



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SILVIA GRACIELE HÜLSE DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA
POR MARCADORES RAPD E PERFORMANCE DE
HÍBRIDOS *TOPCROSSES* DE MILHO PIPOCA**

Londrina
2007

SILVIA GRACIELE HÜLSE DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA
POR MARCADORES RAPD E PERFORMANCE DE
HÍBRIDOS *TOPCROSSES* DE MILHO PIPOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador(a): Profa. Dra. Valéria Carpentieri-Pípolo

Londrina
2007

SILVIA GRACIELE HÜLSE DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA
POR MARCADORES RAPD E PERFORMANCE DE
HÍBRIDOS *TOPCROSSES* DE MILHO PIPOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior – IAPAR

Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas – UEL

Prof. Dr. Adilson Luiz Seifert (suplente) – UEL

Profa. Dr. Claudemir Zucareli (suplente) – UEL

Profa. Dra Valéria Carpentieri- Pípolo
Orientadora – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2007.

*À minha família,
em especial aos meus pais Rubens e Terezinha,
pelo amor, carinho e por sempre estarem ao meu lado
me apoiando e incentivando a seguir em busca dos meus ideais.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus,
pela vida, por servir de apoio e consolo nos momentos de dificuldade,
por me proporcionar conhecer pessoas empenhadas em contribuir para a Ciência,
e pelas amizades verdadeiras construídas durante o período de convivência nesta instituição.

À minha orientadora, Prof. Dra. Valéria Carpentieri-Pípolo, pela orientação e disponibilidade, pelos ensinamentos e paciência, amizade e apoio durante todo o curso e principalmente pela confiança em mim depositada.

À Prof. Dra. Claudete de Fátima Ruas e ao Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas, pela dedicação e orientação, pela paciência, amizade e ensinamentos transmitidos e principalmente por terem me dado acesso à vida científica.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia que tanto contribuíram para a minha formação acadêmica e que contribuem para a qualidade do programa.

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

Ao Dr. Nelson da Silva Fonseca Júnior, Prof^a Dra Claudete de Fátima Ruas, Prof Dr. Adilson Luiz Seifert e Prof Dr. Claudemir Zucareli por tão prontamente aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho e pelas valiosas sugestões que contribuíram para a melhoria do trabalho.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular da UEL e dos laboratórios de nematologia e melhoramento vegetal da Embrapa Soja, pela amizade e pelos ótimos momentos vivenciados juntos no decorrer do trabalho.

Aos amigos e colegas de curso de Pós-Graduação em Agronomia e da Genética e Biologia Molecular pela amizade, companheirismo e pelo muito que pude aprender do contato com seus projetos e experiências profissionais, tão diversas da minha.

Ao amigo de todas as horas Deoclécio Domingos Garbúglio pelo apoio, amizade, incentivo e auxílio nas análises estatísticas.

A(o)s amiga(o)s Vanesca, Mariana, Adriana, Daliana, Marina, Anderson, Rachel, Alessandro e Wilian pela união, apoio e carinho nos momentos difíceis e principalmente pelas alegrias compartilhadas no decorrer do curso e pela amizade verdadeira que levarei para o resto da vida.

Ao Carneiro, por todo amor, carinho e companheirismo, pelo apoio incondicional, pela torcida, por me ouvir em horas de tristeza e me ajudar a buscar as melhores saídas.

Em especial a vocês meus pais, sem os quais o mestrado não teria nenhum valor para mim se eu não pudesse ver a satisfação com essa conquista. Se eu não tivesse recebido os importantes valores morais que me deram, certamente não teria concluído esse trabalho.

E, por fim a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”.

(Eleanor Roosevelt)

SOUZA, S.G.H. **Associação entre a Diversidade Genética Obtida por Marcadores RAPD e Performance de Híbridos *Topcrosses* de Milho Pipoca.** 2007. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo utilizar marcadores moleculares de DNA (RAPD) para analisar a diversidade entre 14 populações de milho pipoca e um testador de base genética ampla e estimar a correlação entre as distâncias genéticas e o desempenho dos híbridos *topcrosses*. Vinte e quatro *primers* aleatórios resultaram na amplificação de 218 fragmentos, dos quais 162 (74,3%) foram polimórficos. A partir dos marcadores RAPD foi gerada uma matriz de distância genética por meio do coeficiente de Jaccard. Para a avaliação das populações e dos híbridos resultantes dos *topcrosses* foi utilizado o modelo reduzido de Gardner. Um dendrograma foi construído e as associações genéticas obtidas apresentaram 3 grupos. Os marcadores RAPD mostraram ser uma ferramenta útil em determinar a extensão da diversidade genética entre as populações de milho pipoca e alocar os genótipos em grupos heteróticos distintos. Entretanto, não houve correlação significativa entre o desempenho médio dos híbridos *topcrosses* e as respectivas distâncias genéticas. Os resultados permitiram inferir que as divergências genéticas, baseados em marcadores de RAPD não foram eficientes no direcionamento de cruzamentos promissores envolvendo populações de milho pipoca e prever precisamente o desempenho dos híbridos F1.

Palavras-chave: *Zea mays* L.. Grupos heteróticos. Marcadores moleculares. Testadores. Produtividade.

SOUZA, S.G.H. **Association Between Genetic Diversity Obtained by RAPD Markers and Performance of Hybrids Topcrosses of Popcorn.** 2007. 58p. Dissertation (Master Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The present work had for objective to use the molecular markers of DNA (RAPD) to evaluate the diversity of 14 popcorn populations and a tester of ample genetic base and to determine the correlation between genetics distances and testcross hybrid performance. Twenty-four different random primers were used, which resulted in the amplification of 218 fragments, 162 (74.3%) of them being polymorphic. A genetic distance matrix was created from the RAPD data, using Jaccard coefficient. The populations and the hybrid analyses were carried out using Gardner's reduced model. Dendrogram was constructed and the genetic associations showed three groups. The RAPD analysis was a useful tool in determining the extent of genetic diversity among popcorn populations and allocating genotypes into distinct heterotic groups. However, there was no significant correlation between the average performance hybrid testcrosses and the respective genetic divergence. The present results allowed to infer that the genetic distances based on RAPD data had not been efficient in the aiming of promising crossings involving popcorn populations and cannot be used to precisely predict the F1 hybrids yield performance.

Keywords: *Zea mays L.* Heterotic group. Molecular markers. Testcrosses. Yield.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 MILHO PIPOCA	12
2.2 UTILIZAÇÃO DE CRUZAMENTOS <i>TOPCROSSES</i> NO MELHORAMENTO DE PLANTAS	14
2.3 DISTÂNCIA GENÉTICA, EFEITO DE DOMINÂNCIA E HETEROSE	15
2.4 MARCADORES MOLECULARES	17
2.4.1 Estimativa da distância genética utilizando marcadores moleculares	20
3 REFERÊNCIAS	23
4 ARTIGO – ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD E PERFORMANCE DE HÍBRIDOS TOPCROSSES DE MILHO PIPOCA	30
4.1 RESUMO	30
4.2 ABSTRACT	30
4.3 INTRODUÇÃO	31
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.6 AGRADECIMENTOS	44
4.7 Referencias	44
5 CONCLUSÕES GERAIS	58

1 INTRODUÇÃO

O milho pipoca é considerado o mais primitivo dos milhos que se tem conhecimento (MANGELSDORF, 1974). É um importante produto agrícola explorado comercialmente em todo mundo, cuja produção tem aumentado com o passar das décadas (ZEIGLER, 2001). No entanto, no Brasil, seu plantio comercial é bastante modesto. Segundo Galvão et al. (2000) foram importadas em 1998 aproximadamente 61 mil toneladas de milho pipoca, e a produção nacional foi cerca de 20 mil toneladas de grãos, onde 75% deste mercado correspondia a pipoca americana, importado principalmente da Argentina. Isso pode ser atribuído à baixa qualidade da pipoca disponível no mercado brasileiro e tecnologia de produção inadequada (SAWAZAKI, 1996; SAWAZAKI, 2001). Portanto num programa de melhoramento de milho pipoca deve-se reunir num mesmo cultivar características que agradem produtores e consumidores, ou seja, obter materiais com boas características agronômicas e culinárias.

A seleção de genitores e a utilização de métodos que identifiquem as melhores combinações são etapas de grande importância num programa de melhoramento genético (DUARTE et al., 2003). Nesse contexto, dentre as técnicas genético-estatísticas mais utilizadas destacam-se os cruzamentos dialélicos e os *topcrosses* (CRUZ; REGAZZI, 1994; CHAVES; MIRANDA FILHO, 1997). Os esquemas *topcrosses* têm sido empregados, principalmente, pela facilidade de condução e obtenção dos parâmetros de capacidade de combinação. Neste esquema, a capacidade de combinação é determinada pelos cruzamentos entre os materiais base do estudo, com um ou mais testadores, previamente selecionados, levando-se em consideração o número de genótipos a serem avaliados (CHAVES; MIRANDA FILHO, 1997).

A heterose, manifestada pelos híbridos, pode também ser explorada em programas de melhoramento da cultura do milho pipoca. Segundo Ferreira et al (1995) as melhores combinações híbridas estão diretamente relacionadas com o grau de divergência genética dos parentais envolvidos, sendo que, maiores são as chances de se encontrar combinações promissoras, quando se utilizam materiais mais divergentes.

Desta forma, medidas indiretas da diversidade genética entre

linhagens e populações são importantes para a identificação, reconhecimento e exploração dos padrões heteróticos existentes no germoplasma disponível. Neste sentido, os marcadores moleculares com base em DNA, têm sido empregados por apresentarem algumas vantagens sobre outros métodos, ou seja, além de identificarem grande polimorfismo, não apresentam interação com o meio ambiente, podendo ser avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento (WILLIAMS et al., 1990; DUDLEY, 1993).

Dentre os marcadores moleculares utilizados atualmente, o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) vem sendo bastante empregado por explorar o elevado polimorfismo revelado entre os indivíduos a partir de um número grande de regiões no genoma (WILLIAMS et al., 1990). Em milho esta técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de diversidade, pois quando comparados com outros tipos de marcadores, aliado ao baixo custo permitiram detectar polimorfismo de modo simples e rápido. (LANZA et al., 1997; LIU et al., 1998; MUNHOZ, 2001; CARVALHO et al., 2004; RINALDI, 2005; BRUEL et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi estimar a heterose para características agronômicas, acessar a diversidade genética através de marcadores de RAPD dentro das populações de milho pipoca e avaliar as associações entre as distâncias genéticas baseadas no RAPD e a média das performances dos híbridos topcrosses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MILHO PIPOCA

O milho pipoca pertence à espécie botânica *Zea mays L.*, porém este apresenta características únicas que o difere dos demais tipos de milho. O milho pipoca apresenta as sementes duras e pequenas que sob ação do calor “estouram”, conferindo-lhe a característica do “pipocamento” (ZINSLY; MACHADO, 1987). A capacidade de estourar ocorre devido à resistência do pericarpo e à presença de óleo e umidade no grão que se transformam em vapor quando expostos ao calor, pressionando o pericarpo até que este se rompa, liberando assim o endosperma (SILVA et al., 1993).

É considerado o mais primitivo milho que se tem conhecimento (MANGELSDORF, 1974) sendo sua descoberta datada de 2500 a.c. No entanto, a origem do milho pipoca confunde-se com a dos outros tipos de milho. Segundo Galinat (1977), existem três hipóteses aceitáveis quanto a sua origem. A primeira seria que o teosinte atual é o ancestral selvagem do milho; a segunda seria que o teosinte primitivo teria originado tanto o teosinte quanto o milho atual e uma terceira hipótese que o ancestral do milho seria uma forma extinta de milho tunicado, do qual uma forma mutante teria originado também o teosinte. Evidências arqueológicas sugerem que a evolução teria acontecido no sentido milho pipoca para os demais tipos de milho, tendo em vista que exemplares do primeiro estão entre os milhos mais antigos encontrados (ZINSLY; MACHADO, 1987).

As cultivares de milho pipoca caracterizam-se por apresentar uma planta mais delicada que o milho comum. De acordo com Zinsly e Machado (1987), as plantas de milho pipoca apresentam colmo mais fino, número de folhas menor e originam mais espigas por planta, o que conseqüentemente torna os cultivares de milho pipoca mais suscetíveis às doenças, ao acamamento e ao quebraimento do colmo quando comparadas com o milho comum (GAMA et al., 1990).

