

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

DAYANE MOLIN

DIVERSIDADE GENÉTICA EM MILHO CRIOULO ATRAVÉS DOS MARCADORES
MOLECULARES RAPD, MICROSSATÉLITE E AFLP

PONTA GROSSA

2012

DAYANE MOLIN

DIVERSIDADE GENÉTICA EM MILHO CRIOULO ATRAVÉS DOS MARCADORES
MOLECULARES RAPD, MICROSSATÉLITE E AFLP

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

PONTA GROSSA

2012

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

M722d Molin, Dayane
Diversidade genética em milho crioulo através dos marcadores moleculares RAPD, microssatélite e AFLP / Dayane Molin. Ponta Grossa, 2012.
102 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientador: Prof. Dr.Rodrigo Rodrigues Matiello

1. Variabilidade genética. 2. Variedades crioulas. 3. Polimorfismo.
4. Similaridade genética. I. Matiello, Rodrigo Rodrigues. II. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 10/2012

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **DAYANE MOLIN**.

Aos vinte e três do mês de fevereiro de dois mil e doze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **DAYANE MOLIN**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello (Orientador), Dr^a Maria Teresa Gomes Lopes e Dr. José Raulindo Gardingo. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Diversidade Genética em Milho Crioulo através dos Marcadores Moleculares RAPD, Microssatélite e AFLP**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de dois mil e doze.

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

Prof^a Dr^a Maria Teresa Gomes Lopes

Prof. Dr. José Raulindo Gardingo

Orientador
Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

Aos meus pais, Ana e Rudimar,
ao meu irmão Felipe e
ao meu namorado Inácio,
dedico esse trabalho, fruto do apoio.

Ao meu orientador Rodrigo,
ofereço esse trabalho, fruto do aprendizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e pela força nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, que não mediu esforços para a realização deste trabalho e pelos ensinamentos deixados para a vida profissional e pessoal.

Aos professores membros da banca de qualificação, Mara Cristina de Almeida e Marcelo Ricardo Vicari; e membros da banca de defesa, Maria Teresa Gomes Lopes e José Raulindo Gardingo, pela disponibilidade em contribuir na revisão deste trabalho.

Ao colega Ronaldo Neri Mendes de Oliveira pela coleta inicial dos dados de RAPD.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e a equipe dos laboratórios de Genética Molecular; Citogenética e Evolução; Defesa Fitossanitária; Análise de Solos; Nutrição de Plantas; Física de Solos e Dinâmica da Matéria Orgânica da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela infra-estrutura e disponibilidade oferecida para a realização deste estudo.

Às amigas, aos familiares e ao meu namorado em quem sempre encontrei alegria e descontração para olhar para o cotidiano de forma mais tranquila e divertida.

Aos colegas do Laboratório pelas conversas, conselhos, experiências trocadas e pela preciosa ajuda na condução dos experimentos. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Às instituições CAPES e Fundação Araucária pelo financiamento.

À funcionária Zoli da Secretaria de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pelo auxílio e bom atendimento.

A todos que participaram de forma direta ou indireta contribuindo para que o trabalho pudesse ser concluído.

Especialmente...

A minha família, meus pais Ana e Rudimar e meu irmão Felipe, que nunca mediram esforços para que eu nunca desistisse, sempre me incentivando. Grandes amigos que sempre têm palavras de apoio e amor.

Ao meu namorado Inácio, que não mediu esforços para me ajudar na realização do trabalho, sem sua ajuda seria muito mais difícil a conclusão do mesmo. Pelo incentivo incondicional, pela paciência, pelo companheirismo, por me ouvir em horas de tristeza e por me ajudar a buscar as melhores saídas.

RESUMO

A ampla variabilidade existente em milho deve-se às inúmeras variedades crioulas, genótipos importantes para o melhoramento, pois constituem fonte de variabilidade genética na prospecção de novos genes de interesse econômico. Os objetivos deste trabalho foram analisar a diversidade genética existente entre acessos de milho crioulo oriundos do Rio Grande do Sul e do Paraná a partir da análise do polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, microssatélite (SSR) e AFLP; realizar o agrupamento destes genótipos através das estimativas da similaridade genética e estabelecer possíveis relações entre a similaridade genética e os locais de coleta das variedades crioulas. As reações de PCR para cada marcador foram otimizadas através de protocolos específicos, sendo utilizados: 30 *primers* RAPD, 47 pares de *primers* SSR e 25 combinações de *primers* *EcoRI* + *MseI* para o marcador AFLP. Os fragmentos amplificados (RAPD e SSR) foram visualizados em gel de agarose a 2 e 3 %, respectivamente, através de corrida eletroforética horizontal por aproximadamente 4 h a 80 V. Os produtos da amplificação do AFLP foram resolvidos em gel de poliacrilamida (6 %) submetidos à corrida eletroforética vertical por 3 h e 30 minutos a 80 W (1500 V). A genotipagem das variedades de milho com o marcador RAPD amplificou 409 fragmentos com índice médio de polimorfismo de 81,9 %. O SSR gerou 134 fragmentos com 78,3 % de polimorfismo. Por outro lado, o AFLP amplificou 1889 fragmentos com índice médio de polimorfismo de apenas 40,3 %. Os fragmentos polimórficos foram submetidos às análises de similaridade genética através do coeficiente de Jaccard e de agrupamento pelo método UPGMA individualmente e conjuntamente para os marcadores. O coeficiente médio de similaridade foi de 57 % para o RAPD; 56 % para o SSR; 74 % para o AFLP e 69 % para a análise conjunta. Os dendogramas obtidos a partir do RAPD e SSR mostraram 8 grupos distintos, enquanto que o dendograma obtido a partir do AFLP e da análise conjunta formaram 6 e 7 grupos, respectivamente. De maneira geral, as correlações entre as matrizes de similaridade foram baixas, porém entre o AFLP e a análise conjunta foi de 96 %. Os resultados revelaram ampla variabilidade genética entre os acessos de milho crioulo. Os marcadores RAPD e SSR apresentaram os maiores índices médios de polimorfismo e o AFLP demonstrou maiores índices de similaridade genética entre os acessos crioulos. De maneira geral, os marcadores utilizados foram ferramentas eficientes para amostrar a diversidade genética e agrupar as variedades de acordo com os locais de coleta, embora possuam capacidade diferencial de revelar polimorfismo bem como para agrupar os acessos crioulos de milho.

Palavras-chave: Variabilidade genética. Variedades crioulas. Polimorfismo. Similaridade genética.

ABSTRACT

The wide variability in corn is due to the numerous landraces, important genotypes for breeding programs, because they constitute a source of genetic variability in the exploration of new genes of economic interest. The objectives were to analyze the genetic diversity between landraces from Rio Grande do Sul and Paraná through the analysis of polymorphism generated by RAPD, microsatellite (SSR) and AFLP markers; cluster these genotypes through estimates of genetic similarity and establish possible relationships between genetic similarity and the sampling sites of the landraces. PCR reactions for each marker were optimized through specific protocols being used: 30 RAPD *primers*, 47 SSR *primers* pairs and 25 combinations of *primers* for the *EcoRI* + *MseI* for the AFLP marker. The amplified fragments (RAPD and SSR) were visualized in agarose gel at 2 and 3 %, respectively, through horizontal electrophoresis run for approximately 4 h at 80 V. The AFLP amplification products were resolved on a polyacrylamide gel (6 %) submitted to a vertical electrophoresis run for 3 h 30 min at 80 W (1500 V). Genotyping of the varieties of corn with the RAPD marker amplified 409 fragments with a polymorphism average rate of 81.9 %. The SSR generated 134 fragments with 78.3 % of polymorphism. On the other hand, the AFLP amplified 1889 fragments with a polymorphism average rate of only 40.3 %. The polymorphic fragments were submitted to analysis of genetic similarity using the Jaccard coefficient and UPGMA clustering method individually and jointly for all markers. The coefficient mean of similarity was 57 % for RAPD, 56 % for SSR, 74 % for the AFLP and 69 % for the joint analysis. The dendrograms obtained from RAPD and SSR showed 8 different groups, while the dendrogram obtained from AFLP and the joint analysis formed six and seven groups, respectively. In general, the correlations between the similarity matrices were low, but between the AFLP and combined analysis was 96 %. Results revealed a wide genetic variability among landraces. The RAPD and SSR had the highest average rates of polymorphism and AFLP showed the highest rates of genetic similarity among landraces. In general, the markers used were effective tools for sampling the genetic diversity and cluster varieties according to the sampling sites, although they have differential capacity to reveal polymorphism as well as to cluster the landraces.

Keywords: Genetic variability. Landraces. Polymorphism. Genetic similarity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Amostras de DNA genômico de 19 variedades crioulas de milho. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2012.	40
Figura 2 -	Gel de agarose 2 % mostrando fragmentos de DNA amplificados através do <i>primer</i> RAPD “OPY - 10”. Poços de nº 1 a 48 referem-se às 48 variedades crioulas de milho. As setas indicam fragmentos polimórficos entre as variedades crioulas. M: marcador molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2012.	73
Figura 3 -	Gel de agarose 3 % mostrando os fragmentos monomórficos e polimórficos através do <i>primer</i> SSR Umc 1519. Os poços de nº 1 a 48 referem-se às 48 variedades crioulas de milho. M: marcador molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2012.	74
Figura 4 -	Gel de poliacrilamida 6 % mostrando os fragmentos monomórficos (seta maior) e polimórficos (seta menor) através da combinação de <i>primers</i> E-AGA/M-CAC. Os poços de nº 1 a 48 referem-se às 48 variedades crioulas de milho. M: marcador molecular de 50 pb. Ponta Grossa, 2012.	75
Figura 5 -	Dendograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através do marcador RAPD. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 8 grupos distintos (A – H) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.	76
Figura 6 -	Dendograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através do marcador SSR. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 8 grupos distintos (A – H) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.	77
Figura 7 -	Dendograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através do marcador AFLP. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 6 grupos distintos (A – F) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.	78
Figura 8 -	Dendograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através dos marcadores RAPD, SSR e AFLP. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 7 grupos distintos (A – G) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das variedades crioulas de milho utilizadas na análise molecular e os respectivos locais de coleta. Ponta Grossa, 2012.	38
Tabela 2 -	Relação dos <i>primers</i> RAPD`s analisados, sequência de oligonucleotídeos, temperatura de anelamento recomendada, temperatura otimizada e diferença de temperatura. Ponta Grossa, 2012.	41
Tabela 3 -	Relação dos programas de PCR para o marcador microsatélite com os respectivos passos, temperaturas e número de ciclos na reação. Ponta Grossa, 2012.	44
Tabela 4 -	Relação dos 47 pares de <i>primers</i> microsatélites, localização (grupo/bin), motivo repetido e programa otimizado. Ponta Grossa, 2012.	46
Tabela 5 -	Representação das 25 combinações de <i>primers</i> <i>EcoRI</i> + <i>MseI</i> utilizadas na genotipagem das 48 variedades de milho crioulo. Ponta Grossa, 2012.	48
Tabela 6 -	Relação dos <i>primers</i> RAPD`s, número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por <i>primer</i> . Ponta Grossa, 2012.	68
Tabela 7 -	Relação dos <i>primers</i> microsatélites, número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por <i>primer</i> . Ponta Grossa, 2012.	69
Tabela 8 -	Relação das combinações de <i>primers</i> AFLP`s <i>EcoRI</i> (E) + <i>MseI</i> (M), número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por <i>primer</i> . Ponta Grossa, 2012.	70
Tabela 9 -	Valores mínimos, máximos, amplitude e média da similaridade genética obtida através dos marcadores RAPD, SSR, AFLP e da análise conjunta. Ponta Grossa, 2012.	71
Tabela 10 -	Valores de correlação entre as matrizes de similaridade genética dos marcadores RAPD, SSR, AFLP e análise conjunta. Ponta Grossa, 2012.	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DO MILHO	14
1.2	VARIETADES CRIOLAS DE MILHO	18
1.3	DISTRIBUIÇÃO, VARIABILIDADE E MELHORAMENTO GENÉTICO	19
1.4	MARCADORES MOLECULARES	22
1.4.1	Marcador RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	25
1.4.2	Marcador microssatélite ou SSR (<i>Simple Sequence Repeats</i>)	29
1.4.3	Marcador AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	33
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAL VEGETAL	38
3.2	METODOLOGIAS	39
3.2.1	Extração do DNA genômico	39
3.2.2	Marcador molecular RAPD	40
3.2.2.1	Otimização da temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	40
3.2.2.2	Genotipagem das variedades crioulas de milho	42
3.2.3	Marcador molecular microssatélite (SSR)	42
3.2.3.1	Otimização da reação de PCR	43
3.2.3.2	Genotipagem das variedades crioulas de milho	44
3.2.4	Marcador molecular AFLP	47
3.2.5	Análise dos dados	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Estudo da diversidade genética em germoplasma de milho crioulo através de marcadores moleculares	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	APÊNDICE A – Tabela 11 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador RAPD, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.	95
	APÊNDICE B – Tabela 12 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador SSR, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.	97

APÊNDICE C - Tabela 13 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador AFLP, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012. 99

APÊNDICE D – Tabela 14 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através dos marcadores RAPD, SSR e AFLP, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012. 101

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L. subsp. *mays*) é considerado a principal espécie vegetal domesticada na América, aparecendo nos registros arqueológicos na América Central por volta de 7.500 anos A.P. e mais tarde na América do Sul, na costa do Peru, em torno de 4.500 anos A.P. (GOLOUBINOFF; PÄÄBO; WILSON, 1993). Originado a partir de uma ou mais espécies de teosinto (*Zea mays* subsp. *parviglumis* e *Zea mays* subsp. *mexicana*), representa uma das espécies domesticadas mais utilizadas na agricultura atualmente (FREITAS, 2002).

Devido à elevada diversidade genética, o milho pode ser adaptado aos mais diversos ambientes, desde a latitude 58° N até 40° S, sendo cultivado desde o nível do mar até 3.800 m de altitude (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1988). É a espécie vegetal mais estudada geneticamente, devido ao tamanho, a morfologia e ao pequeno número de cromossomos ($2n=20$) e a ampla variabilidade genética representada por um grande número de raças, populações, cultivares melhoradas e linhagens. Além disso, a importância econômica, o tipo de reprodução, a facilidade para realizar polinizações manuais e a possibilidade de gerar diferentes tipos de progênies são fatores que contribuíram muito para tornar este cereal um modelo para as espécies alógamas (NASS; PATERNIANI, 2000).

O milho é extensivamente utilizado na alimentação humana e animal, bem como para a produção de biocombustível (MACKAY, 2009). O principal destino deste cereal está no arraçãoamento de animais, principalmente suínos, bovinos e aves devido ao alto valor energético e digestibilidade. Na alimentação humana pode ser consumido *in natura* como milho verde, ou na forma de massas, farinha, biscoitos, pães, dentre outros. Na indústria, destaca-se como importante matéria-prima na obtenção de vários produtos como vinagre, óleo, álcool, dextrinas, geléias, gomas de mascar, margarinas, sorvetes, produtos químicos, corantes, bebidas, papéis, colas, cosméticos, xaropes, antibióticos e explosivos. Estima-se que o milho participe como matéria-prima de aproximadamente 600 produtos (PINAZZA, 1993).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, o sistema mais usado no cultivo nas grandes áreas é o Plantio Direto e o plantio convencional com maior frequência em novas áreas agrícolas ou naquelas estabelecidas com pastagens. O sistema convencional ainda predomina entre os pequenos produtores, embora seja crescente a adoção do Plantio Direto. A área total cultivada com milho, resultante da soma da primeira com a segunda safra 2010/11, chegou a 14 milhões de hectares, representando crescimento de 6,5 % em relação à safra anterior. Estimativas indicam que a produção brasileira, esperada para esta safra seja de 58

milhões de toneladas, das quais 36 e 22 milhões de toneladas para a 1ª e a 2ª safra, respectivamente (CONAB, 2011).

