F. (2012). Genetic progress in the UNB-2U population of popcorn under recurrent selection. *Genetics and Molecular Research*, 11:1417-1423.
- Romero-Severson, J. Smith, J.S.C., Ziegler, J., Hauser, J., Joe, L., Hookstra, G. (2001). Pedigree analysis and haplotype sharing within diverse groups of *Zea mays* L. inbreds. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 567–574.
- Salazar, E., Correa, J., Araya, M.J., Méndez, M.A., Carrasco, B. (2016). Phenotypic diversity and relationships among Chilean Choclero maize (*Zea mays* L.) landraces. *Plant Genetic Resources*, 1: 1-13.

- Santacruz-Varela, A., Widrechner, M.P., Ziegler, K.E., Alvador, R.J., Millard, M.J., Bretting, P.K. (2004). Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science*, 44: 456-1467.
- Santos-Schneider, J.F. (2013). Proposta de formação de grupos heteróticos em linhagens de milho-pipoca (*Zea mays* L.) utilizando marcadores microssatélites. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - *Universidade Estadual de Maringá - UEM*, Maringá – PR. 60p.
- SAS Institute. (2003). *Sas procedures guide for computers*. Cary, 965p.
- Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S., Henry, R.J. (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and applied genetics*, 100(5): 723-726.
- Senior, M.L., Heun, M., (1993). Mapping maize microsatellite and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome*. 36: 884–889.
- Sharopova, N., McMullen, M.D., Schultz, L., Schroeder, S., Sanchez-Villeda, H., Gardiner, J., Bergstrom, D., Houchins, K., Melia-Hancock, S., Musket, T., Duru, N., Polacco, M., Edwards, K., Ruff, T., Register, J.C., Brouwer, C., Thompson, R., Velasco, R., Chin, E., Lee, M., Woodman-Clikeman, W., Long M.J., Liscum, E., Cone, K., Davis, G., Coe, E.H. Jr. (2002). Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular Biology*, 48: 463-81.
- 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*, London, 362: 417.
- Silva, T.A., Pinto, R.J.B., Scapim, C.A., Mangoin, C.A., Machado, M.F.P.S., Carvalhos, M.S.N. (2009). Genetic divergence in popcorn genotypes using microssatélites in bulk genomic DNA. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 31-36.

- Silva, T.A., Cantagalli, L.B., Saavedra, J., Lopes, A.D., Mangolin, C.A., da Silva, M.D.F.P., Scapim, C.A. (2015). Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3): 181-187.
- Smouse, P.E., Peakall, R. (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82: 561-573.
- Sneath, P.H., Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco. W.H. Freeman, 573p.
- Ward, J.H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *The Journal of American Statistical Association*, 58: 236-244.
- Willier, J.G., Brunson, A.M. (1927) Factors affecting the popping quality of popcorn. *Journal of Agricultural Research*, 35(7), 615-624.
- Xu, Y., Crouch, H.J. (2008). Marker-Assisted Selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science*. 48: 391-407.
- Zhang, M., Mao, W., Zhang, G., Wu, F. (2014). Development and characterization of polymorphic EST-SSR and genomic SSR markers for Tibetan annual wild barley. *PloS one*, 9(4): e94881.
- Zuo-mei, L., Bao-qin, X. (2010). On significance of heterotic group theory in hybrid rice breeding. *Journal of Rice Science*, 24(1): 1-4.