O milho pipoca apresenta como característica principal a capacidade de expansão que está correlacionado negativamente com o rendimento de grãos. (ALEXANDRE; CREECH, 1977). Porém as relações não são grandes o bastante

para impedir que se obtenham ganhos positivos quando é feita a seleção simultânea para estes dois caracteres (DOFING et al., 1991; COIMBRA et al., 2001; PÍPOLO et al., 2002).

Segundo Galvão et al. (2000) o valor comercial obtido por um milho pipoca depende diretamente de sua capacidade de expansão (CE). A CE pode ser avaliada como sendo a relação entre o volume de pipoca expandida e o volume de grãos ($v.v^{-1}$) ou o peso de grãos ($mL.g^{-1}$). Em comparações iniciais entre as cultivares brasileiras e as norte-americanas de milho pipoca, observou-se que a qualidade da pipoca brasileira é muito inferior à norte-americana. No primeiro Ensaio Nacional de milho pipoca, conduzido no ano agrícola de 1991/92, a CE média do milho brasileiro foi de $17,5 mL.mL^{-1}$. Enquanto que na década de 40, a CE dos híbridos e dos cultivares comerciais nos Estados Unidos já variava de 23,2 a $32,7 mL.g^{-1}$. uma boa variedade de milho pipoca deve apresentar uma CE acima de $21 mL.mL^{-1}$ enquanto valores acima de $26 mL.mL^{-1}$ indicam uma excelente pipoca.

Uma série de fatores pode influenciar a capacidade de expansão, dos quais se destaca a temperatura que os grãos são expostos durante o pipocamento e a umidade dos grãos. A temperatura influencia diretamente no número de grãos que estouram. Weathermax (1922) obteve as maiores expansões quando o calor aplicado sobre os grãos foi de $175^{\circ}C$, variando até $200^{\circ}C$ em 2,5 a 3 minutos. Quando os grãos são submetidos a temperaturas menores que $176,5^{\circ}C$ há um grande decréscimo no número de grãos que estouram (HOSENEY et al., 1983).

Trabalhos relatados na literatura mostraram qual seria o teor de umidade ideal para que haja uma elevação dos valores da CE. Segundo Willier e Brunson (1927) o teor de umidade ideal seria de 12%. Hosenev et al. (1983) encontraram teores de umidade em torno de 12,5 a 13,5%, sendo que teores de umidade em torno de 9,2 e 9,9 % a porcentagem de expansão foi bastante baixa, o que pode ser associado ao fato que não exista umidade suficiente para a formação de vapor e, conseqüentemente a explosão. Para Dalbello e Biaggi (1996) a máxima CE é obtida com teores de umidade de grãos entre 10% a 11%, onde a capacidade de expansão diminui tanto com o aumento quanto com a redução da umidade.

2.2 UTILIZAÇÃO DE CRUZAMENTOS *TOPCROSSES* NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

A introdução do uso de *topcrosses*, que são cruzamentos de linhagens com variedades de polinização livre, foi adotada como uma prática usual e eficiente para avaliar a capacidade geral de combinação das linhagens (DAVIS, 1927). Atualmente, o termo *topcrosses* compreende situações mais amplas referindo-se a todo procedimento que envolva um teste de progênie, visando avaliar diretamente a capacidade de combinação de um conjunto de materiais em cruzamentos com um testador comum (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1995).

Lindstrom (1931) recomendou o uso do *topcross* ao verificar que algumas linhagens destacavam-se pelo seu comportamento em combinação. Jenkins e Brunson (1932), estudando variedades de polinização aberta utilizadas como testadores, encontraram altas correlações entre a produção das linhagens e dos *topcrosses*.

Segundo Hallauer e Miranda Filho (1995), a utilização de *topcrosses* no melhoramento tem como objetivos: 1) a avaliação da capacidade de combinação de linhagens endogâmicas num programa de melhoramento de híbridos; e 2) a avaliação do valor genético dos genótipos da população a ser melhorada.

A capacidade geral de combinação (CGC) foi definida por Sprague e Tatum (1942) como o comportamento de uma linhagem quando cruzada com várias outras, ou seja, o comportamento médio dessa linhagem numa série de híbridos. Os mesmos autores associaram a CGC com a ação aditiva dos genes, enquanto a capacidade específica de combinação (CEC) refere-se ao comportamento de uma linhagem que, quando cruzada com outra dá origem a um híbrido simples. A CEC foi associada aos efeitos de dominância, epistasia ou interação genótipo x ambiente.

Chaves e Miranda Filho (1997) sugeriram o uso de *topcrosses* em lugar de dialélicos para a análise de variância e estimação de parâmetros do modelo reduzido, e propuseram uma metodologia para a predição de médias de compostos.

A utilização dos métodos de predição de médias para a síntese de compostos de variedades tem sido reconhecida como de grande importância nos programas de melhoramento. No caso do milho pipoca, as características consideradas pelos melhoristas para a obtenção dos melhores híbridos envolvem altos valores de produtividade e CE, a fim de satisfazer produtores e consumidores.

Compostos têm sido definidos como uma população obtida pelo inter cruzamento e recombinação de duas ou mais variedades de polinização aberta.

A síntese de compostos de variedades para serem utilizados como população base em programas de seleção recorrente tem sido considerada como um procedimento importante para os programas de melhoramento do milho, devido à elevada variabilidade que é esperada nos compostos. Miranda Filho (1974) forneceu revisão da aplicabilidade do procedimento da predição e Hallauer e Miranda Filho (1995) atualizaram muitos aspectos no uso da predição de médias no melhoramento de milho.

Seifert et al. (2006) avaliaram a capacidade combinatória de populações de milho pipoca em topcrosses e concluíram que o método de cruzamentos topcrosses intra-populacional é eficiente na escolha de populações para formar compostos. Embora o testador tenha se constituído de uma mistura de sementes das populações este possibilitou a identificação de genótipos superiores.

2.3 DISTÂNCIA GENÉTICA, EFEITO DE DOMINÂNCIA E HETEROSE

A avaliação da diversidade genética é muito utilizada pelos melhoristas de milho como um método alternativo para a seleção de germoplasma, além de possibilitar o arranjo de linhagens em grupos que quando inter cruzados darão os melhores resultados (SOUZA, 2001). Este método visa selecionar aqueles materiais mais promissores e diminuir os gastos e o tempo necessário para a realização de várias combinações híbridas, que seriam desnecessárias. Os esforços, portanto, são concentrados nas combinações mais promissoras, ou seja, naquelas entre materiais mais divergentes.

Sendo assim, num programa de melhoramento o conhecimento da distância genética entre genótipos é muito útil por permitir uma melhora na eficiência da amostragem e utilização de germoplasmas. Os melhoristas podem usar estas informações para tomar decisões como a escolha de genótipos para o desenvolvimento de populações ou para facilitar a identificação de diversos genitores para a obtenção de combinações híbridas, a fim de maximizar a expressão da heterose (MIRANDA et al., 2003).

A diversidade genética entre um grupo de genitores tem sido avaliada com o objetivo de identificar combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose, de modo que, nas suas gerações segregantes, seja possível a recuperação de genótipos superiores (CRUZ; REGAZZI, 1994).

Apesar da divergência genética ser uma condição necessária para que haja heterose, ela não é suficiente para que a heterose se manifeste, pois esta depende da magnitude das diferenças de frequências alélicas e da dominância para todos os locos envolvidos (CRESS, 1966; GUO et al., 2006).

A heterose pode ser definida como sendo o vigor manifestado em cruzamentos entre indivíduos geneticamente divergentes, aumentando o valor dos caracteres quantitativos nos híbridos em relação aos pais (SURESH; KHANNA, 1975).

De acordo com Paterniani (1974) existem duas teorias para explicar a heterose: a primeira, proposta por Davenport (1908), Bruce (1910) e Keeble e Pellew (1910), explica a heterose pelo acúmulo, no híbrido, de genes dominantes provenientes de ambos os pais. A teoria da sobredominância foi proposta concomitantemente por Shull (1908) e East (1908) e explica a heterose pela própria condição heterozigótica dos locos que controlam o caráter; assim, em cada loco, a condição heterozigótica seria superior a qualquer dos homozigotos.

Em milho, há fortes evidências que a heterose nesta espécie é resultante do acúmulo de locos com alelos expressando dominância parcial/completa (HALLAUER et al., 1998). Smith e Smith (1989) relataram, para milho, que a heterose seria uma função de heterozigosidade em um número de locos.

O termo grupo heterótico é comumente usado pelos melhoristas de milho, porém não se encontra nenhuma definição clara e objetiva do significado da expressão na literatura. Esse termo foi estabelecido empiricamente através da relação da heterose observada nos cruzamentos envolvendo diferentes cultivares de polinização aberta (HALLAUER et al., 1988). Sua importância para o melhorista reside no fato de que os cruzamentos entre grupos heteróticos distintos resultam em uma alta heterose.

A predição da medida da distância genética, antes que qualquer cruzamento seja realizado, poderá auxiliar os melhoristas a concentrar seus esforços apenas nas combinações mais heteróticas, pois a heterose manifestada nos

cruzamentos pode estar diretamente relacionada à distância genética. De acordo com Melo (2000), quanto maior a divergência genética entre os materiais cruzados, maior será a heterose e, conseqüentemente, maior a produtividade.

A avaliação da distancia genética pode ser obtida por meio de diferenças fisiológicas, morfológicas, agronômicas e moleculares existentes entre genótipos, além de ser possível também de se avaliar por meio da heterose ou da capacidade específica de combinação, manifestada numa série de cruzamentos entre as variedades e/ou híbridos.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares têm sido sugeridos como ferramenta útil em vários aspectos do melhoramento de plantas, como a descrição de variedades, a construção de mapas genéticos, a medição das distâncias genéticas entre as linhagens e o próprio processo de seleção (RUMIN; VENCOVSKI, 2001).

A estimativa da diversidade genética, obtida pela análise das informações fornecidas pelos marcadores moleculares, tem aparecido com frequência nos trabalhos mais recentes. A diversidade genética pode ser estimada pelo uso de vários tipos de marcadores moleculares e analisadas por um grande número de metodologias. Além de fornecerem informações seguras e precisas, os marcadores podem agilizar pesquisas por possibilitarem a avaliação de um grande número de amostras de uma só vez.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo derivado de um gene expresso, como no caso de proteínas e caracteres morfológicos, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não e cujo comportamento está de acordo com as leis básicas de herança. Quatro tipos de marcadores genéticos têm sido utilizados em plantas: morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares (BORÉM, 1998).

De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998), até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, como nanismo,

deficiência de clorofila, cor de pétala, etc. Mais recentemente, os marcadores bioquímicos, principalmente as isoenzimas e proteínas de reserva, têm sido utilizados na caracterização de germoplasma e, de forma mais limitada, na seleção indireta. Porém, estes marcadores, assim como os marcadores morfológicos e citológicos, também existem em número limitado e com baixo nível de polimorfismo (BORÉM, 1998).

Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular e por meio de diversos métodos de detecção de polimorfismo genético obtidos diretamente do DNA. A partir disso, o número de marcadores disponíveis passou a ser ilimitado, podendo ser obtido em qualquer organismo vivo e a sua utilização é ampliada para a grande maioria das espécies até então pouco estudadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com Lanza et al (2000), a aplicação das técnicas que fazem uso dos marcadores moleculares de DNA, para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem como consequência grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas.

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR– *Polymerase Chain Reaction*) concebida por Mullis em meados da década de 80 (MULLIS; FALOONA, 1987), causou uma grande revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento dos processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos de doenças e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (SOUZA, 2000).

Lanza et al. (2000) afirmam que a técnica da PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA, delimitado por um par de *primers* de seqüências específicas de nucleotídeos de fita simples. Segundo esses autores, *primers* são seqüências curtas de DNA, que pareiam com o DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA.

Em 1990, ocorreu um grande avanço no uso de marcadores moleculares que tem como base a PCR para a caracterização biológica. Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990) introduziram independentemente a técnica do polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) cuja idéia era utilizar iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária de nucleotídeos para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim, a necessidade do conhecimento prévio da seqüência alvo. Segundo Ferreira e

Grattapaglia (1998), a técnica RAPD é basicamente uma variação da PCR com duas características distintas: 1) utilização de um único *primer* ao invés de um par; 2) o *primer* único tem seqüência arbitrária, portanto sua seqüência alvo é desconhecida. Para que haja amplificação de um fragmento de RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (<4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a fixação exponencial de um segmento de DNA pela polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de agarose submetido a eletroforese.