A coleção mundial de milho compreende cerca de 12.000 acessos representados em 256 raças, com cerca de 30 em processo de extinção (MACHADO; PATERNIANI, 1998). Estima-se que somente 2 % do germoplasma seja utilizado nos programas de melhoramento. Estudos indicam que uma importante fração é cultivada/conservada por pequenos agricultores, sendo que a maioria da variabilidade genética (dentro e entre as raças) é mantida pelo sistema agrícola familiar tradicional (MARSHALL, 1997).

De acordo com Nass e Paterniani (2000), no Brasil são usados apenas 14 % dos acessos do germoplasma do milho. As principais causas da baixa utilização dos acessos disponíveis nos bancos de germoplasma estão na falta de descrição adequada das coleções, ausência de informações sobre as características de cada acesso, bem como na falta da determinação precisa da diversidade genética, através da caracterização morfológica e molecular (PATERNIANI; NASS; SANTOS, 2000).

A erosão genética e a destruição dos ambientes pela agricultura moderna são fatores que aumentaram a importância da caracterização do germoplasma vegetal. A principal razão para a aceleração da erosão genética foi a substituição das raças crioulas por um pequeno número de genótipos melhorados. A produção de grãos brasileira está baseada em poucos híbridos e o germoplasma utilizado de milho é representado por 3.800 acessos dos quais: 288 são genótipos introduzidos, 222 são populações com algum melhoramento genético e 1.783 acessos oriundos de diferentes regiões agrícolas do país (ABADIE et al., 2000). Portanto, é importante caracterizar e conservar os recursos genéticos visando estabelecer estratégias que assegurem a manutenção da variabilidade genética tão essencial aos programas de melhoramento vegetal.

Atualmente, muitas técnicas da biologia molecular estão disponíveis para detecção dos polimorfismos genéticos das espécies. Essas técnicas permitem que praticamente um número ilimitado de marcadores moleculares possa prospectar grande parte do genoma do organismo em estudo. Portanto, as limitações associadas com dados de *pedigree* e marcadores morfológicos, fisiológicos e citológicos para a avaliação da diversidade genética em espécies vegetais vêm sendo contornadas pelo desenvolvimento de marcadores moleculares. Como exemplo, pode-se citar: Polimorfismos de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP; BOTSTEIN et al., 1980), Polimorfismos de DNA por Amplificação Aleatória (RAPD;

WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP; ZABEAU; VOS, 1993) e Sequências Simples Repetidas (SSR; LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989). Porém, esses marcadores moleculares têm diferenças inerentes como: custo, rapidez, quantidade de DNA necessário, grau de polimorfismo, precisão da estimativa das distâncias genéticas e influência nos testes estatísticos utilizados (GARCIA et al., 2004).

O AFLP se destaca por apresentar maior custo, tempo e consistência para obtenção dos resultados, seguido do SSR e do RAPD. Além disso, o AFLP exige maiores quantidades de DNA molde, além da necessidade de alta pureza e qualidade em comparação aos outros dois marcadores, que necessitam de pequenas quantidades de DNA. Por outro lado, o RAPD e o SSR se caracterizam pela maior facilidade de implementação. Em relação ao nível de polimorfismo, o RAPD apresenta níveis variáveis (médio a alto), ao contrário dos SSR's e AFLP's que se destacam por apresentarem altos níveis de polimorfismo, variando conforme a espécie analisada (LOPES et al., 2003; MILACB, 1998; PINTO et al., 2001).

1.1 ORIGEM E DOMESTICAÇÃO DO MILHO

Este cereal caracteriza-se por uma complexa e extensa história evolutiva e pela adaptação a uma ampla variabilidade de ambientes. O milho, o teosinto e o *Tripsacum*, gêneros do Novo Mundo, pertencem à tribo Maydeae e possuem um histórico evolutivo e taxonômico bastante conturbado (NETO et al., 2008).

Taxonomicamente é identificado como *Zea mays* L. subsp. *mays*, com idade média estimada de 11 milhões de anos. Sendo considerado um poliplóide antigo e com origem ainda não completamente elucidada, várias hipóteses têm sido descritas na literatura. A mais aceita é que o genitor do milho seria *Zea mays* subsp. *mexicana* ou *Zea mays* subsp. *parviglumis*, ambos teosintos (GALINAT, 1992; PATERNIANI; CAMPOS, 1999; WHITE; DOEBLEY, 1998). Estas espécies apresentam caracteres em comum, como o mesmo número de cromossomos ($2n=20$) e são capazes de cruzar com o milho resultando em descendentes férteis na geração F₁. Adicionalmente, existem fortes evidências genéticas e citogenéticas da origem. Avaliações genéticas têm mostrado que o loco *tb1* do milho é o responsável pelas maiores diferenças morfológicas entre o milho e o teosinto, visto que, no processo evolutivo do milho, essas mudanças ocorreram por meio de pequenas alterações nesse loco (DOEBLEY; STEC, 1991). Evidências citogenéticas como os *Knobs* cromossômicos e os cromossomos B também podem correlacioná-los à origem do milho. Como exemplo,

pesquisas indicaram que espigas macias e flexíveis estavam associadas com baixo número de *Knobs*, refletindo baixo número de introgressões de teosinto. Ainda, o teosinto tem fornecido genes de resistência à doenças e várias outras características agrônômicas de interesse para o melhoramento da cultura (COHEN; GALINAT, 1984; REEVES, 1950).

Apesar das várias hipóteses descritas, talvez nunca seja possível afirmar a partir de qual espécie o milho evoluiu, porque, possivelmente, seus genitores estejam extintos, ou após a domesticação pode ter se diferenciado tanto a ponto de não ser possível estabelecer nenhuma relação direta de ancestralidade com outra espécie. Entretanto, pode-se afirmar que a espécie mais relacionada ao milho é a *Z. mays* subsp. *parviglumis* (MATSUOKA et al., 2002).

A domesticação do milho possivelmente ocorreu entre 7 – 10 mil anos atrás (DOEBLEY; BACIGALUPO; STEC, 1994; WHITE; DOEBLEY, 1998) por americanos nativos que, por intensa seleção, tornaram este cereal a principal cultura agrícola de importantes civilizações como os Astecas, Maias e Incas (GALINAT, 1992; MACHADO; PATERNIANI, 1998; PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Além disso, tornou-se a espécie vegetal com maior grau de domesticação que, de tão alto, não sobreviveria mais sem a ação do homem.

Durante este período, muitas culturas e animais foram domesticados múltiplas vezes independentemente, incluindo o arroz, o feijão, o milheto, o algodão, a abóbora e animais como: bovinos, ovinos e caprinos. Da mesma forma, o milho tem sido considerado um produto de múltiplas domesticações independentes a partir do progenitor selvagem (teosinto) devido a notável diversidade genética e morfológica. Por exemplo, Galinat (1988) baseou-se na diversidade das formas da espiga em milho e concluiu que os tipos ancestrais distintos de teosinto anual, em diferentes regiões do México, foram o ponto de partida para pelo menos duas domesticações independentes deste cereal. Por outro lado, Kato (1984) inferiu que as domesticações múltiplas haviam ocorrido independentemente em muitas regiões do México baseado na diversidade dos padrões *knob* dos cromossomos entre os teosintos anuais e as atuais raças de milho.

Matsuoka et al. (2002) determinaram a central de drenagem do rio Balsas (México) como o possível local para a domesticação do milho. Os dados moleculares foram bastante consistentes com aqueles de 6.250 A.P. para o fóssil mais velho (PIPERNO; FLANNEURY, 2001) bem como pelas estimativas arqueológicas que a domesticação deste cereal no México

provavelmente não antecedeu 10 mil A.P. (SMITH, 1998). A análise filogenética indicou que todos os tipos de milho foram derivados a partir da subespécie *parviglumis* via processo de domesticação única e que depois desse evento inicial, a introgressão por outros tipos de teosintos pode ter contribuído para a formação do *pool* gênico, a qual explicaria a notável diversidade genética e fenotípica observada nesta espécie. A subespécie *mexicana* adaptou-se como planta daninha em muitos campos de milho das terras altas (> 1.700 m) do México Central e do Norte, onde formou híbridos frequentes com milho, contribuindo com a diversidade. Por outro lado, a subespécie *parviglumis* é nativa das terras baixas (< 1.800 m) e raramente hibridiza com o milho. Neste sentido, as evidências sugerem que este cereal diversificou-se primeiro nas terras altas e depois migrou para as terras baixas do México.

O milho é uma das espécies mais adequadas para entender o sistema genético vegetal, pois caracteriza-se pela elevada importância agrícola e uma longa história como modelo em vegetais. Após sua domesticação, dispersou-se por toda a América e, como resultado, observa-se a presença de raças crioulas em diferentes regiões geográficas no mundo (GOODMAN; BROWN, 1988). Entretanto, a maioria destas raças tem contribuído pouco para os modernos programas de melhoramento da cultura (TENAILLON et al., 2001).

Para entender a diversificação e os padrões de migração através das Américas, a morfologia dos acessos tem sido estudada extensivamente. A adição de pesquisas genéticas como, por exemplo, resultados citológicos (McCLINTOCK; KATO; BLUMENSCHNEIN, 1981) e isoenzimáticos (BRETTEING; GOODMAN; STUBER, 1990; DOEBLEY; GOODMAN; STUBER, 1986) têm refinado a classificação e as teorias da evolução deste cereal. Visando entender a migração e a domesticação pelos primeiros agricultores, a variação genética tem sido de particular interesse na avaliação do parentesco genético entre raças de milho. Adicionalmente, essas análises têm por objetivo classificar os espécimes arqueológicos bem como conservar os recursos genéticos para o melhoramento de plantas (MOELLER; SHAAL, 1999).

A domesticação das principais espécies agrícolas foi realizada através da seleção artificial para as características que melhoraram as qualidades agronômicas. Como resultado desse processo, houve a fixação dos alelos favoráveis nos *loci* que controlam as características agronômicas. Após a domesticação inicial, a prática continuada de seleção permitiu que alelos favoráveis adicionais fossem dissipados através das espécies cultivadas. Por outro lado, a diversificação da seleção em resposta aos diferentes ambientes, durante a expansão geográfica

das culturas, levou à fixação regional de alelos favoráveis. Em meio a esta complexa história de seleção, apenas uma porção limitada da população contribuiu para a formação da geração subsequente. Em função disto, algumas consequências foram observadas: i) perda de diversidade nos alelos não selecionados devido ao efeito genético gargalo de garrafa; ii) redução severa na variabilidade dos genes sob seleção direcional durante a domesticação e iii) alta divergência nos alelos sob efeito da seleção (VIGOUROUX et al., 2005).

Os principais fatores que influenciam a quantidade e a distribuição da variação genética nos genomas das culturas, em comparação aos genitores selvagens, são a seleção alvo em genes de interesse agrônômico e a deriva genética devido ao efeito gargalo de garrafa gerado pela domesticação que afetam o genoma como um todo. Estudos com isoenzimas e sequências gênicas revelaram que a variação genética nas culturas é reduzida como resultado do efeito gargalo de garrafa gerado pela domesticação (DOEBLEY; BACIGALUPO; STEC, 1994). Entretanto, esses estudos envolveram poucos *loci* e, desta forma, a generalização destes resultados precisariam ser confirmados com outras análises (VIGOUROUX et al., 2005).

Através da seleção artificial, os genótipos primitivos de milho adquiriram independentemente características desejáveis como rendimento de grãos, cor e finalidade alimentar. Os resultados desta intensa seleção para várias características levaram à grande diversidade morfológica raramente vista em outra espécie vegetal (DOEBLEY, 1994). Em particular, a variabilidade na morfologia da espiga do milho é ampla, não só entre regiões geográficas, mas também entre os genótipos, tornando a classificação mais difícil (CUTLER; BLAKE, 1973). Algumas hipóteses sobre a migração e a evolução das variedades de milho foram levantadas a partir de análises morfológicas comparando os caracteres da espiga. Embora se conheça a base genética das características fenotípicas, as mesmas são altamente variáveis e não são as mais apropriadas para a reconstrução do parentesco genético (DOEBLEY; ILTIS, 1980).

O grau de parentesco obtido através de marcadores genéticos pode fornecer informações importantes para a organização da coleção de sementes nos bancos de germoplasma. Além disto, a caracterização morfológica e molecular da variabilidade genética observada nos diversos acessos de milho possibilitaria obter uma estimativa mais precisa do parentesco genético entre os acessos, sendo vital para os programas de melhoramento genético desta cultura.

1.2 VARIEDADES CRIOULAS DE MILHO

Desde que a agricultura se iniciou há mais de dez mil anos, a ação direta de sucessivas gerações de seleção por agricultores familiares tem melhorado as variedades de milho crioulo, por meio do cruzamento de genótipos antigos e até mesmo recentes, ou simplesmente pela seleção intrapopulacional de plantas mais adaptadas. Algumas destas variedades destacam-se por apresentar elevada variabilidade genética e adaptação a ambientes rústicos de cultivo, com deficiência hídrica, escassez de nutrientes, excesso de acidez ou alcalinidade (LOUETTE et al., 1997; PATERNIANI; NASS; SANTOS, 2000; WEID; DANTAS, 1998). Ceccarelli (1996) mostrou ser possível o aumento da produção de grãos com baixa utilização de insumos e em condições climáticas marginais, utilizando germoplasma adaptado para estes ambientes. Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de adaptação e produção destas variedades crioulas em ambientes pouco favoráveis ao cultivo (BISOGNIN et al., 1997; SPANER et al., 1995, 1997).

Estudos indicam que na maioria das vezes as variedades crioulas adaptaram-se bem às condições ambientais, aos sistemas de cultivo e às preferências culturais específicas. Essas variedades exercem papel fundamental no desenvolvimento de sistemas agroecológicos, porque normalmente precisam pouco ou nenhum aporte de insumos químicos já que são adaptadas aos estresses ambientais locais a que foram submetidas durante longos períodos evolutivos. Por isso, mesmo em condições ambientais adversas, são capazes de manter produções satisfatórias. Além de produtivas nestes locais, ajustam-se bem aos sistemas de policultivo e podem ser facilmente multiplicadas pelos agricultores familiares, tornando-se desnecessária a aquisição anual de sementes no mercado (CORREA; WEID, 2006).

Além das variedades crioulas serem importantes economicamente para a agricultura familiar, têm sido amplamente e independentemente cultivadas em todas as regiões do Brasil, resultando em diferentes acessos adaptados para diversos ambientes e características morfológicas. Além disso, análises genéticas confirmam que o milho é altamente variável tanto dentro como entre as diferentes populações. Estudos baseados nas sequências de DNA geralmente confirmam essa alta variabilidade e indicam que a distribuição do polimorfismo do milho é consistente com o modelo da evolução molecular neutra, que sugere que esta é principalmente devido à deriva neutra. Sob esse aspecto, as mutações que surgiram na evolução foram seletivamente neutras em relação aos genes que elas substituíram (HILTON;

GAUT, 1998; RIDLEY, 2006). No entanto, alguns *loci* têm baixa variação genética como consequência direta da seleção artificial (WANG et al., 1999).

Nas últimas décadas a agricultura moderna priorizou a uniformidade e a busca por genótipos altamente produtivos nos ambientes de cultivo. Neste sentido, paulatinamente têm-se observado a substituição das variedades crioulas de milho por genótipos híbridos altamente responsivos a melhoria dos ambientes. Porém, a diversidade genética, encontrada nas variedades crioulas, desempenha papel fundamental para o contínuo progresso dos programas de melhoramento desta cultura, por constituírem fontes de genes de interesse agrônômico ainda pouco conhecidos ou caracterizados (YAO et al., 2007a).