Segundo Santos et al. (1994), além das vantagens já descritas, os marcadores RAPD apresentam ainda vantagens adicionais por serem tecnicamente mais acessíveis e possuírem um custo mais baixo. Outra característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato de se comportarem como marcadores genéticos dominantes, embora a dominância neste caso não se refira ao conceito clássico de interação entre alelos de um mesmo loco e sim puramente do ponto de vista da interpretação relativa entre genótipo e fenótipo de um indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Em trabalhos com milho, citados por Souza (2001) a técnica RAPD tem sido utilizada para a identificação das linhagens genitoras de híbridos, estudos de diversidade e distância genética e identificação de polimorfismo e de alelos de resistência a pragas.

Outra classe de marcador bastante utilizada é o marcador de microsatélite. Experimentos realizados no início dos anos 80 demonstraram a existência de seqüências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*), em grande quantidade no genoma de eucariotos (TAUTZ; RENZ, 1984). Estas seqüências tornaram-se mais conhecidas como microsatélites (LITT; LUTY, 1989). A presença de microsatélites em plantas foi descrita pela primeira vez por Condit e Hubell (1991), sendo que o elemento repetido mais comumente encontrado entre as espécies vegetais é o di-nucleotídeo AT (MORGANTE; OLIVIERI, 1993).

Microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) correspondem a seqüências com poucos nucleotídeos, geralmente de 2 a 3 bases repetidas em tandem (SMITH et al., 1997). Estes podem ser detectados a partir de regiões do DNA contendo seqüências simples repetidas as quais são amplificadas via PCR,

utilizando-se um par de “primers” específicos de comprimento entre 20 e 30 pares de bases, complementares a seqüências únicas que flanqueiam as seqüências simples repetidas.

Geralmente os segmentos amplificados a partir destas regiões apresentam grande polimorfismo resultante da presença de diferentes números de seqüências simples repetidas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Cada região de microsatélite, independente da repetição, constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente no mesmo loco devido a alta taxa de mutação que ocorre nestas regiões (JARNE; LAGODA, 1996).

Este marcador tem sido amplamente utilizado por ter caráter co-dominante e apresentar-se multialélico, possuindo o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, é possível avaliar regiões do genoma distribuído em todos os cromossomos, fornecendo subsídios úteis ao melhorista na seleção básica de populações a serem utilizadas em programas de melhoramento gerando informações de agrupamento de genótipos e planejamento de cruzamentos (MORAES et al., 2003).

Rafalski (2002) destacou que os microsatélites têm sido muito utilizados como marcadores por apresentarem alto grau de informatividade, enquanto que o RAPD tem sido utilizado devido à simplicidade da técnica. Porém a escolha da melhor técnica a ser utilizada, depende dos objetivos a serem atingidos, bem como da característica do material a ser analisado.

2.4.1 Estimativa da distância genética utilizando marcadores moleculares

A estimativa da distância genética obtida pela análise das informações fornecidas pelos marcadores moleculares é bastante freqüente na literatura atual. Ela tem sido obtida por diferentes tipos de marcadores moleculares e analisadas por grande quantidade de metodologias.

Segundo Lanza et al. (2000) os genótipos são avaliados por meio dos marcadores e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas, e as não comuns, com diferenças genéticas. Os resultados

são codificados de forma que gerem uma matriz de similaridade (ou dissimilaridade), que pode ser graficamente interpretada por meio de algumas técnicas multivariadas, como os métodos de agrupamento.

Kantety et al. (1995) trabalhando com 19 linhagens elite de milho pipoca e 8 linhagens de milho dentado verificaram que através de marcadores ISSR foi possível agrupar esse material de acordo com os dados de *pedigree*. Os marcadores de ISSR foram efetivos em separar os genótipos em grupos heteróticos podendo ser utilizado com grande eficiência nos programas de melhoramento genético.

Através da divergência genética obtida por RAPD, Lanza et al (1997), alocaram em três diferentes grupos heteróticos 18 linhagens de milho selecionadas a partir de duas variedades (BR-105 e BR-106). Lanza et al (1997) verificaram que o RAPD pode ser usado como uma alternativa para determinar a divergência genética entre linhagens de milho, separando-as em grupos heteróticos diferentes, e auxiliar

na escolha de cruzamentos superiores reduzindo assim, o número de cruzamentos requeridos nas avaliações a campo. Liu et al. (1998) analisando 15 linhagens utilizadas em programas de melhoramento, concluíram que marcadores de RAPD foram efetivos e concordantes com dados de *pedigree* na separação destas linhagens em grupos heteróticos.

Enoki et al. (2002), analisando 65 linhagens de milho adaptadas para regiões frias do Japão concluíram que marcadores de regiões de microssatélites ou SSR foram efetivos para acessar a diversidade genética entre as linhagens e alocá-las em grupos heteróticos. Concordância entre dados de marcadores moleculares e *pedigree*, são descritos também por Lu e Bernardo (2001) que analisaram 8 linhagens elite. Com base em 83 alelos, foi possível agrupar as linhagens em dois grupos heteróticos distintos. Esses autores sugeriram que marcadores de SSR também podem ser utilizados na exploração da origem e conseqüentemente na organização de germoplasmas. Sun et al. (2001), comparando a diversidade genética entre 37 híbridos da região de Ontário obtida por marcadores de RAPD e microssatélites, concluíram que estes se agruparam de acordo com os dados de *pedigree* e os Valores de Unidade de Calor requeridos pelos híbridos.

Pejic et al. (1998) apresentaram um importante estudo comparativo entre marcadores moleculares em milho. Usando RFLPs, RAPDs, SSRs e AFLPs os autores concluíram que há diferenças no nível de polimorfismo revelado em cada uma deles. Os SSRs mostraram a maior taxa de polimorfismo e os AFLPs a menor, apesar dessa técnica ter sido considerada o sistema mais eficiente. Na comparação com informações de *pedigree*, apenas os resultados obtidos com os RAPDs foram discrepantes, os demais estando bem correlacionados e ratificando a possibilidade de recuperação do *pedigree* a partir de dados moleculares.

Assim, o uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento tende a maximizar o uso dos recursos genéticos.

3 REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D. E.; CREECH, R. G. Popcorn In: SPREGUE, G. F. **Corn and Corn Improvement**, 2a ed., Madison, American Society of Agronomy, 1977, p. 385-390.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

BRUCE, A.B. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. **Science**, v. 32, p. 627-628, 1910.

BRUEL, D.C.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; GERAGE, A.C.; FONSECA JR, N.S.; PRETE, C.E.C.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; SOUZA, S.G.H.; GARBUGLIO, D.D. Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1491-1498, 2006.

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

CHAVES, L.J.; MIRANDA FILHO, J.B. Predicting variety composite means without diallel crossing. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.501-506, 1997.

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

CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, v. 34, p.66-71, 1991.

CRESS, C.E. Heterosis of the hybrid related to gene frequency differences between two populations. **Genetics**, Austin, v.53, n.2, p.269-274, 1966.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2.ed., Viçosa: UFV, 1994. 390p.

DALBELLO, O.; BIAGGI, J. D. Influencia do teor de umidade, tamanho e massa específica dos grãos na capacidade de expansão do milho pipoca (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 25, 1996, Bauru. **Anais...** Bauru-SP. Unesp. CD-ROOM. 1996.

DAVENPORT, C.G. Degeneration, albinism and inbreeding. **Science**, v. 28, p. 454-455, 1908.

DAVIS, R. L. Reports of the plant breeder. Porto Rico: Puerto Rico **Agricultural Experiment Station Annual Report**, p 14-15, 1927.

DOFING, S. M.; D'CROOZ-MANSON, N.; THOMAS COMTON, M. N. Inheritance of expansions volume and yield in two popcorn x dent-corn crosses. **Crop Science**, v. 31, p.715-718, 1991.

DUARTE, I. A; FERREIRA, J. M. E NUSS, C. N. Potencial discriminatório de três testadores topcrosses de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p.365-372, 2003.

DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**. v.33, p.660-668, 1993.

EAST, E.M. Inbreeding in corn. **Connecticut Agricultural Experiment Station**, p. 419-428, 1908.

ENOKI, H.; SATO, H.; KOINUMA, K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1270-1277, 2002.

FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C.; DOS SANTOS, M.X.; RAMALHO, M.A.P. 1995. Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.9, p.1189-1194.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220p. (EMBRAPA-CENARGEM. Documento, 20).

GALINAT, W. C. **The origin of corn**. In: SPRAGUE, G. F. (Ed). Corn and corn improvement, New York: Academic Press, 1977. p. 1-48.

GALVÃO, J.C.C.; SAWAZAKI, E.; MIRANDA, G.V. Comportamento de híbridos de milho pipoca em Coimbra, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.47, p.201-218, 2000.

GAMA, E. E. G.; MAGNAVACA, R.; SILVA, J. B. da; SANS, L. M. A.; VIANA, P. A.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P.; CORREA, L. A.; FERNANDES, F. T. Milho pipoca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte-MG, v. 14, p. 12-16, 1990.

GUO, M.; RUPE, M. A.; YANG, X. CRASTA, O.; ZINSELMEIER, C. SMITH, O.S.; BOWEN, B. Genome-wide transcript analyses of maize hybrids: allelic additive gene expression and yield heterosis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p.831-845, 2006.

HALLAUER, A.R.; RUSSEL, W.A.; LAMKEY, K.R. **Corn breeding**. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, J.W. (ed). Corn and corn improvement. 3.ed. p. 463-564, 1988.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. de. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2^a ed. Ames: Iowa State University Press. 468 p., 1995.

HOSENEY, R. C.; ZELEZNAK, K.; ABDELRAHMAN, A. Mechanism of popcorn popping. **J. Cereal Chem.**, v.1, p. 43-52, 1983.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites from molecules to populations and back. **Tree**. v.11, p.424-429, 1996.

JENKINS, M. T.; BRUNSON, A. M. Methods of testing inbred lines of corn in crossbreed combinations. **Journal of the American Society of Agronomy**, Madison, v. 24, n. 7, p. 523-530, 1932.

KANTETY, R.; ZENG, X.; BENNETZEN, J. L.; ZEHR, B. E. Assessment of genetic diversity en dent and popcorn (*Zea mays L.*) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, v. 1, p. 365-373, 1995.

KEEBLE, F.; PELLEW, C. The mode of inheritance of stature and time of flowering in peas. **Genet.**, v.1, p. 47-56, 1910.

LANZA, L.L.B.; SOUZA JÚNIOR, C.L.; OTTOBONI, L.M.N.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p. 1023-1030. 1997.

LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v.21, n. 204, p. 97-108, 2000.

LINDSTROM, E. W. Prepotency of inbred sires on commercial varieties of maize. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 23, n. 8, p. 652-661, 1931.

LIU, XINZHI; PENG, ZEBIN; FU, JUNHUA; HUANG, CHANGLING; LIU, XZ; PENG, Z.B.; FU, J.H.; HUANG, C.L. Maize inbred line grouping by using cluster analysis of RAPD molecular marker, phenotype and heterosis. **Acta Agriculturae Boreali Sinica**. v. 13, p. 36-41,1998.

LITT, M.; LUTY, J. A.. A hipervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p.398-401,1989.

LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 613-617, 2001.

MANGELSDORF, P. C. Corn. **It's origin, evolution and improvement**. Harvard University Press. Cambridge. MA. 1974.

MELO, W.M.C. **Divergência genética e capacidade de combinação entre híbridos de milho**. 2000. 73p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, MG.

MIRANDA FILHO, J. B. **Cruzamentos dialélicos e síntese de compostos de milho (*Zea mays L.*) com ênfase na produtividade e no porte da planta**. 1974. 116p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. 1974.

MIRANDA, G.V.; COIMBRA, R. R.; GODOY, C. L.;SOUZA, L. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n. 6, p. 681-688, 2003.

MORAES, R. M. A.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Análise de divergência genética utilizando marcadores de microssatélites para introgressão de alelos de alto teor de proteínas em soja. In.:**Resumos do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, SBMP, Cd-room.2003.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant J**. v.3, p.175-182,1993.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain restriction. **Methods Enzimol.** v.55, p.335-350. 1987.

MUNHOZ, R. E. F. **Correlação entre a heterose e diversidade genética obtida por análise dialélica e RAPD em cultivares de milho pipoca (*Zea mays L.*)**. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2001.

PATERNIANI, E. **Estudos recentes sobre heterose**. Boletim n.1. Fundação Cargill, São Paulo. 1974.

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

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

RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD based approaches. **Plant Science**. v.162, p.329-333, 2002.

RINALDI, D. A. **Correlação entre a heterose e divergência genética estimada por avaliação de cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho pipoca**. 41 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2005.

RUMIN, G.C.R.; VENCOVSKI, R. Índice baseado em RFLPs para seleção de linhagens visando sintéticos de milho. **Scientia Agricola**, v.28, n.2. Piracicaba, 2001.

SANTOS, J.B.; NIENHUIS, J.; SKRCK, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.87, n.8, p. 909-915, 1994.

SAWAZAKI, E. **Parâmetros genéticos em milho pipoca**. 1996. 157p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP, Piracicaba.

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

SEIFERT, A.L.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; FERREIRA, J.M.; GERAGE, A.C. Análise combinatória de populações de milho pipoca em topcrosses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.5, p.771-778, 2006.

SILVA, W. J. da; VIDAL, B.C.; MARTINS, M. E. Q.; VARGAS, H.; PEREIRA, A.C.; ZERBETTO, M.; MIRANDA, L. C.M. What makes popcorn pop. **Nature**, v. 362, p.417, 1993.

SMITH, J. S. C; SMITH, O. S. The description and assesment of distances between inbred lines of maize.II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. **Maydica**, v. 34, p. 151-161. 1989.

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theor. Appl. Genet.**, v.95, p.163-173, 1997.

SPRAGUE, G. F.; TATUM, L. A. General and specific ability in single cross of corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 34, n.12, p.923-932, 1942.

SHULL, G.H. Apure line method of corn breeding. **American Breedins Association Report**, Washington, v.4, p.296-301, 1908.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: Nass L, Valois ACC, Melo IS and Valadaris-Inglis (eds). **Recursos Genéticos & Melhoramento - Plantas**. Fundação MT. Rondonópolis. , p. 939-966, 2001.

SOUZA, E.D. **Divergência genética e avaliação de famílias S1 e top crosses em milho, utilizando-se caracteres agrônômicos e marcadores RAPD**. 2000. 89p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, MG.

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

SURESH, K.S.; KHANNA, R. Physiological, biochemical, and genetic basis of heterosis. **Advances in Agronomy**, New York, v.27, p.123-174, 1975.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res**, v.12, p.4127-4138, 1984.

WEATHERMAX, P. The popping of corn. **Ind. Acad. Sci. Proc.**, v.1921, p. 149-153, 1922.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535.

WILLIER, J. B.; BRUNSON, A. M. Factors affecting the popping quality of popcorn. **J. Agric. Res.**,v. 35, p.615-624, 1927.

ZEIGLER, K.E. Popcorn. In: HALLAUER A.R. (Ed) Specialty corns. CRC Press, Boca, pp.199-234, 2001

ZINSLY, J.; MACHADO, J. Milho pipoca. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P., eds. **Melhoramento e produção do milho**. 2ed. Campinas-SP. Fundação Cargill, p. 413-421.1987.

4. ARTIGO: ASSOCIAÇÃO ENTRE A DIVERSIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD E PERFORMANCE DE HÍBRIDOS TOPCROSSES DE MILHO PIPOCA

4.1 Resumo

O presente trabalho teve por objetivo utilizar marcadores moleculares de DNA (RAPD) para analisar a diversidade entre 14 populações de milho pipoca e um testador de base genética ampla e estimar a correlação entre as distâncias genéticas e o desempenho dos híbridos *topcrosses*. Vinte e quatro *primers* aleatórios resultaram na amplificação de 218 fragmentos, dos quais 162 (74,3%) foram polimórficos. A partir dos marcadores RAPD foi gerada uma matriz de distância genética por meio do coeficiente de Jaccard. Para a avaliação das populações e dos híbridos resultantes dos *topcrosses* foi utilizado o modelo reduzido de Gardner. Um dendrograma foi construído e as associações genéticas obtidas apresentaram 3 grupos. Os marcadores RAPD mostraram ser uma ferramenta útil em determinar a extensão da diversidade genética entre as populações de milho pipoca e alocar os genótipos em grupos heteróticos distintos. Entretanto, não houve correlação significativa entre o desempenho médio dos híbridos *topcrosses* e as respectivas distâncias genéticas. Os resultados permitiram inferir que as divergências genéticas, baseados em marcadores de RAPD não foram eficientes no direcionamento de cruzamentos promissores envolvendo populações de milho pipoca e prever precisamente o desempenho dos híbridos F1.

Palavras-chave: *Zea mays L.* Grupos heteróticos. Marcadores moleculares. testadores. Capacidade de expansão. Produtividade.

4.2 Abstract

The present work had for objective to use the molecular markers of DNA (RAPD) to evaluate the diversity of 14 popcorn populations and a tester of ample genetic base and to determine the correlation between genetics distances and testcross hybrid

performance. Twenty-four different random primers were used, which resulted in the amplification of 218 fragments, 162 (74.3%) of them being polymorphic. A genetic distance matrix was created from the RAPD data, using Jaccard coefficient. The populations and the hybrid analyses were carried out using Gardner's reduced model. Dendrogram was constructed and the genetic associations showed three groups. The RAPD analysis was a useful tool in determining the extent of genetic diversity among popcorn populations and allocating genotypes into distinct heterotic groups. However, there was no significant correlation between the average performance hybrid testcrosses and the respective genetic divergence. The present results allowed to infer that the genetic distances based on RAPD data had not been efficient in the aiming of promising crossings involving popcorn populations and cannot be used to precisely predict the F1 hybrids yield performance.

Key words: *Zea mays* L. Heterotic group. Molecular markers. Testcrosses. Popping expansion. Yield.

4.3 Introdução

A exploração da heterose em combinações híbridas tem resultado em progressos significativos nos programas de melhoramento de plantas no que se refere ao aumento de rendimento de grãos. Segundo Griffing e Lindstrom (1954) e Moll et al (1965) o fenômeno da heterose em híbridos F₁ é afetado principalmente pela diversidade genética. Alguns pesquisadores têm sugerido que parentais mais distantes geneticamente podem resultar na expressão máxima da heterose (Ferreira et al, 1995). No entanto, em milho cruzamentos entre parentais extremamente divergentes podem resultar em uma situação na qual a função harmônica dos alelos pode ser quebrada (Shieh e Thseng, 2002).

Estudos de predição da capacidade de combinação têm indicado que o grau de heterose para algumas espécies e determinadas características está relacionada com a divergência genética (East, 1936). Considerando-se que a avaliação da heterose de híbridos no campo é um processo oneroso e requer longo período de tempo, a utilização de marcadores genéticos para prever as melhores combinações heteróticas tem se tornado uma alternativa muito atraente. Marcadores

moleculares baseados em DNA têm sido empregados por apresentarem algumas vantagens sobre outros métodos, ou seja, além de identificarem grande polimorfismo, não apresentam interação com o meio ambiente, podendo ser avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento (Williams et al, 1990; Dudley, 1993). A fim de identificar características agronômicas superiores nesse tipo de germoplasma, marcadores moleculares foram utilizados em estudos de diversidade genética (Kantety et al, 1995; Santacruz-Varela et al, 2004) e no mapeamento de genes/QTLs governando características importantes como a capacidade de expansão (Lu et al, 2003; Babu et al, 2006).

Dentre os marcadores moleculares utilizados atualmente, o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) vem sendo empregado pela capacidade de detectar elevado nível de polimorfismo revelado entre os indivíduos a partir da exploração de vastas regiões no genoma (Williams et al, 1990). Em milho, esta técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de diversidade, pois quando comparados com outros tipos de marcadores, aliado ao baixo custo, permitiram detectar polimorfismo de modo simples e rápido. (Liu et al, 1998; Carvalho et al, 2004; Rinaldi, 2005). Entretanto alguns resultados obtidos a partir de diferentes tipos de pesquisa são contraditórios no que diz respeito à relação entre a divergência genética e a heterose. Smith et al (1990) demonstrou que análise obtida a partir de RFLP pode ser utilizada para prever combinações híbridas superiores. Lanza et al (1997) e Bruel et al (2006) trabalhando com marcadores de RAPD conseguiram alocar linhagens de milho em grupos heteróticos e prever as melhores combinações híbridas. No entanto alguns pesquisadores não encontraram correlação entre a distância genética estimada por marcadores moleculares e a heterose de híbridos. Chen et al (1996) e Shieh e Thseng (2002) não encontraram resposta positiva entre a diversidade genética obtida através de RAPD e a performance de híbridos.

Sendo assim o objetivo deste trabalho foi estimar a heterose para características agronômicas, acessar a diversidade genética dentro de populações de milho pipoca usando marcadores de RAPD e avaliar as associações entre as distâncias genéticas obtidas por RAPD e a média das performances dos híbridos topcrosses

4.4 Material e Métodos

Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas 14 populações de milho pipoca: nove procedentes de três gerações de seleção massal estratificada dentro de variedades locais, selecionados em lavouras de agricultores no norte do Paraná (UEL MP, UEL YY, UEL SI, UEL MPS, UEL BG, UEL PAG, UEL PAP, UEL ZP e UEL PP); dois compostos procedentes da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG (CMS 42 e CMS 43) e três populações comerciais (RS 20/FEPAGRO–RS, Capitão e Japonesa).

A obtenção dos híbridos *topcrosses* foi realizado no ano agrícola 1997/1998, na Área Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). As 14 populações foram semeadas separadamente como fileiras femininas e o testador como fileira masculina. O testador foi constituído por uma mistura eqüitativa de sementes (Chaves e Miranda Filho, 1997) de todas as 14 populações, semeado em duas épocas com intervalo de sete dias, intercalado com as fileiras femininas, na proporção de três para dois, respectivamente. As fileiras femininas e o testador foram semeados em linhas de 10m de comprimento, com espaçamento de 0,9m entre linhas e densidade de cinco plantas por metro linear. As fileiras femininas foram despendoadas antes do início do florescimento masculino.

As populações e os híbridos *topcrosses* foram avaliados no ano agrícola 1999/2000, instalado na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Londrina, PR, com semeadura realizada em novembro de 1999.

Delineamento Experimental

O experimento seguiu o delineamento de blocos ao acaso, com três repetições e 28 tratamentos (14 híbridos *topcrosses* e 14 populações). A unidade experimental foi constituída de duas fileiras de 4m de comprimento, espaçamento de 0,9m entre fileiras e densidade de cinco plantas por metro linear.

Foram avaliados os seguintes caracteres: peso total de grãos na parcela (PG, em kg parcela⁻¹), corrigidos para umidade padrão de 13,5% e stand (ST) ideal de 40 plantas, ajustado para t ha⁻¹, por meio da metodologia de correção por covariância (Vencovsky e BARRIGA, 1992); capacidade de expansão (CE, em mL mL⁻¹), avaliada em grãos com 11% de umidade, em microondas (Gökmen, 2004);

altura de planta (AP, em metros), em três plantas competitivas por parcela; e florescimento feminino (FF, em dias).

Para análise dos dados utilizou-se o programa SAS versão 8.0 (SAS INSTITUTE, 1995). As estimativas dos efeitos de variedades (v_j), heterose de variedades (h_j), capacidade geral de combinação (g_i) e as análises de variâncias de *topcrosses* foram realizadas segundo a metodologia proposta por Chaves e Miranda Filho (1997), obtida a partir do modelo reduzido de Gardner (1967):

$$Y_{jj'} = \mu + \frac{1}{2}(v_j + v_{j'}) + \theta(\bar{h} + h_j + h_{j'}) + \bar{e}_{jj'}$$

Onde:

$\theta = 0$ para variedades ($j = j'$) e 1 para híbridos ($j \neq j'$);

μ = média das n variedades parentais;

v_j e $v_{j'}$ = efeito de variedades;

\bar{h} = heterose média;

h_j e $h_{j'}$ = heterose de variedades;

$\bar{e}_{jj'}$ = erro ajustado à média dos tratamentos.

As estimativas dos parâmetros foram obtidas pelas fórmulas apresentadas no Quadro 1 (Chaves e Miranda Filho, 1997).