A maioria dos estudos com milho crioulo refere-se a ensaios de competição e caracterização (BONOMO et al., 2000; MENEGUETTI et al., 2002), os quais têm revelado o rendimento de grão das variedades crioulas semelhante ou superior às variedades comerciais e híbridos, principalmente em condições rústicas de cultivo. Bernal et al. (1996), Spaner et al. (1997) e Camolesi (2002) estimaram os ganhos genéticos com a seleção recorrente intrapopulacional de variedades crioulas, onde os valores variaram de 221 a 903 kg ha⁻¹ por ciclo de seleção. Camolesi (2002) obteve produtividade média de 7.688 kg ha⁻¹ com a variedade crioula Palha Roxa, quando cultivada em sistema de agricultura familiar.

Calderón et al. (1999) através de cruzamentos entre variedades crioulas e híbridos comerciais de milho demonstraram que alguns cruzamentos chegaram a produzir até 1.156 kg ha⁻¹ a mais que os híbridos comerciais. Entretanto, poucos são os trabalhos na literatura visando avaliar o potencial das variedades crioulas de milho em esquemas de cruzamentos (FERREIRA; MOREIRA; HIDALGO, 2009).

1.3 DISTRIBUIÇÃO, VARIABILIDADE E MELHORAMENTO GENÉTICO

O conhecimento da diversidade genética permite que a variabilidade existente no germoplasma seja organizada. Assim, a organização auxilia na seleção de genitores para as características desejadas e na predição dos ganhos genéticos. Além disso, pode auxiliar nas questões relacionadas com a proteção de cultivares (FORD; TAYLOR, 1997) bem como assegurar a marca registrada e os direitos de propriedade (COOMBS; FRANK; SOUCHES, 2004).

A alta capacidade de adaptação aos ambientes está diretamente relacionada com a variação genética, bem como aos diferentes caracteres selecionados pelo homem. Segundo

Paterniani e Goodman (1977), cerca de 50 % das raças descritas são adaptadas às baixas altitudes (até 1000 m), 10 % às altitudes intermediárias (1000 a 2000 m) e 40 % desenvolvem-se melhor em altitudes superiores a 2000 m. De acordo com o tipo de endosperma, as raças são divididas em: amiláceas (40 %), duras ou *flint* (30 %), dentadas (20 %), tipo pipoca (7 %) e de milho doce (3 %) (NASS; SANTOS; PATERNIANI, 2005).

Conforme Galinat (1992), o milho se diferenciou em mais de 300 raças desde a época que Cristóvão Colombo descobriu a América, sendo o mesmo responsável pela dispersão da espécie na Europa em 1493. As raças crioulas representam uma vasta gama do germoplasma e podem ser utilizadas no melhoramento deste cereal para melhorar as características de interesse agrônômico (YAO et al., 2007b). Possivelmente, os complexos raciais surgiram das hibridações ocorridas entre o germoplasma local e o americano (PATERNIANI, 1998). Além das hibridações, outras forças da evolução como a seleção, a mutação e a migração também tiveram papel central para a constituição das diferentes raças e a maioria delas descende, provavelmente, daquelas cultivadas pelas tribos indígenas durante muitos anos após a domesticação do milho (PATERNIANI; GOODMAN, 1977).

De acordo com Vilela-Morales e Valois (2000) os acessos de germoplasma atendem à necessidade do desenvolvimento da agricultura sustentável porque são fonte de variabilidade que podem levar a melhorias genéticas, maior plasticidade ecológica e resistência a estresses bióticos e abióticos. Além disso, a caracterização genética é essencial para a conservação do germoplasma além de permitir a estimativa do parentesco genético e dos índices de diversidade (BHAT; JARRET, 1995). O conhecimento da quantidade e da distribuição da variação genética proporciona um guia para prever características que são essenciais para o melhoramento deste cereal como a ação gênica, os padrões de herança, a variabilidade e o nível de heterose (DUAN et al., 2006).

Os melhoristas têm procurado ampliar a variabilidade genética nos seus programas de melhoramento, principalmente após a catástrofe ocorrida em 1970 nos Estados Unidos da América, em função de uma epidemia causada pela ocorrência de *Bipolaris maydis*. A maneira usual para a ampliação da variabilidade genética tem sido o intercâmbio de linhagens elites entre os diferentes programas, embora o germoplasma existente nos centros de origem/diversificação e nos bancos de germoplasma ainda sejam pouco explorados (SPRAGUE, 1980).

Ao longo dos últimos anos têm-se percebido declínio na diversidade genética das variedades cultivadas. A seleção contínua estreitou a variação genética no germoplasma que leva à produção de híbridos. Com esta base restritiva, o germoplasma de milho pode não conter todos os alelos favoráveis e desejáveis para manter o progresso com a seleção artificial (YAO et al., 2007a). Consequentemente, as novas variedades desenvolvidas são geneticamente mais homogêneas e, portanto mais sensíveis a novas doenças e a condições ambientais adversas de cultivo (ASINS; CARBONELL, 1989).

Para aumentar a diversidade genética das cultivares é necessária a utilização de germoplasma mais diverso. Assim, genótipos mais distantes podem ser utilizados para criar combinações de genes favoráveis além de aumentar a probabilidade de obter híbridos com maior heterose (TABELI et al., 2009). Isto tem motivado a pesquisa por novas fontes de variação para serem usadas em programas de melhoramento, sendo que muitas organizações nacionais e internacionais têm destacado a necessidade da conservação e do uso das espécies silvestres relacionadas às espécies cultivadas (BROWN; BURDON; GRACE, 1990).

O estudo da diversidade genética é o processo pelo qual a variação entre as populações, entre os grupos ou entre os indivíduos é analisada por meio de um método específico ou de uma combinação de métodos. Os dados normalmente envolvem um número grande de mensurações baseadas em dados morfológicos, bioquímicos, citológicos e aqueles baseados em técnicas moleculares de DNA, permitindo uma diferenciação mais realista e fiel dos genótipos. A análise da diversidade genética pode gerar conhecimento sobre a dispersão de uma espécie bem como determinar locais para futuras coletas de germoplasma (PEREIRA; PEREIRA; COSTA, 2009).

As coleções de germoplasma mantidas pelas instituições públicas ou privadas conservam, além do germoplasma cultivado, um grande número de acessos que representam as raças locais, as espécies silvestres e as espécies invasoras relacionadas ao grupo cultivado. O uso desse germoplasma pelos melhoristas visa conhecer e transferir as características desejáveis para um conjunto de genótipos melhorados e adaptados (PEREIRA; PEREIRA; COSTA, 2009).

No passado, os melhoristas utilizavam apenas os dados da caracterização morfológica para conhecerem os genótipos existentes nas coleções. Com o advento dos marcadores moleculares, os pesquisadores têm uma poderosa ferramenta que permite: estimar a

diversidade genética existente na coleção; determinar as relações genéticas entre os genótipos e acompanhar a introgressão de genes específicos durante o processo de seleção.

1.4 MARCADORES MOLECULARES

A diversidade genética em plantas tem sido avaliada mais eficientemente depois da introdução de métodos que revelam polimorfismos diretamente ao nível bioquímico e de DNA. Consequentemente se obtém uma estimativa mais precisa quando baseada numa grande quantidade de informações sobre a diversidade genética dos genótipos disponíveis para o melhoramento (BRUEL et al., 2007; CARVALHO et al., 2004). Vários estudos têm demonstrado a diversidade genética ou o parentesco de linhagens de milho ao nível molecular (BORNET; BRANCHARD, 2001; SENIOR et al., 1998).

As variações na sequência do DNA têm sido usadas como marcador molecular em plantas e animais durante as últimas duas décadas (KORZUN, 2003). A utilização desta tecnologia no gerenciamento do germoplasma pode facilitar a introgressão da variabilidade presente nos acessos silvestres através da caracterização da diversidade genética e das relações filogenéticas entre os genótipos (BORÉM, 2009).

Os marcadores moleculares são eficientes nas avaliações de germoplasma por diferenciarem cultivares, para *screening* de genes e para a construção de um subconjunto representativo da coleção núcleo (XU et al., 2003). A alta resolução e confiabilidade na identificação das cultivares os tornaram ferramentas importantes nos estudos de diversidade genética (BERED et al., 2005), os quais podem caracterizar eficientemente a matéria-prima dos programas de melhoramento.

Aliados às técnicas da engenharia genética e do sequenciamento de genomas, os marcadores moleculares são ferramentas auxiliares ao melhoramento de plantas. A utilização destas metodologias tem permitido melhorar a eficiência no processo seletivo principalmente para características com forte influência ambiental. De maneira geral, são eficazes, precisos e com custos mais reduzidos quando comparados à seleção baseada apenas na fenotipagem dos indivíduos ao longo dos ciclos de seleção a campo (BORÉM, 2009). Destacam-se em relação aos morfológicos por: detectar número ilimitado de marcadores, não variar entre os tipos de tecidos ou estádios de desenvolvimento, não apresentar interações com o ambiente e normalmente resultar em bom número de *loci* polimórficos (NEALE et al., 1992).

A caracterização morfológica, a análise de *pedigree*, as estimativas de heterose e a detecção da variação ao nível de DNA através de marcadores moleculares são algumas das diferentes metodologias usadas para caracterizar a diversidade genética no germoplasma de milho. Ainda pode ser estimada através da capacidade específica de combinação dos genótipos, manifestada em uma série de cruzamentos entre variedades e híbridos (MELO et al., 2001).

A análise através dos marcadores moleculares pode definir precisamente o *fingerprint* de qualquer organismo e no caso das plantas tornou-se importante ferramenta nos programas de retrocruzamentos, por acelerar e facilitar a recuperação do genótipo recorrente e garantir que um número maior de indivíduos com os genes de interesse sejam selecionados (SALLA, 2002). Exercem uma importante função no mapeamento cromossômico, na identificação e clonagem de genes, no desenvolvimento de novas cultivares, permitindo o conhecimento da variabilidade genética em níveis intra e interespecíficos (GOTMISKY; KOKAEVA; BOBROVA, 1999; WILLIAMS et al., 1993). Além disso, têm sido usados para determinar novos grupos heteróticos e/ou alocar genótipos em grupos heteróticos pré-existent.

A caracterização molecular em milho é um método eficiente para aplicação em larga escala. Os resultados desta caracterização possibilitam posicionar as linhagens e populações nos respectivos grupos heteróticos, além de refinar os principais subconjuntos formados pela avaliação a campo auxiliando na organização das coleções e ainda permitindo uma melhor compreensão da evolução das principais raças de milho (WARBURTON et al., 2002). O *fingerprinting* molecular apresenta vantagens sob a caracterização morfológica porque complementa as medidas fenotípicas, quantifica as mudanças genéticas e realça as variações no DNA as quais podem não ser fenotipicamente expressas (SHEHATA; AL-GHETHAR; AL-HOMAIDAN, 2009).

De maneira geral, as técnicas baseadas no DNA são utilizadas na caracterização e discriminação dos genótipos e na identificação de marcadores associados a características de interesse agrônomo (SILVA, 1999). Permitem identificar regiões genômicas associadas à herança poligênica através do mapeamento de QTL's (*quantitative trait loci*) as quais servem para localizar genes de interesse, facilitar a seleção assistida por marcadores e a clonagem baseada em mapa, além de possibilitar o entendimento da base biológica de características muito complexas. Ao contrário dos marcadores morfológicos, o nível de polimorfismo dos

marcadores moleculares geralmente é alto para cada *locus* estudado (KONGKIATNGAM; WATERWAY; FORTIN, 1995).

Vários tipos de marcadores de DNA estão disponíveis atualmente, diferenciando-os quanto à habilidade na detecção do polimorfismo, ao custo da aplicação, à facilidade de uso e a consistência dos resultados (BORÉM, 2009). Para avaliar precisamente a diversidade genética a metodologia deve atender os seguintes critérios: barata e eficiente no tempo, gerar marcadores múltiplos e independentes, fornecer resolução adequada das diferenças genéticas, repetibilidade, necessidade de pouco DNA e pequeno conhecimento prévio do genoma do organismo. Neste sentido, não existe técnica molecular que atenda a todos esses critérios, o que se constata é que todas as técnicas relacionadas aos marcadores de DNA apresentam vantagens e algumas limitações relacionadas à sua plena utilização (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

A genotipagem através de marcadores que utilizam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido extensivamente usada para a análise da diversidade em muitas espécies cultivadas (CHANNAPPA et al., 2009). As técnicas como RFLP, microsatélite ou SSR, AFLP e RAPD dentre outras são as principais utilizadas na análise genética em plantas (ARAUJO et al., 2003). Ambas partem do princípio que diferenças entre as sequências de nucleotídeos que compõem as moléculas de DNA de cada indivíduo revelam um padrão único (*fingerprint*) que pode ser útil na identidade do indivíduo através do polimorfismo de fragmentos de DNA gerado nestes locais do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A literatura indica a existência de correlação positiva entre a divergência genética e a porcentagem de heterose (FALCONER; MAKAY, 1996). Por este motivo, as estimativas de divergência genética entre linhagens endogâmicas, por meio dos marcadores moleculares, contribuem para reduzir os esforços das polinizações manuais, possibilitando a obtenção de grupos heteróticos e direcionando os cruzamentos na tentativa de obter híbridos mais produtivos e com elevado vigor (LABORDA et al., 2005). Além disso, possibilitam a organização do germoplasma e uma amostragem mais eficiente dos genótipos que o compõem (NIENHUIS et al., 1993).

Os coeficientes de similaridade específicos para variáveis binárias são sugeridos em estudos de divergência baseados em marcadores dominantes (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999). O agrupamento dos genótipos a partir dos diferentes coeficientes depende do modo pelo qual a matriz de dados originais (1: presença e 0: ausência) é empregada na estimativa da

similaridade. Quando dois genótipos são comparados podem ocorrer as seguintes situações: $a=1,1$; $b=1,0$; $c=0,1$ e $d=0,0$. Assim, conforme os pesos atribuídos pelos diferentes coeficientes e o modo pelo qual são considerados, o agrupamento dos genótipos pode ser influenciado (EMYGDIO et al., 2003)

Meyer et al. (2004) a partir da genotipagem de linhagens de milho com os marcadores RAPD e AFLP visaram comparar diferentes coeficientes de similaridade e a influência dos mesmos nas análises de agrupamento. Os resultados indicaram que os coeficientes de Jaccard; Sorensen-Dice; Anderberg e Ochiai apresentaram índices semelhantes, possivelmente por desconsiderarem as co-ocorrências negativas (0-0) na análise. Da mesma forma, os coeficientes Simple-Matching; Rogers e Tanimoto e Ochiai II foram similares, provavelmente por considerarem as co-ocorrências negativas. Por outro lado, os coeficientes de Russel e Rao demonstraram índices muito divergentes dos demais, possivelmente devido às co-ocorrências negativas estarem no numerador ao invés do denominador da expressão. As co-ocorrências negativas não significam necessariamente que as regiões no DNA são idênticas, portanto o uso de coeficientes que não as incluem é sugerido. O coeficiente de Jaccard tem sido mais utilizado na literatura provavelmente pela maior facilidade na interpretação dos resultados.

Os métodos de agrupamento têm por finalidade separar um grupo original de observações em vários subgrupos, de forma a obter homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os subgrupos. Dentre estes métodos, os hierárquicos e os de otimização são empregados em grande escala pelos pesquisadores. Nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, sendo estabelecido um dendograma, sem a preocupação prévia do número ótimo de grupos. A forma mais conhecida e utilizada para representar a estrutura dos agrupamentos com base na distância entre pares de genótipos é através da média das distâncias entre todos os pares de genótipos analisados, denominado de método UPGMA (BERTAN et al., 2006).