Quadro 1. Fórmulas para a estimação de efeitos no estudo de *topcrosses* e seus parentais.

Efeitos	Estimativas
Média	$\hat{\mu} = \bar{V}$
Variedade	$\hat{v}_j = V_j - \bar{V}$
Heterose média	$\bar{h} = \frac{n}{n-1}(\bar{T} - \bar{V})$
Heterose de variedade	$\hat{h}_j = \frac{n}{n-2}[(T_j - \bar{T}) - \frac{1}{2}(V_j - \bar{V})]$

Uma notação mais simplificada foi utilizada nas fórmulas, tais que:

$V_j = Y_{jj}$; $\bar{V} = \frac{1}{n} \sum V_j$; $T_j = \frac{1}{n} \sum Y_{ij}$; $\bar{T} = \frac{1}{n} \sum T_j$, com as restrições: $\sum v_j = \sum h_j = 0$, em que os valores observados (médias) são V_j e T_j .

As análises de variâncias de *topcrosses* para cada caráter avaliado foram realizadas segundo as fórmulas apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Análise da variância com base nas médias de variedades e *topcrosses* de acordo com o modelo reduzido de cruzamento dialélico.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrados
Tratamentos	2n - 1	$\sum_{j=1}^n V_j^2 + \sum_{j=1}^n T_j^2 - \frac{(V.+T.)^2}{2n}$
Variedades (v_j)	n - 1	$\frac{1}{5} \sum_{j=1}^n [2(V_j - \bar{V}) + (T_j - \bar{T})]^2$
Heterose média (\bar{h})	1	$\frac{1}{2n} (V.-T.)^2$
Heterose de variedades (h_j)	n - 1	$\frac{1}{5} \sum_{j=1}^n [(V_j - \bar{V}) - 2(T_j - \bar{T})]^2$
Erro	(r - 1)(2n - 1)	-----

Marcadores de RAPD

Para a obtenção de DNA as sementes foram colocadas para germinar em papel toalha umedecido. Após 7 dias, cada população foi representada por um bulk (Michelmore et al, 1991) de folhas jovens de 30 plantas. O bulk do testador constitui uma mistura equitativa de folhas de cada população. O tecido foliar

foi macerado em nitrogênio líquido e o DNA genômico extraído utilizando-se o protocolo de extração descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Após a extração foi realizada a quantificação do material em fluorômetro Dyna-Quant (Hoefler-Pharmacia) e diluído a uma concentração final de $10 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

As reações de RAPD foram conduzidas em um volume final de $15 \mu\text{l}$, contendo tampão 1x buffer de PCR (75 mM de Tris-HCl pH 9.0, 50 mM de KCl, 20 mM MgCl_2 e 20 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,1 mM de cada dNTP, 0,5 mM de primer, 0.7 unidade de *Taq* DNA polimerase (Biotools) e 20 ng de DNA e água bidestilada para completar o volume. As amplificações foram realizadas em termociclador modelo PT-100 (MJ Research, Massachusetts, USA), programado para uma etapa inicial de 3 min. a 94°C , 47 ciclos de 1 min. a 94°C (desnaturação), 1,45 min. a 38°C (anelamento), 2 min. a 72°C (polimerização) e um ciclo final de extensão por 6 min. a 72°C . Após a amplificação, o volume total foi inserido em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 0,04M e EDTA 0,01M pH 7.5) a 100 V por 3 h e visualizados sob luz UV. As imagens dos géis foram capturadas usando um sistema de fotodocumentação para posterior análise. Foram utilizados 24 primers decanucleotídeos pré-selecionados (Operon Technologies, Califórnia, EUA).

Na avaliação dos géis, foi construída uma matriz de similaridade onde cada banda foi tratada como um caráter único e a sua presença em um indivíduo foi designada por 1 (um) e a ausência por 0 (zero). Foi utilizado o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers), versão 2.1 (Rohlf, 2000) para avaliar as associações genéticas entre as amostras. Com base no coeficiente de similaridade de Jaccard (1901), foram feitas comparações duas a duas, entre os genótipos. A estimativa da similaridade genética (SG) entre cada par de genótipos foi efetuada utilizando a expressão $SG_{ij} = a/(a+b+c)$, onde a =número de coincidências positivas para cada par, b =número de discordâncias do tipo 1-0 para cada par de genótipos e c =número de discordâncias do tipo 0-1 para cada par de genótipo. As distâncias genéticas (GD) entre os pares foram estimadas por $GD = 1 - GS$. A representação simplificada das distâncias foi feita por meio de um dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA) e pela dispersão das

linhagens em um gráfico bidimensional através das duas primeiras coordenadas principais. O procedimento de bootstrap foi aplicado para calcular a variância das similaridades genéticas obtidas a partir dos marcadores e, assim, verificar a consistência do dendrograma obtido usando o programa DBOOT, versão 1.1 (Coelho, 2001). A relação entre as distâncias genéticas de Jaccard e as médias observadas no *topcross* foi avaliada pela correlação de Pearson, utilizando o Programa Genes (Cruz, 2001). A significância das correlações foi verificada pelo teste t.

4. 5 Resultados e Discussão

Os quadrados médios obtidos pela análise de variância do ensaio *topcross* do experimento são apresentados na Tabela 1 para os seguintes caracteres: peso de grãos (PG), capacidade de expansão (CE), altura de planta (AP) e florescimento feminino (FF). Os coeficientes de variação (CV%) oscilaram entre 1,91% e 15,67% para FF e PG, respectivamente. O CV% obtido neste trabalho foi considerado baixo enquadrando-se nos limites aceitáveis propostos por Pimentel-Gomes (1985) e Scapim et al (1995). O CV% para CE foi relativamente baixo, quando comparado com outros autores na literatura que obtiveram valores de CV% variando de 9,1 % (Simon et al, 2004) a 19,2% (Santos et al, 2004) o que revela a boa precisão experimental para ensaios de milho pipoca conduzidos em campo.

Foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, para os caracteres avaliados (PG, AP, FF) exceto para CE. Efeitos significativos de variedades foram detectados para todos os caracteres em estudo com exceção para a CE. As significâncias da heterose média (\bar{h}) observada para PG, CE, AP e FF indicam que de um modo geral, os híbridos *topcrosses* apresentaram comportamento diferenciado em relação às populações *per se* (Tabela 3). Quando o quadrado médio da heterose média é significativo, a variância das frequências gênicas entre as variedades é suficientemente grande em, pelo menos, parte dos locos com dominância, e as variedades, nessas condições, são divergentes nesses locos (Vencovsky, 1970).

O efeito de variedade (v_j) está relacionado aos componentes aditivos das médias, enquanto que heterose de variedades (h_j) relaciona-se aos componentes de dominância, o que indica uma diversidade entre os genótipos e diferenças no potencial dessas populações para o uso em programas de melhoramento. Entretanto, para h_j apenas os caracteres PG e FF apresentaram efeitos significativos ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 1). Para os caracteres CE e AP, os efeitos v_j foram preponderantes, o que indica a importância maior dos componentes aditivos sobre os não aditivos na manifestação desses caracteres.

As estimativas positivas de v_j , h_j e g_i são apresentadas na Tabela 2. Valores de g_i positivos, para PG, foram observados em UEL YY, UEL SI, UEL PAP, UEL ZP, UEL PP, CMS 42, CMS 43 e RS 20. Estas populações apresentaram as maiores estimativas positivas de g_i , sendo, portanto, de maior potencial para aumentar a média desse caráter, quando utilizadas em cruzamentos nesse estudo. Estes dados são apresentados na Tabela 3 e mostram tais populações como as melhores médias *topcrosses*. A população CMS 43 apresentou o melhor desempenho na avaliação *per se* e também em combinação híbrida com o testador, comprovando os valores positivos de v_j e g_i (Tabela 3). Entretanto, nem sempre as populações que se destacam na avaliação *per se* são as que conseguem bons desempenhos quando em combinações híbridas (Hallauer, 1990).

Para CE, os maiores valores positivos de v_j foram estimados para as populações CMS 43, UEL YY, Japonesa, UEL SI, UEL ZP e UEL PP, onde estas ainda apresentaram valores médios de CE acima de 25. Para h_j , os maiores valores positivos ocorreram para as populações RS 20 e UEL MPS. Para g_i , as populações RS 20 e UEL MPS apresentaram maiores valores positivos. A capacidade de expansão (CE) é o caráter de maior importância no milho pipoca, por estar relacionado diretamente com a qualidade da pipoca. As populações com maiores efeitos de v_j (Tabela 2), que apresentaram as maiores médias da variável CE (Tabela 3), possuem maiores frequências de alelos favoráveis para CE, provavelmente como resultado do melhoramento para esta característica. Neste trabalho, a média geral das populações para CE foi 24,10 mL mL⁻¹ (Tabela 3). A média geral da capacidade de expansão dos materiais comerciais testados no Ensaio Nacional de Milho Pipoca 1991/1992, realizado pela Embrapa, foi de 17,39 (Pacheco, 1992), muito abaixo do padrão exigido pelas empresas que atuam no setor. Em 1997/1998, em Londrina, PR, diversos genótipos avaliados por

Carpentieri-Pípolo et al (2002) apresentaram a CE entre 18,53 e 27,50 mL mL⁻¹. Destacaram-se os genótipos UEL ZP, UEL SI e UEL PAP, com valores para CE de 27,50, 27,15 e 24,40 mL mL⁻¹, respectivamente. Tais resultados são considerados promissores para utilização dos materiais em programas de melhoramento.

O desempenho médio dos *topcrosses* foi superior ao obtido pelas populações *per se*, e evidenciou a ocorrência de heterose nos *topcrosses* para o caráter PG. Alguns melhoristas acreditam que as avaliações de populações em *topcrosses* são prejudicadas pelo fato de os cruzamentos apresentarem diversas características indesejáveis, associadas à introdução dos alelos do testador (Lonquist e Lindsey, 1964; Souza, 2000). Teoricamente, o testador contribui com 50% dos alelos, e apenas os 50% restantes representariam os genótipos avaliados (Pinto et al, 2004). Além deste efeito, os alelos do testador podem interagir ou não com os alelos dos genótipos a serem avaliados, prejudicando a representatividade das diferenças desses genótipos. No presente trabalho, apesar do testador ter sido constituído por uma mistura de sementes das populações isso não influenciou na discriminação dos *topcrosses*, possibilitando a identificação de genótipos superiores.

Para a análise da diversidade genética avaliada por marcadores moleculares de DNA foram utilizados 24 primers de RAPD previamente selecionados, sendo escolhidos para este trabalho somente aqueles que apresentaram habilidade de produzir bandas polimórficas. Estes primers geraram um total de 218 bandas amplificadas, com uma média de 9,08 bandas por primer. Destas, 162 (74,3%) foram polimórficas e 56 (25,7%) monomórficas. O número de bandas polimórficas variou de 1 para os primers OPAR-17 e OPT-08 até 18 para o primer OPAR-05. Um exemplo de padrão eletroforético pode ser visto na Figura 1. O nível de polimorfismo encontrado neste trabalho manteve-se próximo a alguns resultados descritos na literatura. O polimorfismo obtido (74,3%) foi um pouco acima ao encontrado por Munhoz (2001) que avaliando a diversidade genética obtida com marcadores RAPD entre cultivares de milho pipoca obteve 62% de polimorfismo, enquanto que Rinaldi (2005) trabalhando com populações de milho pipoca obteve a partir de 26 primers de RAPD 75,6% de polimorfismo. Deve-se considerar que as variações encontradas quanto aos níveis de polimorfismo podem ser interpretadas como sendo resultado de diferenças genéticas entre os materiais utilizados e/ou devido ao acesso à regiões distintas do genoma que foram acessados pelos marcadores escolhidos (Sun et al, 2001). Em estudos de variabilidade genética um

aspecto importante a ser considerado é a estabilidade das associações mostradas no dendrograma (Carvalho et al, 2004). Usando o método de bootstrap (Coleho, 2001) foi possível determinar o número de bandas necessárias para se avaliar a estável associação entre os genótipos. Na Figura 2 pode-se observar que 218 bandas foram suficientes para acessar a variação genética presente nas 14 populações (coeficiente de variação = 5,5 %). Análises de diversidade genética envolvendo linhagens de milho mostraram que 150 bandas polimórficas de RAPD são suficientes para obter a estabilidade do dendrograma (Lanza et al, 1997, Pejic et al, 1998). Entretanto o número de bandas pode variar dependendo da variabilidade genética dos materiais, bem como do coeficiente de similaridade empregado (Thormann et al, 1994).

Com base nos valores das distâncias genéticas originadas a partir dos marcadores de RAPD foi construído um dendrograma usando o agrupamento UPGMA a fim de ilustrar a associação entre as populações utilizadas neste estudo. O dendrograma construído e a análise de coordenadas principais mostrou que as 14 populações e o testador se separaram em 3 grupos distintos (Figura 3 e 4). No grupo I encontram-se as populações UEL MP, UEL SI, UEL MPS E UEL BG todas pertencentes à Universidade Estadual de Londrina; no grupo II estão as populações UEL PAG, UEL PAP, UEL ZP, UEL PP, Capitão, CMS 42 e CMS 43 e UEL YY, com exceção dos compostos CMS 42 e CMS 43 que são procedentes da Embrapa Milho e Sorgo e da população comercial Capitão, as demais são pertencentes ao programa de melhoramento de milho pipoca da UEL. Exceto a CMS 43 que apresenta coloração branca e textura de grão do tipo americana as demais são amarelas, redondas, brilhante e sem arista. No agrupamento III apareceram os compostos comerciais Japonesa, RS 20 e o testador. Seifert et al (2006) avaliando a análise combinatória em populações de milho pipoca, considerou que a população Japonesa pertence a um grupo heterótico diferente das demais populações. No presente trabalho isso se confirmou através dos dados dos marcadores de RAPD. Essa variedade se destaca das demais por a única a apresentar o grão do tipo alho e coloração roxa, opaca com arista. A heterose está normalmente associada a diferenças raciais e distância genética. A separação dos grupos heteróticos podem se dar a partir do tipo e coloração de grãos, graus-dias, florescimento. Carvalho et al (2002) trabalhando com variedades de milho crioulo e marcadores do tipo ISSR conseguiram alocar o material em 3 grupos heteróticos de acordo com a cor do

endosperma e dias para florescimento. Sun et al (2001) combinaram os dados de RAPD e de microssatélites e conseguiram separar em 2 grupos 37 híbridos comerciais de acordo com graus dias. Sendo assim os marcadores de RAPD podem ser usados como uma ferramenta para determinar a extensão da diversidade genética entre as populações de milho pipoca e para alocar genótipos em grupos heteróticos distintos (Lanza et al, 1997; Munhoz, 2001; Bruel et al, 2006).

As distâncias genéticas provenientes dos dados de RAPD baseado no coeficiente de Jaccard mostraram que as populações variaram de 11% entre as populações UEL SI e UEL MPS até 54% entre as populações UEL YY e Japonesa (Tabela 4). Desta maneira esses marcadores detectaram grande variabilidade genética entre essas populações o que pode ser explorado nos programas de melhoramento de milho pipoca. A distância genética média entre o testador e as populações foi de 40%; a menor distância foi de 25% entre o testador e a população RS20 enquanto que a maior foi de 52% para a população UEL YY. De acordo com os cruzamentos obtidos nos *topcrosses* para PG pode-se verificar que as maiores médias em combinação híbrida com o testador foram os híbridos CMS 43 TC, CMS 42 TC e UEL SI TC com 4.140, 3.940 e 3.450 t ha⁻¹, respectivamente. Para a CE os híbridos que se destacaram foram RS 20 TC e UEL MPS TC com 25,4 e 25 mL mL⁻¹, respectivamente. Verificou-se que as melhores combinações híbridas não foram aquelas que apresentaram as maiores distâncias genéticas, diferente dos resultados obtidos por Wang et al (1994), Lanza et al (1997) e Bruel et al (2006) que obtiveram correlações positivas entre a divergência genética e a performance de híbridos obtidos a partir de linhagens de milho. Não houve correlação significativa entre as distâncias genéticas detectadas por RAPD e o desempenho agrônômico dos híbridos *topcrosses*. Estas foram não significativas e positivas para as características CE ($r= 0,1051$), AP ($r= 0,0131$) e FF ($r= 0,0361$) e negativas para PG ($r= -0,0304$). A utilização dos marcadores RAPD não foi efetiva para prever precisamente o desempenho dos híbridos das populações de milho pipoca utilizadas neste trabalho.

Os resultados encontrados neste trabalho não foram inteiramente inesperados na luz dos estudos recentes que demonstram a natureza complexa entre marcadores e a heterose. Tais resultados corroboram com outros autores que também não encontraram correlações consistentes entre a distância genética gerada pelos marcadores de DNA e a performance dos híbridos ou a heterose (Dudley et al,

1991; Melchinger, 1999; Shieh et al, 2002; Yu et al, 2005; Menkir et al, 2006). Lee et al (1989) observaram que, embora o RFLP tenha separado linhagens de milho em grupos heteróticos, esses não foram concordantes com o grau de parentesco entre elas. Zhang et al (1996) estudando diferentes espécies de arroz associou que a correlação entre a diversidade genética acessada pelos marcadores de RFLP e a heterose depende do tipo de germoplasma utilizado. Strauss (1986) e Vaillancourt et al (1995) não encontraram correlações entre a distância genética dos parentais e a heterose em árvores florestais.

A ausência de associações significativas, observadas neste estudo, pode ser explicada quando consideramos que 218 bandas foram amplificadas e destas, 162 foram de fragmentos polimórficos, pertencentes a qualquer parte do genoma, incluindo áreas que não sofreram pressão de seleção como é o caso daquelas seqüências que não codificam nenhuma característica agrônômica importante (Joyce et al, 1999). Isto nos leva a concluir que para predizer a heterose é necessário diferenciar heterose geral da heterose “funcional” pois nem todos os fragmentos polimórficos obtidos contribuem com a heterose, existe um número considerável de fragmentos que são localizados em regiões não codificadas do genoma ou ainda, como já foi mencionado acima, os fragmentos podem não ter associações com caracteres de importância econômica (Zhang et al, 1996).

Outro fator que reduz as chances de se detectar correlações significativas entre a divergência genética e a heterose é que os marcadores podem não estarem associados às características agrônômicas importantes. Ao contrário do que ocorre com marcadores de locos quantitativos ou QTLs, que exploram regiões mais ligadas às características agrônômicas relativas à produtividade e capacidade expansão, quando se utiliza marcadores RAPD a dispersão destes ao acaso pode não ser suficiente na exploração do genoma, o que resulta em distâncias genéticas que não correspondem com a heterose dos híbridos (Bernardo et al, 1992). Uma alternativa para tentar solucionar este problema seria a utilização de um maior número de marcadores para obter uma melhor cobertura do genoma ou a utilização de locos pré selecionados procurando acessar principalmente regiões do genoma com elevado grau de heterose e que estejam ligados às características agrônômicas de interesse (Leonardi et al, 1991 e Munhoz, 2001). Além da indicação do uso de um número maior de marcadores, particularmente em estudos envolvendo cruzamentos topcrosses, a partir dos resultados deste trabalho sugere-se um aumento do número

de parentais e progênies avaliados, pois isso aumentaria as chances de se encontrar associações significativas e positivas entre heterose e a divergência genética (Tsaftaris, 1995).

Neste trabalho, a ausência de correlação entre a performance dos híbridos e a divergência genética entre as populações parentais estudadas pode ser explicada também em razão dos híbridos terem sido avaliados em um só local (Londrina), pois a resposta heterótica entre um pool de genes não depende somente da distância genética entre os pais, mas também da adaptação aos diferentes ambientes no qual o experimento foi conduzido. Com vistas nos resultados desta pesquisa sugere-se o monitoramento da interação genótipo e ambiente através da avaliação da performance dos híbridos em vários locais e anos (Link et al, 1996).

Particularmente neste estudo, para os caracteres PG e FF onde os efeitos de dominância foram os principais determinantes da diversidade, a falta de associação entre a performance dos híbridos e a divergência genética entre os parentais pode ter sido prejudicadas pela falta de harmonia entre os níveis de dominância e a complementaridade das freqüências alélicas entre os parentais utilizados nos cruzamentos (Bernardo et al, 1992)

A respeito do rendimento de grãos e da capacidade de expansão estes apresentam características de herança complexa e de baixa herdabilidade; entretanto, tratando-se de valores médios, o rendimento de grãos pode ser visto com traços de elevada herdabilidade e efeito dominante, concordando com a predição de Bernardo et al (1992) onde os autores identificaram essas características como condição para predizer efetivamente a performance de híbridos utilizando marcadores heterozigotos. Entretanto no presente trabalho, não foi encontrado uma correlação positiva entre a distância baseada em RAPD e o rendimento de grãos, sugerindo que os marcadores RAPD não se encontram fortemente ligados a locos QTLs. O RAPD é eficiente para acessar a diversidade genética de todo o genoma, contudo podem não refletir as diferenças morfológicas de caracteres agrônômicos que vem sofrendo pressão de seleção.

4.6 Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4.7 Referencias

BABU, R.; NAIR, S.K.; KUMAR, A.; RAO, H.S.; VERMA, P.; GAHALAIN, A.; SINGH, I. S.; GUPTA, H.S. Mapping QTLs for popping ability in a popcorn x flint corn cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p.1392-1399. 2006.

BERNARDO, R. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, p. 628-634, 1992.

BRUEL, D.C.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; GERAGE, A.C.; FONSECA JR, N.S.; PRETE, C.E.C.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.;SOUZA, S.G.H.; GARBUGLIO, D.D. Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1491-1498, 2006.

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

CARVALHO, V.P.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; FERREIRA, J.M.; MOREIRA, M.P. Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays L.*) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v, 2, p.557-568, 2002.

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

CHAVES, L.J.; MIRANDA FILHO, J.B. Predicting variety composite means without diallel crossing. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.501-506, 1997.

CHEN, S., HWU, K.K.; CHEN, C. Prediction of heterosis with genetic diversity among maize (*Zea mays L.*) inbred lines revealed by random amplified polymorphic NDA. **J Agric Res China**, v.45, p.147–155, 1996.

COELHO, A.S.G. **DBOOT – Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores, versão 1.1**. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 2001.

CRUZ, C.D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística versão Windows**. Viçosa - MG. UFV, 2001. 442 p.

DUDLEY, J.W.; SHAGAI-MAROOF, M.A.; RUFINER, G.K. Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. **Crop Science**, v.33, p.660-668, 1991.

DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, v.33, p.660-668, 1993.

EAST, E.M. Heterosis. **Genetics**, v.21, p.375-397, 1936.

FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C.; DOS SANTOS, M.X.; RAMALHO, M.A.P. Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.1189-1194, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998, 220p. (EMBRAPA-CENARGEM. Documento, 20).

GARDNER, C.O. Simplified methods for estimating constants and computing sums of square for a diallel cross analysis. **Fitotecnia Latinoamericana**, v.4, p.1-12, 1967.

GÖKMEN, S. Effects of moisture content and popping method on popping characteristics of popcorn. **Journal of Food Engineering**, v.65, p.357-362, 2004.

GRIFFING, B.; LINDSTROM, E.W. A study of the combining ability of corn inbreds having varying proportions of corn belt and non-corn belt germplasm. **Agron J**, v.46, p.545-552, 1954.

HALLAUER, A.R. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica**, v.35, p.1-16, 1990.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, v.37, p.547-579, 1901.

JOYCE, T.A.; ABBERTTON, M.T.; MICHAELSON-YATES, T.P.T.; FORSTER, J.W. Relationships between genetic distance measured by RAPD-PCR and Heterosis in inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, v.107, p.159-165, 1999.

KANTENTY, R.V.; ZENG, X.; BENNETZEN, J.L.; ZEHR, B. E. Assesment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**, v.1, p.365-373, 1995.

LANZA, L.L.B.; SOUZA JÚNIOR, C.L.; OTTOBONI, L.M.N.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA, A.P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p. 1023-1030, 1997.

LEE, M.; GODSHALK, E.B.; LAMKEY K.R.; WOODMAN W.W. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. **Crop Science**, v.29, p.1067–1071, 1989.

LEONARDI, A.; DAMERVAL C.; HEBERT, Y.; GALLAIS A.; VIENNE, D. de. Association of protein amount polymorphism (PAP) among maize lines with performances of their hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, v.82, p.552–560, 1991.