1.4.1 Marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Novos sistemas de marcadores utilizados na avaliação da diversidade genética envolvendo grande número de indivíduos foram desenvolvidos a partir da amplificação de sequências de DNA baseada na PCR (SAIKI et al., 1988). O marcador RAPD (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990) baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de iniciadores (*primers*) que se anelam nos dois extremos opostos do DNA molde resultando em vários fragmentos com tamanhos diferenciados. Para esse conjunto de

fragmentos é possível determinar o polimorfismo da sequência de DNA, que pode ser usado como marcador genético (WILLIAMS et al., 1990). Nesta metodologia, utiliza-se apenas um único oligonucleotídeo de 10 bases (*primer*) com sequência aleatória, portanto, sua sequência alvo é completamente desconhecida no genoma em análise (ARAÚJO et al., 2003).

No milho, essa técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de diversidade genética pelo baixo custo e rapidez na obtenção de polimorfismos (HAHN et al., 1995; WU, 2000). Normalmente, são necessários poucos *primers* para se obter resultados com sequências complementares no genoma (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999). Além disso, o RAPD tem recebido atenção pela habilidade em detectar regiões no DNA que aparentemente evoluem mais rapidamente do que os *loci* isoenzimáticos (BARUFFI et al., 1995). Carvalho et al. (2004) estudaram a diversidade genética entre 79 variedades crioulas e duas variedades melhoradas de milho através de 32 *primers* RAPD. A genotipagem com este marcador amplificou 255 fragmentos, dos quais 184 (72,2 %) foram polimórficos. A similaridade genética entre as variedades de milho variou de 78 a 91 %. A análise de agrupamento pelo método UPGMA reuniu as variedades crioulas em dois grupos principais os quais estavam associados à cor das sementes.

Este marcador molecular tem recebido críticas porque a amplificação via PCR ocorre normalmente sob baixa seletividade, o que aumenta a chance de anelamento inespecífico gerando artefatos da PCR. A origem do polimorfismo não é bem compreendida devido à expressão dominante do marcador, ou seja, não é possível distinguir um indivíduo homozigoto de um heterozigoto para o alelo marcador, consequentemente no caso de homologia entre fragmentos estes não poderiam ser utilizados na reconstrução da filogenia (RIESENBERG, 1996). Além disto, os padrões de bandas não são confiáveis e reprodutíveis na maioria dos casos (JONES et al., 1997; PEREZ; ALBORNOZ; DOMINGUES, 1998).

Para minimizar a baixa repetibilidade dos fragmentos amplificados, alguns aspectos devem ser considerados: conhecimento prévio da composição do *primer*, otimização dos reagentes, adequação dos programas de PCR e cautela na execução do protocolo. Vários estudos têm destacado pontos que podem afetar o número de fragmentos amplificados bem como a intensidade dos produtos como: a concentração do cloreto de magnésio, concentração do *primer*, unidades da enzima *Taq* DNA polimerase e principalmente a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos (GOTMISKY; KOKAEVA; BOBROVA, 1999; WILLIAMS et al., 1993). Sob baixas temperaturas de anelamento (30 a 35 °C), duas

sequências de DNA complementares aos iniciadores aleatórios devem estar suficientemente adjacentes (< 4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela enzima. Ao utilizar ciclos rápidos de PCR e alterações na temperatura entre as etapas de anelamento e extensão, os fragmentos amplificados podem apresentar-se com baixa intensidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A literatura indica que as melhores concentrações para os iniciadores estão entre 0,1 a 2,0 mM. Em baixas concentrações os produtos de amplificação podem não ser detectados em gel de agarose e em altas concentrações as bandas ficam com aspecto de arraste (WILLIAMS, et al., 1993). Os pareamentos nucleotídicos do tipo GC (guanina-citosina) são mais estáveis que os AT (adenina-timina) afetando diretamente o tempo de permanência do iniciador no sítio de amplificação. Se este tempo for curto, a estabilização do pareamento do iniciador com o sítio de iniciação no DNA é prejudicado. Consequentemente, o segmento não será amplificado ou irá gerar um fragmento fraco no gel (ARAUJO et al., 2003). Por outro lado, o marcador RAPD pode apresentar maior confiabilidade quando são utilizados fragmentos consistentes entre duas extrações independentes de DNA (OLIVEIRA et al., 1996; YANG et al., 1996).

Apesar das limitações, os marcadores RAPD's continuam a ser plenamente utilizados porque muitos dos fragmentos são idênticos a nível intraespecífico e as estimativas da diversidade genética entre e dentro das populações são muito similares quando comparados a outros marcadores com expressão dominante como os AFLP e os *Inter Simple Sequence Repeats* - ISSR (NYBOM, 2004). Os RAPD's são usados para avaliar e caracterizar as variações genéticas existentes entre indivíduos de interesse, nem sempre relacionadas com diferenças fenotípicas (WILLIAMS et al., 1990). Este marcador tem sido amplamente utilizado para analisar a diversidade genética em várias espécies vegetais, populações naturais, gerações de segregação e coleções de germoplasma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

O conhecimento do polimorfismo gerado pelo RAPD pode ser aplicado para identificar e classificar diferentes cultivares através da similaridade genética (ARAUJO et al., 2003) e solucionar problemas em diferentes espécies de plantas, gerando informação útil à conservação e ao melhoramento genético.

Lanza et al. (1997) utilizaram este marcador na análise da similaridade genética entre linhagens endogâmicas de milho, separando-as em diferentes grupos heteróticos com o propósito de predizer os melhores cruzamentos para o desenvolvimento de híbridos. A análise de agrupamento dividiu os genótipos em 3 grupos principais. A distância genética foi correlacionada com importantes características agronômicas dos híbridos simples e com a heterose. Desse modo, os resultados mostraram que as distâncias genéticas estimadas através do marcador RAPD podem ser usadas para determinar grupos heteróticos entre as linhagens endogâmicas de milho oriundas de populações tropicais com ampla base genética.

Bruel et al. (2007) avaliaram a diversidade genética em 16 linhagens de milho usando 22 *primers* RAPD, os quais resultaram na amplificação de 265 fragmentos. Destes, 237 (84,4 %) apresentaram-se polimórficos. A distância genética média encontrada foi de 0,50. Através do método UPGMA, as linhagens foram agrupadas em 5 grupos heteróticos distintos. O procedimento *bootstrap* foi aplicado para verificar se a quantidade de fragmentos utilizados foi suficiente para assegurar a confiabilidade dos resultados. Esta análise revelou que com aproximadamente 130 fragmentos o coeficiente de variação estabilizou em 8,3 %, sugerindo que os 265 fragmentos utilizados foram suficientes para avaliar a diversidade genética entre as linhagens analisadas. O alto índice de polimorfismo revelado com o RAPD demonstrou eficiência para analisar a diversidade genética em linhagens e que a divergência genética poderia ser utilizada para estabelecer grupos heteróticos entre as linhagens de milho.

Da mesma forma, Moeller e Schaal (1999) avaliaram a diversidade genética entre coleções de milho crioulo através do RAPD. Este marcador revelou alto nível de polimorfismo entre os genótipos, com média de 70,7 % entre os *primers* genotipados. A análise de agrupamento foi eficiente na confirmação do parentesco e na identificação dos acessos classificados erroneamente. Entretanto, o dendograma não revelou uma forte correspondência entre o parentesco genético e a posição geográfica das coleções de milho. Neste sentido, os resultados confirmaram a hipótese que múltiplas introduções de milho resultaram em uma ampla variabilidade morfológica encontrada nos acessos da região.

Rinaldi et al. (2007) correlacionando heterose e divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho pipoca detectaram 250 fragmentos amplificados através de 26 *primers* RAPD. Desses, 189 foram polimórficos, resultando num polimorfismo médio de 75,6 %. Através do método *bootstrap* observaram uma estabilização do coeficiente de variação (5,2 %) das distâncias genéticas

entre os parentais, ou seja, os 250 fragmentos utilizados foram suficientes para a avaliação da divergência genética. Os resultados demonstraram correlações significativas entre a divergência genética e os caracteres massa de grãos, altura de planta, altura de espiga e prolificidade dos híbridos avaliados no dialelo em estudo. Entretanto, para capacidade de expansão, florescimento e heterose percentual não foram constatadas correlações significativas com a divergência genética estimada.

Esforços consideráveis têm sido feitos a fim de avaliar a eficácia do RAPD em comparação a outros marcadores, mediante a análise de correlação entre as matrizes de similaridade genética (HAHN et al., 1995). Entretanto, cautela é necessária quando se compara diferentes sistemas principalmente devido à natureza diferenciada do conteúdo de informação bem como aos diferentes graus de confiança para cada método sobre a saturação dos genomas (LANZA et al., 1997).

1.4.2 Marcador microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*)

O marcador microssatélite (LITT; LUTY, 1989; TAUTZ, 1989) se tornou popular primeiramente em estudos genéticos com mamíferos, e tem gerado um considerável interesse entre geneticistas de plantas. Nos últimos anos foram desenvolvidos para muitas espécies vegetais, incluindo o milho (SENIOR et al., 1996).

Os trechos de motivos repetidos em tandem no DNA podem ser di, tri ou tetra nucleotídeos como $(GA)_n$, $(ATT)_n$ ou $(ATGT)_n$, respectivamente (WEBER, 1990). Estão presentes nas regiões codantes e não codantes do genoma de eucariotos e procariotos (GUR-ARIE et al., 2000). São caracterizados pela grande abundância, alta variabilidade e ampla distribuição no genoma, com frequência de um a cada 50 mil pares de bases nos vegetais (MORGANTE; OLIVIERI, 1993).

Esses marcadores fornecem informação extremamente útil para os melhoristas no agrupamento de genótipos e para o planejamento dos cruzamentos (LU; BERNARDO, 2001). Têm sido utilizados para estudar a variabilidade genética baseada no polimorfismo do DNA em uma série de plantas cultivadas incluindo a soja, o trigo, o milho, o arroz, o sorgo e a cevada.

Atualmente existem diferentes estratégias para o desenvolvimento dos *primers* SSR's. O método que se destaca é o da biblioteca genômica enriquecida com hibridação seletiva, podendo ser isolados diretamente de bibliotecas de DNA genômico total ou de bibliotecas

enriquecidas por microssatélite específicos (BUDAK et al., 2003). A maior desvantagem desse marcador é o alto custo bem como o tempo e esforço necessário para o desenvolvimento dos *primers* (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Como consequência, a utilização pode ser prejudicada em estudos que necessitam de um grande número de *primers*.

No milho, o SSR é uma ferramenta valiosa para o mapeamento do genoma (TARAMINO; TINGEY, 1996), estudos de evolução (MATSUOKA; MITCHELL; KRESOVICH, 2002), genética da conservação (POWELL et al., 1995), proteção dos direitos de propriedade (KUBIK et al., 2001) e seleção assistida por marcadores (WEISING et al., 1998).

Legesse et al. (2007) estudaram a diversidade genética em linhagens endogâmicas de milho africanas através de 27 pares de *primers* SSR's, os quais amplificaram 104 fragmentos (3,85 fragmentos/*loci*). A média do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) encontrada foi de 58 %, demonstrando o potencial do SSR em detectar diferenças entre as linhagens. O agrupamento pelo método UPGMA formou 5 grupos entre as linhagens com bom ajuste da matriz de dados baseado no valor do coeficiente de correlação cofenética. Adicionalmente, os resultados da análise de agrupamento foram consistentes com a informação da ascendência e confirmaram o posicionamento da maioria das linhagens de acordo com a adaptação agroecológica às altas e médias altitudes.

Da mesma forma, Adeyemo et al. (2011) avaliaram a diversidade genética e o parentesco entre linhagens de milho de endosperma amarelo através de 87 *primers* SSR's. Destes, 75 foram polimórficos e produziram um total de 297 fragmentos (3,96 alelos/*locus*). O valor médio do PIC foi de 56 %. Embora este valor represente um baixo nível de polimorfismo, a análise de agrupamento separou as linhagens em 2 grupos bem definidos consistentes com os dados do *pedigree*.

Os microssatélites apresentam melhor poder de discriminação do que o marcador RFLP e podem revelar associações genéticas oriundas do *pedigree* das linhagens endogâmicas envolvidas (PEJIC et al., 1998). A tecnologia é dependente da reação de PCR e o polimorfismo entre os fragmentos amplificados pode ser detectado usando gel de agarose, considerado o sistema mais acessível e menos oneroso (BANTTE; PRASANNA, 2003).

No trabalho de Souza et al. (2008) os resultados indicaram que o RAPD foi eficiente para validar os dados de *pedigree*, enquanto o SSR para reconhecer as diferenças entre as

características quantitativas. Devido à dispersão aleatória dos marcadores no genoma, a seleção de um ou outro dependerá das características do material usado e dos objetivos do trabalho. O uso do RAPD é mais apropriado para o agrupamento de genótipos porque baseia-se na similaridade entre os indivíduos; enquanto os microssatélites, por apresentarem expressão codominante, são mais indicados para a identificação dos genótipos.

Os *loci* SSR são altamente mutáveis e podem estar presentes em muitas regiões no genoma (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; TAUTZ, 1989). São extremamente úteis em milho porque são amplamente dispersos nos cromossomos, além do elevado conteúdo de polimorfismo gerado (CHIN et al., 1996). Uma vez desenvolvidos, tornam-se baratos e são muito fáceis de manusear porque necessitam de pouca quantidade de DNA molde. A maior dificuldade encontrada é que os alelos dos microssatélites podem diferir por poucos ou por um par de bases, necessitando eletroforese em géis de alta resolução (poliacrilamida). Além disto, as condições da reação da PCR precisam ser otimizadas para cada *locus*, já que os pares de *primers* utilizados na amplificação variam tanto em tamanho como na composição dos nucleotídeos. Para contornar esse problema, Senior et al. (1996) propuseram um programa de PCR denominado “touchdown”, onde a temperatura de anelamento (T_{anneal}) do par de *primers* decresce gradualmente conforme a reação acontece. Na ausência de amplificação outras variáveis deverão ser otimizadas na metodologia como: concentração do *primer*, cloreto de magnésio e quantidade da enzima *Taq polimerase* (OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000).

Xiang et al. (2010) analisaram 22 variedades crioulas de milho através de 41 pares de *primers* SSR em géis de alta resolução (poliacrilamida) para determinar a diversidade genética. Os *primers* resultaram na amplificação média de 211 fragmentos polimórficos, com índice médio de polimorfismo de 74,2 %. O valor médio da distância genética encontrado foi de 0,16 com número efetivo de 1,5 alelos. O PIC variou de 52 a 93 %, com média de 78 %. As variedades crioulas de milho foram classificadas em 3 grupos de acordo com a origem. Do mesmo modo, Choukan et al. (2006) determinaram o nível de parentesco e grupos heteróticos em linhagens de milho com 46 *primers* SSR's, os quais amplificaram 225 fragmentos (4,9 alelos/*locus*). O valor médio de PIC foi de 54 %. A análise de agrupamento resultou em 4 grupos, os quais foram consistentes com a origem dos genótipos.

O milho foi uma das primeiras culturas usadas no desenvolvimento de *primers* SSR (CHIN et al., 1996). A literatura indica a existência de mais de 2.000 *primers* disponíveis

(WANG et al., 2007). O desenvolvimento em larga escala foi beneficiado pelos resultados obtidos com o Sequenciamento do Genoma do Milho e com o depósito de um grande número de sequências de DNA em bancos de dados (PARIDA et al., 2006). Nos últimos anos, alguns trabalhos têm destacado a importância de selecionar um conjunto universal de *primers* microssatélites visando à certificação de germoplasma, separação de grupos heteróticos, identidade genética e para a construção de um banco de dados de *fingerprinting* de DNA em milho (WANG et al., 2007).