LINK, W.; SCHILL, B.; BARBERA, A.C.; CUBERO-FILIPPETTI, A.; STRINGI, L.; KITTLITZ, E. VON; MELCHINGER, A.E. Comparison of intra and inter-pool crosses in faba beans (*Vicia faba* L.). I. Hybrid performance and heterosis in Mediterranean and German environments. **Plant Breeding**, v.115, 352–360, 1996.

LIU, X.; PENG, Z.; FU, J.; HUANG, C.; LIU, X.Z.; PENG, Z.B.; FU, J.H.; HUANG, C.L. Maize inbred line grouping by using cluster analysis of RAPD molecular marker, phenotype and heterosis. **Acta Agriculturae Boreali Sinica**, v.13, p.36-41, 1998.

LONNQUIST, J.H.; LINDSEY, M.F. Topcross versus S1 line performance in maize. **Crop Science**, v.4, p.580-584, 1964.

LU, H. J.; BERNARDO, R.; OHM, H. W. Mapping QTL for popping expansion volume in popcorn with simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.423-427, 2003.

MENKIR, A.; OLOWOLAFE, M. O.; INGELBRECHT, I.; FAWOLE, I.; BADU-APRAKU, B.; VROH, B.I. Assesment of testcross performance and genetic diversity of yellow endormperm maize lines derived from adapted x exotic backcrosses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.113, p.90-99, 2006.

MELCHINGER, A.E. Genetic diversity and heterosis. In: J.G. COORS & S. PANDEY (Eds.), *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*, pp. 99–118. **American Society of Agronomy**, Inc., Madison, Wisconsin, 1999.

Michelmore, R.W; Paran, I.; Kesseli, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v. 88, p.9828-9832. 1991.

MOLL, R.H.; LONNQUIST, J.H.; FORTUNA, J.V.; JOHNSON, E.C. The relation of heterosis and genetic divergence in maize. **Genetics**, v.52, p.139–144, 1965.

MUNHOZ, R. E. F. **Correlação entre a heterose e diversidade genética obtida por análise dialélica e RAPD em cultivares de milho pipoca (*Zea mays* L.)**. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2001.

PACHECO, C.A.P. **Ensaio nacional de milho pipoca**: resultados do ano agrícola de 1991/1992. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1992.37p.

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

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo: USP/ESALQ, 1985. 467p.

PINTO, R.J.B.; SCAPIM, C.A.; FERREIRA NETO, A.; PACHECO, C.A.P.; ROYER, M.; PEDRONI, M.V.; SALVADORI, R.K.; SILVA, R.M. Analysis of testers with broad and narrow genetic base for topcrosses in popcorn breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.152-162, 2004.

RINALDI, D. A. **Correlação entre a heterose e divergência genética estimada por avaliação de cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho pipoca**. 41 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2005.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1**. Owner manual. 2000.

SANTACRUZ-VARELA, A.; WIDRLECHNER, M.P.; ZIEGLER, K. E.; SALVADOR, R.J.; MILLARD, M. J.; BRETTING, P. K. Phylogenetic relationships among North American Popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. **Crop Science**. v.44, p.1456-1467. 2004.

SANTOS, J.F.; VIANA, J.M.S.; VILARINHO, A.A.; CÂMARA, T.M.M. Efficiency of S_2 progeny selection strategies in popcorn. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.183-191, 2004.

SAS INSTITUTE. **SAS language and procedures: usage statistics SAS Institute**. Version 6, Cary, North Carolina, 1995. 373p.

SCAPIM, C.A.; CARVALHO, C.G.P.; CRUZ, C.D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, p. 683-686, 1995.

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

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

SIMON, G. A.; SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; PINTO, R.J.B.; BRACCINI, A. de L.; TONET, A. Depressão por endogamia em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v.63, n.1, p.55-62, 2004.

SMITH, O.S.; SMITH, J.S.C.; BOWEN, S.L.; TENBORG, R.A.; WALL, S.J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, heterosis, and RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, p. 833–840, 1990.

SOUZA, E.D. **Divergência genética e avaliação de famílias S1 e top crosses de milho, utilizando-se caracteres agronômicos e marcadores RAPD**. 88p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2000.

STRAUSS, S.H. Heterosis at allozyme loci under inbreeding and crossbreeding in *Pinus attenuata*. **Genetics**, v.113, p. 115–134, 1986.

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

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

TSAFTARIS, S.A. Molecular aspects of heterosis in plants. **Physiol Plant**, v.94, p.362–370, 1995.

VAILLANCOURT, R.E.; POTTS, B.M.; WATSON, W.; VOLKER, P.W.; HODGE, G.R.; REID, J.B.; WEST, A.K. Detection and prediction of heterosis in *Eucalyptus globulus*. **For Genet**, v.2, p. 11-19, 1995.

VENCOVSKY, R. **Alguns aspectos teóricos e aplicados relativos a cruzamentos dialélicos de variedades**. 59p. Livre Docência - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba. 1970.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética Biométrica no Fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486p.

YU, C.Y.; HU, S.W.; ZHAO, H.X. GUO, A.G.; SUN, G.L. Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus L.*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.511-518, 2005.

WANG, Y.L.; QIAO, C.G.; WANG, Q.Y.; ZHAO, R.G. Relation between genetic divergence and heterosis in popcorn. **Acta Agronomica Sinica**, v.20, p.223-228, 1994.

WILLIAMS, J.K.; KUBELIK, A.R; LIVAK, K.G.; RAFALKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n.22, p.6531-6535, 1990.

ZHANG, Q.; ZHOU, Z.; YANG, G.P.; XU, C.G.; LIU, K.D.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.1218–1224, 1996.

Tabela 1. Análise de variância de *topcrosses* de milho pipoca para as características peso de grãos (PG, em t ha⁻¹), capacidade de expansão (CE, em mL mL⁻¹), altura de planta (AP, em metros) e florescimento feminino (FF, em dias)⁽¹⁾.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		PG	CE	AP	FF
Tratamentos	27	670,95 ^{**}	3,8502 ^{ns}	39,760 ^{**}	24,451 ^{**}
Variedades	13	628,19 ^{**}	2,5129 ^{ns}	51,982 ^{**}	45,389 ^{**}
Heterose média	1	4.839,40 ^{**}	16,3860 [*]	288,730 ^{**}	7,682 [*]
Heterose de variedades	13	393,06 ^{**}	4,2233 ^{ns}	8,386 ^{ns}	4,803 ^{**}
Erro	54	148,33	2,7943	5,078	1,218
CV (%)		15,67	7,17	3,74	1,91

⁽¹⁾Valores de quadrado médio multiplicados por 10⁻³; graus de liberdade de erro igual a 53, para o caráter PG. ^{ns}: Não-significativo. ^{*} e ^{**}: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 2. Estimativa dos efeitos de variedade (v_j), de heterose de variedades (h_j) e da capacidade geral de combinação (g_j), obtidas nos experimentos de avaliação de topcrosses de milho pipoca⁽¹⁾:

População	PG			CE			AP			FF		
	v_j	h_j	g_j	v_j	h_j	g_j	v_j	h_j	g_j	v_j	h_j	g_j
UEL MP	0,63	-1,33	-1,02	-1,83	1,54	0,63	0,13	0,01	0,16	-1,24	1,94	1,32
UEL YY	-1,10	0,79	0,24	2,25	-3,08	-1,95	-0,19	0,05	-0,04	-0,57	0,78	0,49
UEL SI	0,34	0,47	0,64	1,54	-2,03	-1,23	0,06	-0,06	-0,03	-1,24	1,17	0,55
UEL MPS	0,04	-1,28	-1,26	-0,46	3,12	2,89	-0,17	-0,14	-0,23	-4,24	0,97	-1,15
UEL BG	-0,55	-0,01	-0,28	-1,29	1,23	0,58	-0,17	0,10	0,01	-0,24	-0,58	-0,70
UEL PAG	0,12	-0,26	-0,20	-3,67	3,29	1,46	0,02	-0,12	-0,11	-4,90	5,25	2,80
UEL PAP	-0,96	0,59	0,11	-1,58	2,03	1,24	-0,17	-0,06	-0,15	-4,57	0,78	-1,51
UEL ZP	0,06	0,17	0,20	1,54	0,50	1,27	-0,02	0,01	0,00	-0,24	1,75	1,63
UEL PP	0,24	0,21	0,33	1,08	-0,26	0,28	0,13	-0,05	0,02	-1,24	1,17	0,55
Capitão	0,01	-1,59	-1,57	0,33	-4,14	-3,98	-0,15	-0,12	-0,20	-0,24	-6,81	-6,92
CMS 42	0,99	0,66	1,16	-1,25	-1,52	-2,15	0,31	0,25	0,40	0,76	-0,78	-0,40
CMS 43	1,27	0,73	1,37	2,37	-0,23	0,95	0,36	0,01	0,28	2,76	-3,11	-1,73
Japonesa	-0,40	0,20	0,00	1,62	-4,17	-3,36	-0,10	0,10	0,05	20,76	-3,11	7,27
RS 20	-0,69	0,63	0,28	-0,67	3,73	3,40	-0,05	-0,15	-0,17	-5,57	0,58	-2,20

⁽¹⁾PG: peso de grãos ($t\ ha^{-1}$); CE: capacidade de expansão ($mL\ mL^{-1}$); AP: altura de planta (m); FF: florescimento feminino (dias).

Tabela 3. Médios das populações e respectivos cruzamentos *topcrosses* do experimento de milho pipoca na UEL.

Populações	UEL			
	PG ⁽¹⁾	CE	AP	FF
CMS 043 TC ⁽²⁾	4,14 a	23,5 abc	2,27 ab	57 cd
CMS 042 TC	3,94 ab	20,6 abc	2,37 a	58 cd
UEL SI TC	3,45 abc	21,6 abc	1,99 cdef	59 cd
CMS 043	3,31 abcd	26,5 a	2,16 abc	60 c
UEL PP TC	3,18 abcd	22,9 abc	2,03 bcde	59 cd
RS 20 TC	3,07 abcde	25,4 ab	1,85 efgh	56 de
UEL ZP TC	3,05 abcde	23,8 abc	2,01 cdef	60 cd
CMS 042	3,03 abcde	22,8 abc	2,12 bcd	58 cd
UEL YY TC	3,00 abcde	21,0 abc	1,96 cdefg	59 cd
UEL PAP TC	2,90 abcdef	23,5 abc	1,87 defgh	57 cd
Japonesa TC	2,85 bcdef	19,8 bc	2,04 bcde	66 b
UEL PAG TC	2,72 bcdefg	23,5 abc	1,91 cdefg	60 c
UEL MP	2,67 bcdefg	22,3 abc	1,94 cdefg	56 de
UEL BG TC	2,59 cdefgh	23,0 abc	2,00 cdef	58 cd
UEL SI	2,39 cdefgh	25,6 ab	1,86 defgh	56 de
UEL PP	2,28 cdefghi	25,2 abc	1,94 cdefg	56 de
UEL PAG	2,17 cdefghij	20,4 abc	1,83 efgh	52 ef
UEL ZP	2,10 defghij	25,6 ab	1,79 efgh	57 cd
UEL MPS	2,08 defghij	23,6 abc	1,64 h	53 ef
Capitão	2,05 defghij	24,4 abc	1,65 h	57 cd
UEL MP TC	2,05 defghij	23,0 abc	2,16 abc	59 cd
UEL MPS TC	1,80 efghij	25,0 abc	1,80 efgh	57 cd
Japonesa	1,64 fghij	25,7 ab	1,70 gh	78 a
Capitão TC	1,52 ghij	19,2 c	1,82 efgh	52 ef
UEL BG	1,49 ghij	22,8 abc	1,63 h	57 cd
RS 20	1,35 hij	23,4 abc	1,75 fgh	52 f
UEL PAP	1,08 ij	22,5 abc	1,64 h	53 ef
UEL YY	0,94 j	26,3 a	1,61 h	57 cd
Média das Pop.	2,04	24,1	1,80	57
Média Topcross	2,87	22,6	2,01	58
Média Geral	2,46	23,3	1,90	58
CV entre médias(%)	26,89	12,41	6,48	3,31

⁽¹⁾ PG: peso de grãos (t ha⁻¹); CE: capacidade de expansão (mL mL⁻¹); AP: altura de planta (m); FF: florescimento feminino (dias). Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ TC: cruzamentos *topcrosses*.

Tabela 4. Matriz de distância genética entre as 14 populações e o testador estimada por marcadores de RAPD baseado no coeficiente de Jaccard.