Os microssatélites são informativos para o estudo do parentesco genético entre as espécies de plantas estreitamente relacionadas bem como entre as subpopulações de uma mesma espécie, principalmente por apresentarem expressão codominante, ou seja, é possível distinguir um indivíduo homozigoto de um heterozigoto para o alelo marcador (BOWCOCK et al., 1994). Destacam-se por superar as limitações associadas com os marcadores RFLP e RAPD. Em relação a outros marcadores de DNA, os microssatélites são mais abundantes, amplamente distribuídos no genoma, hipervariáveis na natureza e apresentam elevado conteúdo de informação (GUPTA et al., 1996).

Laborda et al. (2005) afirmam que este marcador tem melhor habilidade para explorar a diversidade genética, revelando alto polimorfismo e consequentemente amostrando maior porção da variabilidade genética. Wu e Tanksley (1993) afirmaram que a heterozigose (polimorfismo) dos *loci* SSR é de 7 a 10 vezes maior que a dos RFLP em muitas espécies vegetais. A aplicação deste marcador molecular em plantas depende da disponibilidade dos *loci* microssatélites, que têm sido desenvolvidos para algumas espécies vegetais como a soja, o arroz e o milho.

A utilização do SSR para a discriminação entre genótipos extremamente relacionados tem sido possível pelo padrão de expressão codominante dos alelos do marcador associado à detecção por metodologias automatizadas (AKKAYA; BHAGWAT; CREGAN, 1992). Estudos prévios indicam que a repetição do dinucleotídeo AT parece predominar no genoma das plantas (WU; TANSKLEY, 1993). Porém, outros sugerem que as repetições CT e/ou TG são frequentemente encontradas (CHIN et al., 1996). A literatura tem revelado que os SSR em plantas apresentam altos níveis de polimorfismo, com 26 alelos em soja (RONGWEN et al., 1995) e até 37 alelos por *locus* em cevada (SAGHAI-MAROOF et al., 1994).

Este marcador tem possibilitado a caracterização genética em fina escala das coleções de germoplasma. Por serem altamente polimórficos, fáceis de gerar, altamente repetitivos,

possibilidade de automatização e alta acurácia, constituem-se numa categoria muito útil em pesquisas de larga escala como na caracterização genética de recursos vegetais em bancos de germoplasma (HECKENBERGER et al., 2002).

1.4.3 Marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

O marcador molecular AFLP é baseado na amplificação via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da dupla digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição, que clivam o DNA em sítios específicos, de corte raro e de corte frequente (ZABEAU; VOS, 1993).

A maior vantagem associada ao AFLP é a capacidade multiplex, ou seja, elevado número de fragmentos polimórficos amostrados por gel, pequeno conjunto de *primers* utilizado e incipiente conhecimento prévio das sequências (MANK et al., 1999). Como resultado, tem revelado ampla aplicabilidade taxonômica principalmente para investigar a variação genética em grande variedade de microorganismos, plantas e animais (AJMONE-MARSAN et al., 2001; JANSSEN et al., 1996; TEREFEWORK; KAIJALAINEN; LINDSTROM, 2001).

O marcador AFLP não requer nenhuma pré-informação sobre a sequência nucleotídica sob investigação devido aos *primers* da reação de PCR serem baseados nas sequências obtidas pelo corte das enzimas de restrição e dos adaptadores universais aos quais são ligados. Esses marcadores representam uma poderosa ferramenta para a análise do DNA pela melhoria no *fingerprinting* e nos estudos de diversidade (POWELL et al., 1996), principalmente pelo alto polimorfismo e reprodutibilidade (JAMES; LESEMAN; DOWN, 2003).

As análises baseadas em AFLP têm sido empregadas para o mapeamento do genoma (ZIMNOCH-GUZOWSKA et al., 2000), análise de parentesco (GERBER et al., 2000), identificação de marcadores ligados a genes de resistência à doenças (CERVERA et al., 1996) e para comparação entre germoplasmas (PEJIC et al., 1998).

Legesse et al. (2008) estudaram as relações entre o desempenho híbrido e as distâncias genéticas obtidas através do marcador AFLP em linhagens endogâmicas de milho. Utilizaram 9 combinações de *primers* AFLP, as quais geraram um total de 601 fragmentos. Destes, 80,5 % foram polimórficos. O valor do PIC variou de 25 a 40 %, com distância genética média entre os genótipos de 0,59. A análise de agrupamento formou 5 grupos, de acordo com o

pedigree, indicando a eficácia deste marcador na análise da diversidade genética e na determinação dos grupos heteróticos.

Da mesma forma, Kiula; Lyimo e Botha (2008) avaliaram a associação entre as distâncias genéticas obtidas através do AFLP e o desempenho híbrido em linhagens de milho tropical. Foram utilizadas 5 combinações de *primers* as quais amplificaram 278 fragmentos (42 a 74 fragmentos/*primer*). Destes, 238 (82 %) foram polimórficos, com PIC médio de 28 %. A distância genética entre as linhagens variaram de 0,30 a 0,63. Os resultados indicaram que este marcador foi eficiente na identificação dos genótipos similares/divergentes e na escolha das melhores combinações de linhagens para a produção de híbridos com valor comercial.

Devido à alta repetibilidade e praticidade, tem sido considerado um marcador genético com ampla aplicação em análise sistemática, tipagem patogênica, genética populacional e mapeamento de genes de características quantitativas – QTL's (MUELLER; WOLFENBARER, 1999). A comprovada eficácia e confiabilidade do marcador AFLP levaram ao aumento da sua utilização, sobretudo em estudos de diversidade, filogenia, mapas de ligação e na identificação de cultivares (PAPA; GEPTS, 2003).

Hartings et al. (2008) avaliaram o parentesco e a diversidade genética entre 54 variedades crioulas de milho da Itália através da combinação de 10 *primers* AFLP que geraram um total de 284 fragmentos polimórficos. O valor médio do PIC foi de $0,37 \pm 0,12$, evidenciando a alta capacidade de discriminação deste marcador. A análise de agrupamento demonstrou uma separação clara dos acessos em relação aos dados morfológicos com a formação de 4 grupos principais associados sobretudo à origem geográfica das variedades analisadas.

A amplificação dos fragmentos de DNA é realizada sob condições de alta seletividade, eliminando assim artefatos da PCR que são rotineiramente visíveis para o marcador RAPD. Consequentemente, as amplificações dos fragmentos aproximam-se da repetibilidade perfeita (JONES et al., 1997; VOS et al., 1995), com erros globais geralmente inferiores a 2 % (ARENS et al., 1998; JANSSEN et al., 1997).

Os AFLP's podem ser gerados velozmente pela capacidade multiplex e pela alta porcentagem de polimorfismo entre os fragmentos amplificados. Estudos com este marcador relatam a visualização de centenas até milhares de fragmentos (AJMONE-MARSAN et al.,

1997). Por exemplo, Mackill et al. (1996) estimaram que uma simples pesquisa pode analisar milhares de *loci* por mês, dos quais pelo menos 30 % serão polimórficos. Além disso, os AFLP's segregam de forma mendeliana e diferenças de apenas um único nucleotídeo entre os fragmentos amplificados podem ser revelados em gel de poliacrilamida ou através de metodologias automatizadas (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

A principal desvantagem do marcador AFLP está na dificuldade em identificar os alelos homólogos, por apresentar expressão dominante, tornando esse método menos eficiente para os estudos que requerem atributos do estado alélico, como nas análises que envolvem *loci* na condição heterozigota. Além disto, a expressão dominante do marcador poderia levar a uma estimativa imparcial do grau de parentesco (REEVE; WESTNEAT; QUELLER, 1992). Em contrapartida, o elemento chave deste marcador diz respeito à grande capacidade em realizar *screening* simultâneo em várias regiões do DNA distribuídas aleatoriamente por todo o genoma da espécie analisada (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

Os marcadores AFLP's têm sido usados para inferir sobre as relações filogenéticas de espécies próximas baseadas em medidas de distância genética. Quando se trata de um nível taxonômico mais elevado, a alta variabilidade deste marcador reduz a similaridade entre os taxa distantes para um nível ao acaso, tornando as inferências filogenéticas mais problemáticas. Neste sentido, é extremamente útil para o agrupamento de linhagens intimamente relacionadas, sendo crucial para estudos de biodiversidade ou pesquisas epidemiológicas (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

Este marcador apresenta ampla aplicação nos estudos relacionados à genética da conservação, como na análise da variação genética abaixo do nível de espécie, particularmente nas investigações sobre a estrutura populacional e nos níveis de diferenciação (GONZALEZ et al., 1998), incluindo a variação genética dentro das populações (WINFIELD et al., 1998). Além dos trabalhos voltados à estrutura populacional, os marcadores AFLP's têm sido aplicados para avaliar o fluxo gênico e a dispersão (ARENS et al., 1998), introgressão de genes (TOHME et al., 1996) e estudos de hibridação (ARENS et al., 1998). A alta resolução do marcador permite testes de identidade clonal entre indivíduos e assim inferências podem ser obtidas sobre os modos de reprodução sexual ou assexual dos indivíduos (BEISMANN et al., 1997).

Normalmente um pequeno número de combinações de *primers* é suficiente para gerar um número adequado de fragmentos polimórficos. Entretanto, em alguns casos é necessária

uma série de combinações de *primers* para gerar fragmentos que possam revelar diferenças entre indivíduos intimamente relacionados ou endogâmicos, ou para confirmar a falta de diferenças. Pouco se conhece sobre a quantidade de fragmentos que devem ser gerados para representar significativamente os *loci* altamente polimórficos. A princípio, qualquer indivíduo pode ser caracterizado com uma única combinação de *primers* AFLP, devido ao grande número de fragmentos gerados, dos quais presumivelmente alguns serão polimórficos (VOS; KUIPER, 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Este trabalho visou estimar a variabilidade genética em germoplasma de milho crioulo através da genotipagem molecular, bem como estabelecer possíveis relações entre os coeficientes de similaridade/diversidade genética e os locais de coleta deste germoplasma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar os índices de polimorfismo a partir da genotipagem das variedades crioulas de milho através dos marcadores RAPD, SSR e AFLP;
2. Avaliar a eficiência dos diferentes marcadores moleculares na obtenção de fragmentos polimórficos em germoplasma de milho crioulo;
3. Estimar a similaridade/diversidade genética entre as variedades crioulas através da genotipagem molecular com os marcadores RAPD, SSR e AFLP;
4. Realizar o agrupamento das variedades crioulas de milho através dos índices de similaridade genética;
5. Estabelecer possíveis relações entre a similaridade genética e os locais de coleta das variedades crioulas de milho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado neste trabalho foi obtido através de parcerias entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e centros de pesquisa pública como: FEPAGRO – Veranópolis/RS, EMBRAPA-CPACT – Pelotas/RS e associações de pequenos produtores rurais que mantêm nas propriedades o cultivo de sementes crioulas de milho nos municípios de Ponta Grossa e Rio Azul, no Estado do Paraná. A Tabela 1 apresenta a identificação dos genótipos de milho crioulo utilizados nesta análise. Estes acessos estão conservados no banco de germoplasma do Laboratório de Genética Molecular da UEPG.

Tabela 1 - Relação das variedades crioulas de milho utilizadas na análise molecular e os respectivos locais de coleta. Ponta Grossa, 2012.

Trat.	Variedade Crioula	Local de Coleta/UF	Trat.	Variedade Crioula	Local de Coleta/UF
1	Nutricional	Rio Azul/PR	25	Crioulo Riscado	Veranópolis/RS
2	Milho Grande	Ponta Grossa/PR	26	Dente de Ouro 2	Pelotas/RS
3	Palha Roxa	Rio Azul/PR	27	Crioulo Amarelão	Veranópolis/RS
4	Paiol	Ponta Grossa/PR	28	População Nonoai	Nonoai/RS
5	Branco	Rio Azul/PR	29	Pintadinho FE 109	Canela/RS
6	Asteca	Rio Azul/PR	30	Crioulo Veranópolis	Veranópolis/RS
7	Caiano	Rio Azul/PR	31	Crioulo 8 Carreiras	Veranópolis/RS
8	Roxo Índio I	Canguçu/RS	32	Crioulo Cunha Roxo	Veranópolis/RS
9	Branco p/ Palha	Rio Azul/PR	33	BR 451	Pelotas/RS
10	Pérola	Rio Azul/PR	34	Crioulo Rosa	Veranópolis/RS
11	Carioca	Rio Azul/PR	35	Colonial	Pelotas/RS
12	Astequinha Sab. Fino	Rio Azul/PR	36	Catete Amarelo	Canguçu/RS
13	Vinten	Rio Azul/PR	37	Caiano FE 121	Tenente Portela/RS
14	Palha Roxa	Rio Azul/PR	38	Branco Dentado	Canguçu/RS
15	Encantilado	Rio Azul/PR	39	Branco FE 126	Candiota/RS
16	Branco	Rio Azul/PR	40	Argentino FE 128	Alto União/RS
17	Amarelo Antigo	Rio Azul/PR	41	Caiano	Ponta Grossa/PR
18	Crioulo 8 Carreiras	Veranópolis/RS	42	Branco	Ponta Grossa/PR
19	Crioulo Pururuca	Veranópolis/RS	43	Cinquentinha	Ibarama/RS
20	Caiano Rajado	Canguçu/RS	44	Roxo Índio II	Canguçu/RS
21	Vermelho FE 127	Candiota/RS	45	Dente de Ouro	Canguçu/RS
22	Cunha	Ibarama/RS	46	Argentino Flint	Canguçu/RS
23	Crioulo Sabugo Fino	Veranópolis/RS	47	Crioulo Branco Comum	Veranópolis/RS
24	Crioulo Asteca	Veranópolis/RS	48	Crioulo Palha Roxa	Veranópolis/RS

Para a análise da diversidade genética das variedades crioulas de milho, através dos marcadores moleculares RAPD, microssatélite e AFLP, foram coletadas folhas jovens de 15

plantas por variedade, as quais constituíram um *bulk* equitativo de tecido vegetal para cada genótipo de milho. As mesmas foram identificadas e estocadas em freezer (- 20 °C) para posterior extração do DNA genômico.

3.2 METODOLOGIAS

3.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico de cada variedade crioula foi extraído a partir de um *bulk* de folhas representativas de cada genótipo. A metodologia de extração seguiu o protocolo de Hoisington; Khairallah e Gonzalez de Leon (1994) modificado para extração em tubos *ependorf* de 1,5 mL.

O tecido vegetal previamente congelado em nitrogênio líquido foi macerado em cadinho de porcelana. A cada 150 mg de tecido macerado adicionou-se 650 µL de tampão de extração CTAB 1X (70 µM de NaCl; 50 µM de EDTA pH 8,0; 100 µM de Tris-HCl pH 7,5; 1 % de CTAB (p/v); 140 µM de β-mercaptoetanol). As amostras foram homogeneizadas através de suaves inversões dos tubos e incubadas em banho-maria a 65 °C por uma hora. Após este período, foram acrescentados 500 µL de clorofórmio/álcool-isoamílico (CIA) na proporção 24:1 (v:v), homogeneizadas por suaves inversões por aproximadamente 5 minutos e centrifugadas à 12000 rpm, por 12 minutos. Após este período, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 500 µL de CIA, os quais foram novamente suavemente invertidos e centrifugados na mesma rotação e tempo descritos anteriormente. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para novo tubo ao qual foi adicionado igual volume de álcool etílico absoluto resfriado a - 20 °C. Após inversão dos tubos, o DNA foi precipitado e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos. Os pellets foram lavados com álcool etílico 75 % por 1 minuto, 90 % por 30 segundos e 100 % por 30 segundos. Após a secagem do pellet a temperatura ambiente, o mesmo foi ressuscitado em 40 µL de água ultrapura estéril e tratado com 1 µL de RNase (1 mg/mL) por 2 horas em banho-maria a 37 °C.

A quantificação do DNA foi realizada no espectrofotômetro Nanovue GE Healthcare®. Após devidamente calibrado, quantificou-se individualmente o DNA genômico a partir de alíquotas de 2 µL da solução concentrada, seguido da diluição das amostras de DNA para uma concentração final de 10 ng µL⁻¹. A integridade do DNA genômico foi visualizada em gel de agarose a 1 % corado com 6 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 0,4 % de sucrose), na proporção 1:1. As amostras foram submetidas à

corrida eletroforética por aproximadamente 4 h a 60 V. Após, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta em aparelho Vilber Lourmat F-590 interference UV/IR, seguido da fotodocumentação em aparelho MF-ChemisBis (DNR-BioImaging Systems Ltd). A Figura 1 apresenta a integridade/qualidade do DNA genômico concentrado de uma amostra de 19 variedades crioulas de milho.

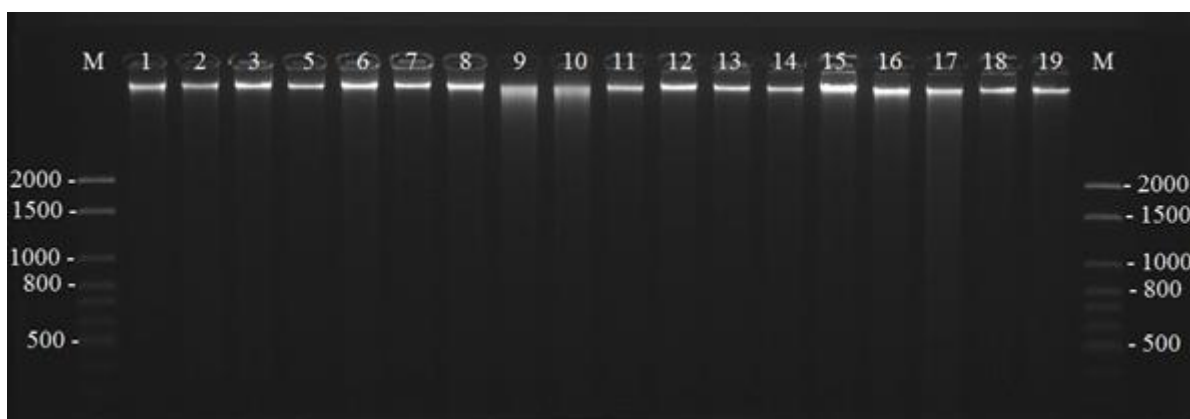


Figura 1 - Amostras de DNA genômico de 19 variedades crioulas de milho. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2012.

3.2.2 Marcador molecular RAPD

3.2.2.1 Otimização da temperatura de anelamento dos *primers*

A genotipagem das 48 variedades crioulas de milho através do marcador RAPD foi realizada por meio da amplificação de fragmentos de DNA a partir de uma amostra de 30 *primers* RAPD. Cada iniciador foi constituído por uma sequência de 10 oligonucleotídeos aleatórios (decâmero). A Tabela 2 apresenta a relação dos 30 *primers* analisados, a sequência de oligonucleotídeos, a temperatura de anelamento recomendada pela empresa Prodimol Biotecnologia S/A e as temperaturas de anelamento otimizadas pelos testes de gradiente.

Inicialmente para cada *primer* realizou-se um teste de gradiente de temperatura visando encontrar a melhor temperatura de anelamento que otimizasse a qualidade dos fragmentos amplificados na reação de PCR. Os gradientes de temperatura variaram de 25 até 45 °C na etapa de anelamento do *primer* com as fitas molde do DNA.

Tabela 2 - Relação dos *primers* RAPD's analisados, sequência de oligonucleotídeos, temperatura de anelamento recomendada, temperatura otimizada e diferença de temperatura. Ponta Grossa, 2012.

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	T °C Recomendada	T °C Otimizada	°C Diferença
01) OPAR – 04	CCAGGAGAAG	29,8	38,0	8,2
02) OPAW – 10	GTTGTTTGCC	30,1	38,0	7,9
03) OPAV – 13	CTGACTTCCC	30,4	33,8	3,4
04) OPAW – 19	GGACACAGAG	30,6	33,8	3,2
05) OPAV – 19	CTCGATCACC	31,1	33,8	2,7
06) OPAW – 14	GGTTCTGCTC	31,9	31,4	- 0,5
07) OPW – 08	GACTGCCTCT	33,1	41,0	7,9
08) OPAU – 12	CCACTGGTCT	33,3	39,4	6,1
09) OPY – 10	CAAACGTGGG	33,7	41,0	7,3
10) OPAD – 14	GAACGAGGGT	33,8	41,0	7,2
11) OPW – 09	GTGACCGAGT	33,9	41,0	7,1
12) OPAM – 01	TCACGTACGG	34,3	41,0	6,7
13) OPAR – 02	CACCTGCTGA	34,3	41,0	6,7
14) OPAR – 15	ACACTCTGCC	34,3	41,0	6,7
15) OPY – 04	GGCTGCAATG	34,4	44,0	9,6
16) OPE – 18	CGACTGCAGA	34,7	44,0	9,3
17) OPAV – 03	TGTAGCCGTG	34,7	44,0	9,3
18) OPW – 13	CACAGCGACA	35,9	39,4	3,5
19) OPP – 05	CCCCGGTAAC	36,0	41,0	5,0
20) OPAD – 06	AAGTGCACGG	36,3	41,0	4,7
21) OPAX – 10	CCAGGCTGAC	36,6	39,4	2,8
22) OPAW – 11	CTGCCACGAG	37,5	39,4	1,9
23) OPAT – 08	TCCTCGTGCG	38,0	44,0	6,0
24) OPAX – 07	ACGCGACAGA	38,0	44,0	6,0
25) OPAK – 15	ACCTGCCGTT	38,1	44,0	5,9
26) OPAW – 07	AGCCCCCAAG	38,8	44,0	5,2
27) OPAR – 17	CCTTGCGCCT	41,1	44,0	2,9
28) OPY – 09	AGCAGCGCAC	42,5	39,4	- 3,1
29) OPAW – 08	CTGTCTGTCTG	31,2	43,0	11,8
30) OPAR – 05	CATACCTGCC	31,3	43,0	11,7
Média				6,01

A reação de PCR foi realizada em termociclador Biocycler, sendo composta de: 1 ciclo de desnaturação inicial por 3 minutos a 94 °C seguido por 45 ciclos de 94 °C por 1 minuto, gradiente de temperatura na fase de anelamento do *primer* (25; 27; 29; 31,4; 33,8; 38,6; 41; 43 e 45 °C) por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos na etapa de extensão dos fragmentos. Na sequência, as amostras foram submetidas a um passo final de 72 °C por 6 minutos.

Os fragmentos amplificados na reação de PCR com os diferentes *primers* foram corados com 5 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE 1X por aproximadamente 3 h a 80 V. Os géis foram fotodocumentados sob luz ultravioleta em aparelho MF-ChemisBis (DNR-BioImaging Systems Ltd). A partir das imagens coletadas e da observação direta do gel sob

transluminador de luz UV (Vilber Lourmat F-590 interference UV/IR), notas foram atribuídas a cada temperatura de anelamento testada levando-se em consideração a qualidade dos fragmentos amplificados para cada *primer*.

3.2.2.2 Genotipagem das variedades crioulas de milho

As reações de amplificação para o marcador RAPD foram realizadas para um volume final de 20 µL contendo 1X tampão Green GoTaq® Flexi; 4,0 mM MgCl₂; 0,27 mM de solução dNTP; 0,8 µM de *primer*; 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, 5 U µL⁻¹) e 40 ng de DNA molde.

As reações de amplificação do DNA das 48 variedades crioulas de milho foram realizadas em termociclador com ciclos de desnaturação, anelamento e extensão dos fragmentos como descrito no item 3.2.2.1, com a diferença de que a temperatura de anelamento utilizada foi específica para cada *primer* RAPD de acordo com o resultado do teste de gradiente (Tabela 2).

Os produtos amplificados foram corados com 5 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados via eletroforese em gel de agarose a 2 % em tampão TBE 1X por aproximadamente 3 h a 80 V. Em cada gel foi adicionado à extremidade esquerda uma amostra de 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 pb visando determinar o tamanho dos fragmentos gerados na amplificação. Os géis foram visualizados em transluminador (Vilber Lourmat F-590 interference UV/IR) e posteriormente fotodocumentados sob luz UV no aparelho MF-ChemisBis (DNR-BioImaging Systems Ltd). Os fragmentos polimórficos foram codificados em (1) presença ou (0) ausência, com os quais foi gerada a matriz de dados binários.

3.2.3 Marcador molecular microsatélite (SSR)

Para a genotipagem das variedades crioulas foram utilizados 47 pares de *primers* microsatélite (*forward* e *reverse*) de modo que amostrassem os 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho. Em média foram analisados 4,7 *primers* por grupo de ligação, com amplitude variando de 4 até 7 *primers* por grupo de ligação. Os *primers* foram escolhidos a partir do banco de dados do *Maize Genetics and Genomics Data Base – MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org>) e selecionados baseados em estudos prévios com este marcador (MATIELLO, 2004).

3.2.3.1 Otimização da reação de PCR

Nesta etapa foram utilizados apenas DNA das variedades crioulas Vermelhão FE 127 (21), Cunha (22) e Crioulo Sabugo Fino (23) com o intuito de adequar a melhor metodologia para a reação de amplificação dos fragmentos microssatélites. A reação de PCR foi preparada em microtubos de 0,2 mL, contendo 1X tampão Green GoTaq® Flexi; 2,0 mM MgCl₂; 0,1 mM de solução dNTP; 0,2 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, 5 U µL⁻¹) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 20 µL.

Inicialmente os *primers* microssatélite foram testados no programa de PCR denominado de SSR1 (“touchdown”). A reação de PCR foi composta por um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos seguido de 21 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento variando de 65 a 55 °C por 1 minuto, com redução de 1 °C a cada dois ciclos (“touchdown”) e extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos. Na sequência, os fragmentos foram submetidos a mais 19 ciclos: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de extensão a 72 °C por 6 minutos (Tabela 3).

Para os *primers* microssatélites em que as amostras não amplificaram ou a qualidade não foi adequada foi testado um segundo programa de PCR designado de SSR2 (“touchdown”). A reação foi composta por um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos seguido de 11 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento variando de 70 a 65 °C por 1 minuto, com redução de 1 °C a cada dois ciclos (“touchdown”) e extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos. Na sequência, os fragmentos foram submetidos a mais 29 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento de 65 °C por 1 minuto, extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de 72 °C por 6 minutos (Tabela 3).

Os *primers* microssatélites cuja amplificação dos fragmentos e a qualidade não foram adequadas tanto para o programa SSR1 quanto para o SSR2 foram testados num terceiro programa designado de SSRteste seguindo a metodologia proposta por YAO et al. (2007a). O programa foi composto por um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de PCR: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e 30 segundos, extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de 72 °C por 5 minutos (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação dos programas de PCR para o marcador microssatélite com os respectivos passos, temperaturas e número de ciclos na reação. Ponta Grossa, 2012.

Passos	Programas de PCR								
	SSR1			SSR2			SSRteste		
	T°C	Tempo	Ciclos	T°C	Tempo	Ciclos	T°C	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94	3 min		94	3 min		95	1 min	
Desnaturação	94	1 min	21	94	1 min	11	95	1 min	35
Anelamento	65-55	1 min		70-65	1 min		55	1 m 30 seg	
Extensão	72	2 min		72	2 min		72	2 min	
Desnaturação	94	1 min	19	94	1 min	29			
Anelamento	55	1 min		65	1 min				
Extensão	72	2 min		72	2 min				
Extensão final	72	6 min		72	6 min			5 min	
Ciclos			40			40			35

As amostras amplificadas foram coradas com 5 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separadas por eletroforese em gel de agarose a 3,0 % em tampão TBE 1X por aproximadamente 4 h a 80 V. Em cada gel foi adicionado à extremidade esquerda uma amostra de 5,0 µL do marcador de peso molecular de 100 pb visando determinar o tamanho dos fragmentos gerados na amplificação. Os géis foram observados em transluminador e fotodocumentados sob luz UV no aparelho MF-ChemisBis (DNR-BioImaging Systems Ltd).

3.2.3.2 Genotipagem das variedades crioulas de milho

A partir dos resultados da otimização das reações de PCR para cada *primer* microssatélite procedeu-se a genotipagem das 48 variedades de milho para os respectivos programas de PCR conforme descrito no item 3.2.3.1. Nesta etapa as reações de amplificação dos 47 pares de *primers* SSR (Tabela 4) foram realizadas em microplacas de PCR com 96 poços.

Os produtos da reação de PCR foram corados com GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 3,0 % em tampão TBE 1X por aproximadamente 4 h a 80 V. Os géis foram observados em transluminador e fotodocumentados sob luz UV no aparelho MF-ChemisBis (DNR-BioImaging Systems Ltd). Os fragmentos polimórficos obtidos pela amplificação de cada *primer* foram genotipados em (1) presença ou (0) ausência, com os quais foi gerada a matriz de dados binários para este marcador molecular.

Tabela 4 - Relação dos 47 pares de *primers* microssatélites, localização (grupo/bin), motivo repetido e programa de PCR otimizado. Ponta Grossa, 2012.

Nº <i>Primer</i>	Loco SSR	Grupo/Bin	Motivo repetido	Programa otimizado
1	Bnlg 149	1/00	Indeterminado	SSR1
2	Bnlg 1007	1/02	(AG) 15	SSR1
3	Umc 1035	1/06	(CT) 19	SSR2
4	Bnlg 131	1/11	Indeterminado	SSR1
5	Bnlg 125	2/02	Indeterminado	SSR1
6	Umc 1884	2/05	(TC) 8	SSR1
7	Bnlg 1045	2/07	(AG) 17	SSR1
8	Phi 101049	2/10	(AGAT)	SSR1
9	Umc 2118	3/00	(CTTT) 4	SSR1
10	Umc 1223	3/04	(AG) 7	SSR2
11	Bnlg 197	3/06	Indeterminado	SSR1
12	Umc 1136	3/10	(GCA) 5	SSR1
13	Umc 1759	4/01	(CGG) 4	SSR1
14	Umc 2176	4/03	(TGC) 4	SSR1
15	Bnlg 490	4/04	Indeterminado	SSR1
16	Bnlg 2291	4/06	(AG) 17	SSR1
17	Bnlg 1784	4/07	(AG) 13	SSR1
18	Bnlg 1565	4/09	(AG) 27	SSR1
19	Bnlg 1337	4/11	(AG) 21	SSR1
20	Umc 2036	5/01	(GTC) 4	SSR1
21	Bnlg 557	5/03	Indeterminado	SSRteste
22	Umc 1348	5/05	(CA) 7	SSR1
23	Umc 1792	5/08	(CGG) 5	SSR1
24	Umc 1829	5/09	(AG) 10	SSR1
25	Bnlg 249a	6/01	Indeterminado	SSRteste
26	Phi 077	6/01	(AG)	SSR1
27	Umc 1887	6/04	(CGA) 4	SSR1
28	Phi 452693	6/04	(AGCC)	SSR1
29	Umc 1463	6/06	(ACA) 6	SSRteste
30	Bnlg 1292	7/01	(AG) 14	SSR1
31	Phi 034	7/02	(CCT)	SSRteste
32	Bnlg 434	7/03	Indeterminado	SSRteste
33	Phi 082	7/05	(AG)	SSRteste
34	Umc 1799	7/06	(TG) 12	SSRteste
35	Umc 1592	8/01	(CA)	SSR1
36	Phi 115	8/03	(AT/ATAC)	SSR1
37	Bnlg 240	8/06	Indeterminado	SSR1
38	Phi 015	8/08	(AAAC)	SSR1
39	Phi 233376	8/09	(CCG)	SSR1
40	Umc 2084	9/01	(CTAG) 4	SSR1
41	Phi 065	9/03	(CACTT)	SSR1
42	Phi 027	9/03	(GCGCT)	SSR1
43	Umc 1519	9/04	(TC) 8	SSR1
44	Umc 1319	10/01	(ACC) 5	SSR1
45	Bnlg 640	10/03	Indeterminado	SSR2
46	Bnlg 1250	10/05	(AG) 30	SSRteste
47	Umc 2021	10/07	(TGG) 4	SSR1

3.2.4 Marcador molecular AFLP

Para a genotipagem das variedades crioulas com o marcador AFLP foram utilizadas 25 combinações de *primers EcoRI* + *MseI* (Tabela 5).