	UEL MP	UEL YY	UEL SI	UEL MPS	UEL BG	UEL PAG	UEL PAP	UEL ZP	UEL PP	Capitão	CMS 42	CMS 43	Japonesa	RS 20	Testador
UEL MP	1,00														
UEL YY	0,34	1,00													
UEL SI	0,26	0,33	1,00												
UEL MPS	0,20	0,26	0,21	1,00											
UEL BG	0,28	0,28	0,20	0,15	1,00										
UEL PAG	0,25	0,35	0,28	0,24	0,24	1,00									
UEL PAP	0,29	0,32	0,32	0,27	0,25	0,23	1,00								
UEL ZP	0,30	0,39	0,29	0,26	0,26	0,22	0,19	1,00							
UEL PP	0,30	0,38	0,34	0,31	0,30	0,28	0,24	0,22	1,00						
Capitão	0,29	0,38	0,24	0,29	0,30	0,27	0,29	0,25	0,23	1,00					
CMS 42	0,28	0,36	0,28	0,31	0,32	0,27	0,27	0,27	0,26	0,21	1,00				
CMS 43	0,34	0,40	0,33	0,32	0,35	0,32	0,33	0,30	0,32	0,26	0,14	1,00			
Japonesa	0,44	0,54	0,47	0,44	0,45	0,45	0,45	0,47	0,45	0,41	0,38	0,37	1,00		
RS 20	0,42	0,52	0,48	0,45	0,49	0,44	0,42	0,44	0,40	0,39	0,35	0,38	0,29	1,00	
Testador	0,44	0,53	0,46	0,43	0,44	0,46	0,42	0,43	0,39	0,37	0,38	0,39	0,29	0,25	1,00

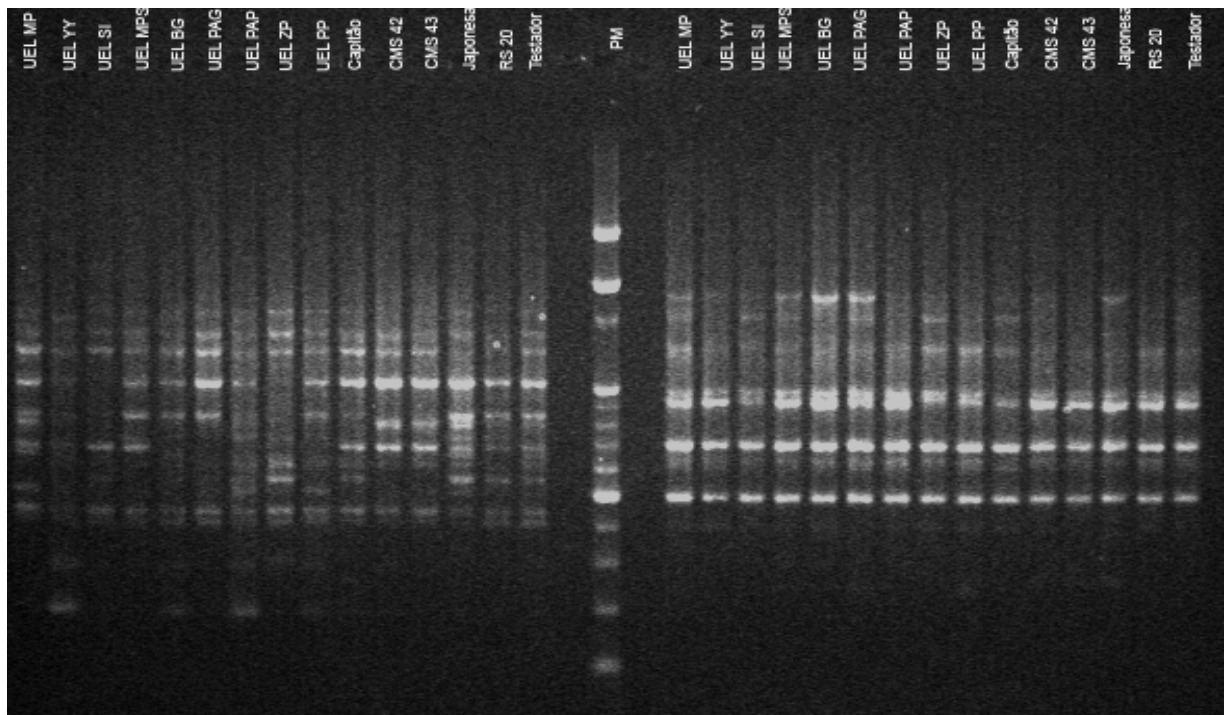


Figura 1. Padrão eletroforético obtido a partir dos primers de RAPD OPAD-06 e OPAD-13, respectivamente. (PM- peso molecular).

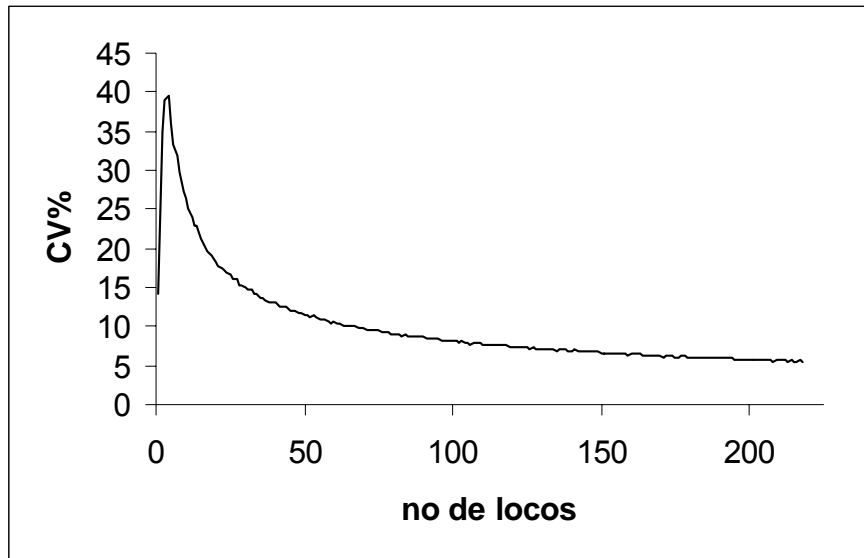


Figura 2. Coeficiente de variação para o número de marcadores, estimados a partir de 1000 sorteios bootstrap (CV= 5,5%).

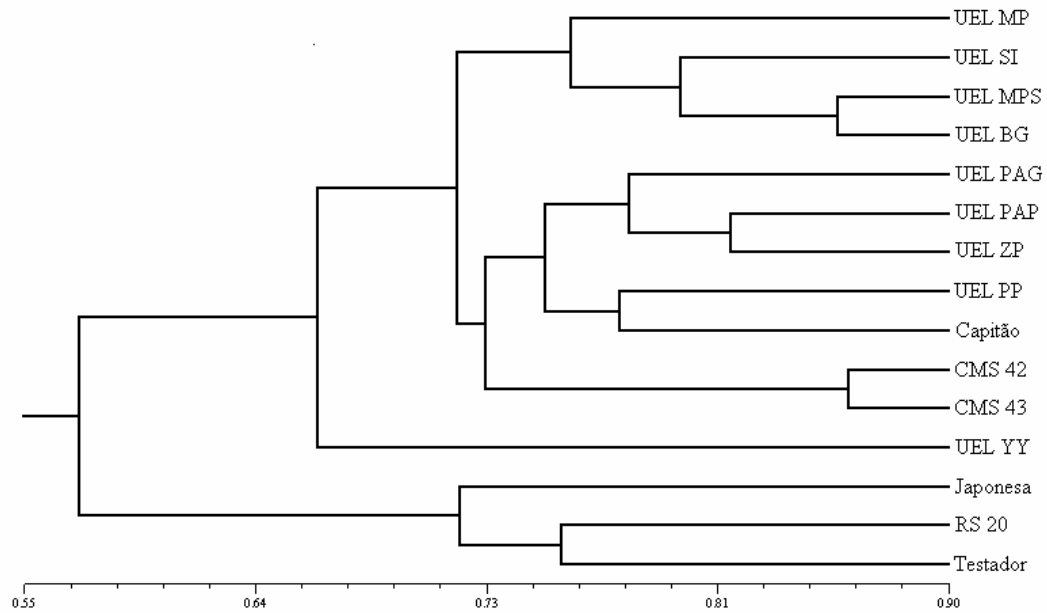


Figura 3. Dendrograma obtido a partir dos marcadores de RAPD, pelo agrupamento UPGMA entre as 14 populações de milho pipoca e o testador baseado nas similaridades genéticas de Jaccard.

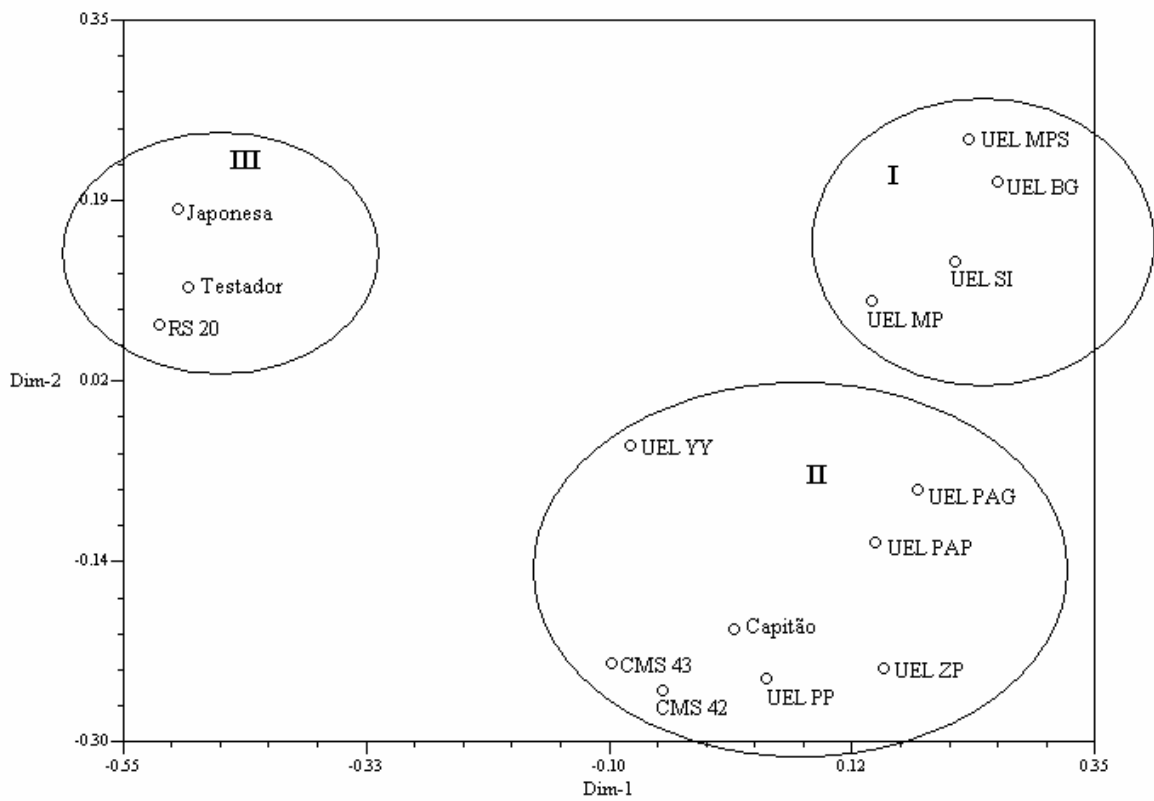


Figura 4. Análise da coordenada principal obtida através dos marcadores RAPD onde mostrou uma tendência das linhagens em se separar em três grupos de acordo. As coordenadas, primária e secundária, explicam 23.89% e 12.21% de variação genética, respectivamente.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O testador utilizado possibilitou a identificação de genótipos superiores entre as populações de milho pipoca

A característica PG foi influenciada tanto pelos efeitos aditivos como pelos efeitos de dominância.

Os efeitos de heterose revelaram que existe divergência entre as populações.

Os marcadores RAPD foram eficientes em detectar polimorfismos e acessar a diversidade genética entre as populações de milho pipoca.

As distâncias genéticas geradas a partir dos marcadores de RAPD não apresentaram correlação significativa para os caracteres agrônômicos avaliados, não sendo eficiente para prever a performance dos híbridos.