As amostras de DNA genômico previamente extraídas e quantificadas de acordo com o item 3.2.1 foram diluídas para 50 ng μL^{-1} . Os adaptadores da *MseI* foram diluídos para 50 pmol μL^{-1} e os da *EcoRI* para 5 pmol μL^{-1} . A preparação dos adaptadores [6000 pmol do adaptador *forward* e *reverse* da *MseI*; 600 pmol do adaptador *forward* e *reverse* da *EcoRI*; tampão OPA (One Phor All) 0,5X e água milliQ estéril] foi realizada individualmente em termociclador para cada adaptador num volume final de 120 μL , sendo composta de três ciclos de 10 minutos a 65 °C, 37 °C e 25 °C, respectivamente.

A metodologia utilizada seguiu a descrita por Vos et al. (1995) com adaptações de Lopes (2003). A genotipagem para o marcador AFLP foi composta de quatro etapas: 1) A dupla digestão enzimática do DNA com a *EcoRI* + *MseI* para um volume final de 50 μL (1X BSA; 1X OPA; 5,04 U da *EcoRI*; 5 U da *MseI* e 200 ng de DNA genômico). A digestão foi realizada em termociclador por 3 horas a 37 °C com suaves inversões a cada hora, seguido por um passo final de 70 °C por 15 minutos para inativação das enzimas. 2) A ligação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* aos fragmentos de DNA digeridos pelas respectivas enzimas foram realizadas para um volume final de 10 μL sendo composto de: 5 pmol do adaptador *EcoRI*; 50 pmol do adaptador *MseI*; 1X tampão da T₄ DNA ligase e 1,5 U da enzima T₄ DNA ligase. A reação de ligação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* foi realizada a 23 °C por 3 horas (suaves inversões dos tubos a cada hora) em termociclador. 3) A pré-amplificação dos fragmentos com *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na posição 3' foi realizada para um volume final de 20 μL (1X tampão Green GoTaq® Flexi; 1,5 mM MgCl₂; 0,52 mM de solução dNTP; 25 ng de *primer EcoRI*+A e *MseI*+C; 3 U de *Taq* DNA polimerase e 2 μL do DNA ligado).

O programa de PCR foi composto por desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos seguido de 26 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto, extensão dos fragmentos a 72 °C por 1 minuto e um passo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Após a etapa de pré-amplificação foram acrescentadas em cada amostra 80 μL de água ultrapura estéril, seguido da estocagem a -20 °C.

A amplificação seletiva foi realizada através da combinação de *primers EcoRI* e *MseI* com 3 bases seletivas de acordo com o descrito na Tabela 5. As reações de amplificação

seletiva foram preparadas para um volume final de 20 µL contendo: 1X tampão Green GoTaq® Flexi; 25 mM MgCl₂; 0,52 mM de solução dNTP; 25 ng do *primer EcoRI*+3; 30 ng do *primer MseI*+3; 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1,5 µL do DNA pré-amplificado.

As reações de amplificação seletiva foram compostas de um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos seguido de 12 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Na sequência, os fragmentos foram submetidos a mais 23 ciclos de PCR: 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de 2 minutos a 72 °C.

Tabela 5 - Representação das 25 combinações de *primers EcoRI* + *MseI* utilizadas na genotipagem das 48 variedades de milho crioulo. Ponta Grossa, 2012.

<i>Primers</i>	1. <i>M</i> – CAC	2. <i>M</i> – CCA	3. <i>M</i> – CGC	4. <i>M</i> – CTC	5. <i>M</i> – CAT
1. <i>E</i> – AGT	AGT/CAC	AGT/CCA	AGT/CGC	AGT/CTC	AGT/CAT
2. <i>E</i> – ATC	ATC/CAC	ATC/CCA	ATC/CGC	ATC/CTC	ATC/CAT
3. <i>E</i> – AGC	AGC/CAC	AGC/CCA	AGC/CGC	AGC/CTC	AGC/CAT
4. <i>E</i> – ACA	ACA/CAC	ACA/CCA	ACA/CGC	AGC/CTC	ACA/CAT
5. <i>E</i> – AAC	AAC/CAC	AAC/CCA	AAC/CGC	AAC/CTC	AAC/CAT

Os produtos de PCR obtidos na reação de amplificação seletiva foram corridos em géis de poliacrilamida (6 %). Para cada gel foram utilizados 120 mL da matriz de poliacrilamida (6 % acrilamida/bisacrilamida; 7,5 M de uréia e 1X tampão TBE), 120 µL de TEMED (N, N, N', N' - Tetramethyl – ethylene diamine) e 800 µL de persulfato de amônio 10 %.

Inicialmente, o gel de poliacrilamida foi submetido a uma pré-corrida eletroforética por 1 hora a 80 W ($\pm$ 1500 V) com o intuito de organizar a matriz bem como elevar a temperatura do gel na cuba eletroforética vertical modelo Sequi-Gen® (BIORAD).

As amostras foram preparadas para a corrida eletroforética adicionando-se 8 µL de tampão formamida 2X [formamida 98 %; 10 mM EDTA pH 8,0; azul de bromofenol 0,002 % (p/v) e xileno cianol 0,002 % (p/v)] seguidas de desnaturação a 95 °C por 5 minutos em termociclador. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X a 80 W de potência por aproximadamente 3 horas e 30 minutos. Para a determinação do tamanho dos fragmentos gerados na amplificação seletiva foi adicionado às extremidades do gel 10 µL do marcador de 50 pb acrescido do tampão formamida 2X e desnaturado a 95 °C por 5 minutos em termociclador.

A metodologia para a impregnação pelo íon prata foi baseada no protocolo de Creste; Tulmann Neto e Figueira (2001). A coloração do gel de poliacrilamida foi composta de 5 etapas, na respectiva ordem: 10 minutos em solução fixadora (1780 mL de água ultrapura; 20 mL de ácido acético glacial e 200 mL de etanol absoluto); 2,4 minutos em solução de pré-tratamento (2000 mL de água ultrapura e 30 mL de ácido nítrico); de 20 a 35 minutos em solução de impregnação pelo íon prata (2000 mL de água ultrapura e 4 g de nitrato de prata); de 10 a 15 minutos em solução reveladora (2000 mL de água ultrapura e 60 g de carbonato de sódio) e 5 minutos em solução de bloqueio (1900 mL de água ultrapura e 100 mL de ácido acético glacial). Intercalando as etapas de tratamento realizaram-se lavagens da placa em 2,0 L de água deionizada por 1 minuto. Após a secagem do gel, os fragmentos polimórficos amplificados foram genotipados em presença (1) ou ausência (0) para cada uma das 48 variedades de milho crioulo para cada combinação de *primers* *EcoRI* e *MseI*. Os locos do marcador foram denominados segundo Castiglioni et al. (1999).

3.2.5 Análise dos dados

Os fragmentos gerados pela genotipagem das 48 variedades crioulas através dos marcadores moleculares RAPD, microssatélite e AFLP foram tabulados numa matriz de dados binários (1 e 0). Da genotipagem molecular apenas os fragmentos polimórficos foram submetidos à análise da similaridade genética a partir do coeficiente de Jaccard. Com base na matriz de similaridade entre as variedades crioulas procedeu-se a análise do agrupamento, utilizando-se o método UPGMA (método da média aritmética não ponderada). As análises de similaridade e de agrupamento foram realizadas individualmente e conjuntamente para os três marcadores através do software NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 1992) e GENES versão 7.0 (CRUZ, 2006). A correlação entre as matrizes de similaridade genética individual e conjunta dos marcadores foi através do teste de Mantel (MANTEL, 1967) no software NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 1992).

4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo I

Estudo da diversidade genética em germoplasma de milho crioulo através de marcadores moleculares.

Manuscrito em preparo a ser submetido ao periódico Theoretical and Applied Genetics, que apresenta Qualis CAPES A2, Ciências Biológicas I.

4.1 Estudo da diversidade genética em germoplasma de milho crioulo através de marcadores moleculares.

Resumo

A diversidade genética encontrada entre as raças crioulas de milho é a parte mais importante da biodiversidade deste cereal, sendo que as raças locais representam uma significativa porção da variabilidade genética do gênero. Marcadores moleculares utilizados para estimar a diversidade genética das culturas têm sido comparados visando avaliar a eficácia como ferramenta aos programas de melhoramento. Os objetivos foram estimar a diversidade genética existente entre 48 acessos de milho crioulo oriundos do Rio Grande do Sul e do Paraná a partir de três marcadores moleculares (RAPD, SSR e AFLP); realizar o agrupamento destes genótipos através das estimativas da similaridade genética e estabelecer possíveis relações entre a similaridade genética e os locais de coleta das variedades crioulas. As variedades foram genotipadas a partir dos fragmentos polimórficos obtidos através de 30 *primers* RAPD, 47 SSR e 25 AFLP os quais foram submetidos à análise de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) e agrupamento (método UPGMA). O AFLP resultou na amplificação de 762 fragmentos polimórficos, seguido do RAPD (335) e do SSR (105). Os índices de polimorfismo foram de 40,3; 81,9 e 78,3 %, respectivamente. O marcador AFLP gerou em média 30,5 fragmentos polimórficos/*primer*, sendo superior em 3 vezes ao RAPD e 14 vezes ao microssatélite. As amplitudes de similaridade genética baseadas no coeficiente de Jaccard foram de 46 a 57 % para o RAPD; 41 a 56 % para o SSR; 59 a 74 % para o AFLP e de 58 a 69 % para a análise conjunta dos marcadores. O dendograma obtido a partir do RAPD e SSR revelou 8 grupos distintos, enquanto que no AFLP e na análise conjunta mostrou 6 e 7 grupos, respectivamente. A maior correlação entre as matrizes de similaridade foi entre o AFLP e análise conjunta (96 %). As demais correlações foram baixas entre os marcadores utilizados. Os resultados demonstraram existência de variabilidade genética entre as variedades crioulas dentro e entre os locais de coleta. O marcador AFLP foi o mais eficiente na geração de fragmentos polimórficos/*primer*. Prioritariamente as variedades foram agrupadas de acordo com os locais de coleta. Além disso, observou-se que a análise conjunta pode não ser a maneira mais eficiente de avaliar a variabilidade em genótipos altamente divergentes quando predominam fragmentos de um determinado marcador nessa análise.

Palavras-chave: polimorfismo molecular; similaridade genética; análise de agrupamento.

Introdução

O germoplasma do milho é constituído por raças crioulas, populações adaptadas e materiais exóticos introduzidos. As populações crioulas são genótipos importantes para o melhoramento devido ao elevado potencial de adaptação a condições ambientais específicas e à grande fonte de variabilidade (PATERNIANI; NASS; SANTOS, 2000). De maneira geral, são menos produtivas que os cultivares comerciais embora, nos últimos anos, tornaram-se muito importantes porque representam fonte de variabilidade genética a ser explorada na busca por genes de tolerância e/ou resistência a fatores bióticos e abióticos de interesse na agricultura (ARAÚJO; NASS, 2002).

A diversidade genética observada entre as raças crioulas é a parte mais importante da biodiversidade do milho, sendo que as raças locais representam uma significativa porção da variabilidade genética encontrada no gênero (MACIEL et al., 2003). Entretanto, ainda são escassos os dados agronômicos e genéticos sobre essas coleções o que tem particularmente limitado a utilização, gestão e conservação desse germoplasma (NASS; PELLICANO; VALOIS, 1993). Além disso, estão sendo substituídas rapidamente por um pequeno número de genótipos melhorados com base genética mais estreita.

A caracterização molecular é frequentemente usada pelos melhoristas de milho como um método alternativo para selecionar genótipos mais promissores e diminuir os gastos e o tempo necessário para desenvolver combinações híbridas. Segundo Garcia et al. (2004) as populações tropicais de milho se originaram de compostos com alta variabilidade genética, ao contrário das populações temperadas e, na maioria das vezes, torna-se difícil alocar estes compostos tropicais em grupos heteróticos bem definidos apenas com a avaliação do fenótipo. Em milho, a caracterização molecular tem sido eficiente na avaliação da diversidade genética e na composição dos grupos heteróticos (GUIMARÃES, 2007).

Os estudos de diversidade genética entre indivíduos foi intensificada através da amplificação de sequências de DNA baseada na PCR (SAIKI et al., 1988). Várias metodologias têm sido utilizadas: o RAPD (WILLIAMS et al., 1990; WELSH; McCLELLAND, 1990), o microsatélite ou SSR (TAUTZ, 1989; LITT; LUTY, 1989) e o AFLP (ZABEAU; VOS, 1993). Em milho, o RAPD tem sido amplamente utilizado em estudos de diversidade pelo baixo custo e rapidez na obtenção de polimorfismos (CARVALHO et al., 2004; BRUEL et al., 2007). Os SSR's apresentam alta reprodutibilidade, acurácia e discriminação. Pela especificidade e fácil detecção tornaram-se um dos principais

marcadores para a caracterização dos recursos genéticos vegetais através da genotipagem das coleções de germoplasma bem como da análise da diversidade genética (ADEYEMO et al., 2011; MORALES; DECKER; ORNELLA, 2010; TERRA et al., 2011). O marcador AFLP aproxima-se de um sistema ideal por possibilitar avaliar a diversidade genética entre indivíduos, populações e espécies (MUELLER; WOLFENBARER, 1999). A técnica pode amostrar grande parte do genoma de qualquer organismo, permitindo uma genotipagem de alta resolução e de qualidade. Segundo Gerber et al. (2000) a perda de informação resultante da expressão dominante do marcador é contrabalançada pelo elevado número de *loci* polimórficos revelados por esta metodologia.

Diferentes marcadores moleculares utilizados para estimar a diversidade genética das culturas têm sido comparados com a finalidade de avaliar a eficácia como ferramenta aos programas de melhoramento. Garcia et al. (2004) trabalhando com linhagens endogâmicas de milho tropical relataram que o marcador RFLP apresentou maior média de PIC e distância genética quando comparado aos marcadores SSR, RAPD e AFLP. O maior valor de correlação obtido a partir da associação de matrizes de distância genética foi entre o AFLP e RFLP. Exceto o RAPD, os demais marcadores moleculares demonstraram alta correlação da distância genética com o vigor híbrido. Estes resultados reforçam a importância dos marcadores na predição do desempenho híbrido e da heterose a partir de cruzamentos intrapopulacionais com base genética ampla. Além disso, as análises indicaram o AFLP como o mais adequado para a genotipagem e determinação do nível de parentesco genético entre as linhagens estudadas pela elevada acurácia.

Laborda et al. (2005) estudaram a diversidade genética entre linhagens de milho tropical com marcadores AFLP e SSR. Os resultados da análise conjunta foram muito similares com aqueles obtidos para o marcador AFLP individualmente. Neste sentido, a análise conjunta dos marcadores não demonstrou ser a forma mais eficiente de quantificar a variabilidade em germoplasma tropical. Por outro lado, Guimarães et al. (2007) correlacionando a heterose de híbridos com a divergência genética entre linhagens demonstraram correlação significativa entre a heterose e a divergência genética das linhagens endogâmicas de milho através dos marcadores AFLP e SSR. Em contrapartida, a divergência genética estimada não foi suficiente para determinar a melhor capacidade específica de combinação para o rendimento de grãos nos híbridos.

Souza et al. (2008) compararam os marcadores RAPD e SSR na análise da diversidade genética a partir de 16 linhagens de milho tropical. A similaridade genética entre as linhagens para o marcador RAPD variou de 53 a 84 % e de 11 a 82 % para o SSR. A análise de agrupamento a partir do marcador RAPD revelou a formação de 5 grupos, enquanto que o dendograma gerado pelo SSR formou 3 grupos e uma linhagem endogâmica isolada. A correlação entre as matrizes de similaridade genética pelo teste de Mantel foi de 54 %, valor superior ao encontrado por Laborda et al. (2005). Esta diferença pode ser atribuída à expressão diferenciada dos marcadores, número de *primers* utilizados e eficácia relativa entre os marcadores RAPD, SSR e AFLP.

Os objetivos deste trabalho foram estimar a similaridade genética entre as variedades crioulas de milho através da genotipagem molecular com os marcadores RAPD, SSR e AFLP. Agrupar as variedades crioulas através dos índices de similaridade genética bem como estabelecer possíveis relações com os locais de coleta das variedades crioulas.

Material e Métodos

Material vegetal

Para a análise molecular foram utilizadas 48 variedades crioulas de milho das quais: 18 são oriundas do Paraná e 30 do Rio Grande do Sul (Tabela 1).

Análise Molecular

O DNA genômico de cada variedade foi extraído a partir de um *bulk* de folhas jovens coletadas de 15 plantas por variedade. A metodologia de extração seguiu o método CTAB descrito por Hoisington; Khairallah e Gonzalez de Leon (1994), modificado para extração em tubos *epENDORF* de 1,5 mL.

Marcador RAPD

Utilizaram-se 30 *primers* RAPD (Operon Technologies Inc.), os quais inicialmente foram submetidos a testes de gradiente de temperatura na etapa de anelamento, visando adequar a melhor amplificação dos fragmentos para este marcador.

As reações de amplificação para as 48 variedades foram preparadas para um volume de 20 µL contendo 1X tampão Green Go Taq[®] Flexi; 4,0 mM MgCl₂; 0,27 mM de cada dNTP; 0,8 µM de *primer*; 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega, 5 U µL⁻¹) e 40 ng de

DNA molde. As mesmas foram realizadas em termociclador Biocycler, compostas de 1 ciclo de desnaturação inicial por 3 minutos a 94 °C seguido de 45 ciclos de PCR: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica para cada *primer* por 45 segundos, extensão dos fragmentos a 72 °C por 2 minutos e um passo final de extensão a 72 °C por 6 minutos.

Marcador SSR

Para esta análise utilizaram-se 47 pares de *primers* microssatélite (*forward* e *reverse*), representando os 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho. Em média foram analisados 4,7 *primers* por grupo de ligação, com amplitude variando de 4 até 7 *primers*.

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 20 µL contendo 1X tampão Green GoTaq® Flexi; 2,0 mM MgCl₂; 0,1 mM dNTP; 0,2 µM *primer* (*forward* e *reverse*); 0,75 U Taq DNA polimerase (Promega, 5 U µL⁻¹) e 40 ng de DNA molde. Inicialmente, foram otimizados os programas de PCR para cada *primer* SSR a partir do DNA de três variedades de milho (Vermelhão FE 127, Cunha e Crioulo Sabugo Fino). Para a otimização das reações foram utilizados 3 programas, dos quais 2 do tipo “touchdown” (SENIOR et al., 1996; OGLIARI; BOSCARIOL; CAMARGO, 2000) e um normal (YAO et al., 2007a).

Os fragmentos amplificados pelo RAPD e SSR foram corados com GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (0,25 % de azul de bromofenol e 0,4 % de sucrose) na proporção 1:1 e separados em gel de agarose a 2 e 3 %, respectivamente, por aproximadamente 4 h a 80 V. Em cada gel foi adicionado à extremidade esquerda uma amostra de 5,0 µL do marcador de 100 pb. Os géis foram fotodocumentados sob luz UV em aparelho MF-ChemisBis (DNR-BioImaging Systems Ltd).

Marcador AFLP

As variedades crioulas foram genotipadas para 25 combinações de *primers* *EcoRI* + *MseI* de acordo com Vos et al. (1995) e adaptações de Lopes (2003). A amplificação dos fragmentos AFLP consistiu de 4 etapas: 1) Digestão enzimática do DNA genômico com as enzimas *EcoRI* + *MseI*; 2) Ligação dos adaptadores das enzimas de restrição aos fragmentos gerados pela digestão; 3) Pré-amplificação dos fragmentos com *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na posição 3' (94 °C por 2 minutos seguido de 26 ciclos de PCR: 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e um passo final de 72 °C por 5

minutos) e 4) Amplificação seletiva com *primers* contendo três nucleotídeos seletivos na posição 3' (94 °C por 2 minutos seguida de 12 ciclos de PCR: 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Na sequência mais 23 ciclos: 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e um passo final a 72 °C por 2 minutos).

Os produtos das reações de amplificação seletiva foram desnaturados e separados em géis de poliacrilamida 6 %. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X a 80 W de potência por aproximadamente 3 h e 30 minutos em cuba vertical modelo Sequi-Gen® (BIORAD). A metodologia para impregnação pelo íon prata foi baseada no protocolo de Creste; Tulmann Neto e Figueira (2001).

Análise dos dados

Os fragmentos gerados pela genotipagem das 48 variedades crioulas através dos marcadores moleculares RAPD, microssatélite e AFLP foram tabulados numa matriz de dados binários (1 e 0). Da genotipagem molecular apenas os fragmentos polimórficos foram submetidos à análise da similaridade genética a partir do coeficiente de Jaccard. Com base na matriz de similaridade entre as variedades crioulas procedeu-se a análise do agrupamento, utilizando-se o método UPGMA (método da média aritmética não ponderada). As análises de similaridade e de agrupamento foram realizadas individualmente e conjuntamente para os três marcadores através do software NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 1992) e GENES versão 7.0 (CRUZ, 2006). A correlação entre as matrizes de similaridade genética individual e conjunta dos marcadores foi através do teste de Mantel (MANTEL, 1967) no software NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 1992).

Resultados

1 Polimorfismo Molecular

Os trinta *primers* RAPD amplificaram um total de 409 fragmentos, produzindo uma média de 13,6 fragmentos por *primer*, com tamanho aproximado de 160 a 2000 pb. Destes, 335 apresentaram-se polimórficos (81,9 %) e 74 (18,1 %) monomórficos. O número de sequências amplificadas variou de 5 no OPAR – 04 até 21 no OPY – 10. Variações no número de fragmentos polimórficos foram detectadas, desde 3 para o OPAR – 02 até 19 fragmentos para o OPY – 10. A porcentagem mínima de polimorfismo detectada foi para o OPAR – 02 (30 %) e a máxima (100 %) para OPAW – 08, OPY – 04, OPAX – 10, OPAW – 11, OPAT – 08 e OPAR - 16 (Tabela 6). Uma amostra dos fragmentos monomórficos e

polimórficos pode ser visualizada na genotipagem das 48 variedades crioulas de milho com o *primer* OPY - 10 (Figura 2).

A genotipagem das variedades crioulas a partir dos 47 pares de *primers* microssatélites amplificou 134 fragmentos com tamanho aproximado de 100 a 400 pb. Entre os fragmentos amplificados, 105 apresentaram-se polimórficos (78,3 %) e 29 monomórficos (21,7 %). O número total de fragmentos amplificados por *primer* variou de 1 a 7, com média de 2,9 fragmentos. Apenas 8 apresentaram-se monomórficos (Umc 1035, Bnlg 1784, Umc 2036, Umc 1792, Phi 082, Umc 1592, Phi 233376 e Umc 2021) e os demais polimórficos entre as variedades crioulas. Dos microssatélites informativos, 26 revelaram 100 % de polimorfismo entre as variedades analisadas, o restante detectou polimorfismos variando na ordem de 33,3 (Umc 1463) a 66,7 % (Phi 034, Umc 1519 e Bnlg 640) como mostra a Tabela 7. Perfil monomórfico e polimórfico dos fragmentos amplificados pelo Umc 1519 pode ser visualizado entre as variedades de milho, com fragmentos aproximados de 120, 190 e 400 pb (Figura 3).

A genotipagem das variedades crioulas com 25 combinações de *primers* *EcoRI/MseI* do marcador AFLP gerou 1889 fragmentos, com tamanho aproximado de 47 até 1153 pb. O número médio de fragmentos amplificados por *primer* foi de 75,6; com amplitude de 42 (*E-ATC/M-CGC*) a 106 (*E-ACA/M-CAT*). Dos fragmentos amplificados, 1127 foram monomórficos (59,7 %) e 762 polimórficos (40,3 %). Das 25 combinações genotipadas, 13 revelaram índice de polimorfismo abaixo de 40 %. Por outro lado, 5 combinações revelaram polimorfismo superior a 52,7 %, com destaque positivo para *E-ACA/M-CGC* (67,8 %) e *E-AGT/M-CGC* (65,5 %). O menor polimorfismo (20 %) foi obtido com *E-ATC/M-CTC* (Tabela 8). A Figura 4 apresenta uma amostra dos fragmentos amplificados através da combinação *E-AGA/M-CAC* para as 48 variedades crioulas de milho.

Uma maneira eficiente de avaliar a capacidade dos marcadores moleculares na geração de polimorfismo diz respeito à determinação do número de fragmentos polimórficos amplificados em relação ao número de *primers* (iniciadores) utilizados. O marcador AFLP destacou-se dos demais por amplificar em média 30,5 fragmentos polimórficos/*primer* equivalendo de 3 a 14 vezes ao polimorfismo detectado pelos marcadores RAPD e SSR, respectivamente (Tabelas 6, 7 e 8).

2 Similaridade Genética entre as variedades crioulas de milho

A partir das estimativas de similaridade genética utilizando o coeficiente de Jaccard, observou-se similaridade média para o marcador RAPD de 57 %, com amplitude de 46 até 70 %. A População Nonoai (V28) combinada com a Dente de Ouro (V45), a Crioulo Rosa (V34) e a Crioulo Palha Roxa (V48) foram as que apresentaram a menor similaridade genética. Por outro lado, a combinação Asteca (V6) e Caiano (V7) detectou o maior índice de similaridade genética (Tabela 9 e Anexo I).

Entre todos os pares de variedades analisados através do marcador microssatélite a média de similaridade estimada foi de 56 %. Os índices gerados para o marcador SSR revelaram apenas a combinação Branco (V42) com a Crioulo Palha Roxa (V48) como as mais divergentes, com índice mínimo de similaridade genética de 41 %. Por outro lado, a similaridade genética máxima (76 %) foi observada quando analisada a combinação das variedades Nutricional (V1) e Branco para Palha (V9) (Tabela 9 e Anexo II).

Os valores estimados dos coeficientes de similaridade genética para o marcador AFLP e para a análise conjunta dos marcadores foram muito semelhantes entre si. Os coeficientes de similaridade genética para o AFLP variaram entre os pares de 59 a 89 %, com média de 74 % (Tabela 9 e Anexo III), enquanto para a análise conjunta os valores variaram de 58 até 81 %, com média de 69 % (Tabela 9 e Anexo IV). De maneira geral, as variedades Branco (V16) e Branco Dentado (V38) apresentaram a menor similaridade entre todos os pares de variedades. Da mesma forma, na análise conjunta a combinação da variedade Branco (V16) com as variedades Branco Dentado (V38), População Nonoai (V28) e Crioulo 8 Carreiras (V31) revelaram o menor índice de similaridade genética. Por outro lado, o par Branco (V16) e Carioca (V11) destacaram-se pela maior similaridade genética entre todos os pares de combinações para o AFLP (89 %) e para a análise conjunta dos marcadores (81 %).

Os menores e maiores valores, as médias e a amplitude dos coeficientes de similaridade genética, entre as 48 variedades de milho, para os marcadores RAPD, SSR, AFLP e para a análise conjunta estão apresentados na Tabela 9. Observa-se que os marcadores RAPD e microssatélite detectaram coeficientes de similaridade genética muito semelhantes, com média de 57 e 56 %, respectivamente. Estes coeficientes foram superiores entre os pares de variedades comparados aos índices referentes ao marcador AFLP e à análise conjunta, com média de 74 e 69 %, respectivamente.

3 Análise de agrupamento

Os dendogramas baseados nos índices de similaridade genética obtidos através dos marcadores RAPD, microssatélite e AFLP (individual e conjunta) foram utilizados para a análise de agrupamento pelo método UPGMA (média aritmética não ponderada), com intuito de ilustrar as possíveis associações entre os pares de variedades crioulas analisadas neste estudo.

Os dendogramas construídos a partir dos dados de similaridade genética dos marcadores RAPD (Figura 5) e SSR (Figura 6) mostraram que as 48 variedades de milho crioulo foram separadas em 8 grupos heteróticos, sendo que 6 variedades (V27, V32, V16, V31, V34 e V28) não se agruparam no RAPD e apenas a variedade Pérola (V10) permaneceu isolada no SSR.

Os dados da análise de similaridade genética resultantes do marcador AFLP foram bem contrastantes se comparado aos observados para os marcadores RAPD e SSR em relação ao número de agrupamentos e a quantidade de variedades isoladas visualizadas no dendograma. A análise do dendograma evidenciou a formação de apenas 6 grupos heteróticos compostos por 27 variedades crioulas e um número significativo de genótipos (21) que permaneceram isolados no agrupamento (Figura 7).

O dendograma resultante da análise conjunta dos dados de similaridade genética apresentou a mesma topologia da árvore obtida para o marcador AFLP. De maneira geral, a análise conjunta possibilitou agrupar variedades que encontravam-se isoladas no AFLP levando à formação do grupo heterótico G. As demais alterações no agrupamento dizem respeito à inclusão e/ou exclusão de genótipos nos grupos B, C e E. Por outro lado, os grupos heteróticos D e F mantiveram-se com o mesmo número de genótipos no agrupamento, embora a representação tenha sido completamente alterada em relação ao AFLP (Figura 8).

A análise de correlação entre as matrizes de similaridade genética obtida para cada marcador molecular e para a análise conjunta através do teste de Mantel (MANTEL, 1967) possibilitou determinar as possíveis associações entre os índices de similaridade genética gerados bem como confirmar os resultados obtidos pela análise de agrupamento das variedades crioulas de milho. O maior valor de correlação obtido a partir da associação de matrizes de similaridade genética foi observado para a comparação AFLP e análise conjunta com coeficiente de 96 %. A segunda maior associação entre matrizes (66 %) foi obtida na

comparação RAPD e conjunta. Valores intermediários de correlação (46 e 44 %) foram observados para as associações RAPD x AFLP e SSR x conjunta, respectivamente. Os resultados da análise evidenciaram baixa associação entre as matrizes de similaridade genética para RAPD x SSR e SSR x AFLP com apenas 31 e 30 % de correlação, respectivamente (Tabela 10).

Discussão

Os recursos genéticos vegetais constituem um dos principais patrimônios que a humanidade deve preservar. A variabilidade genética é a base para os programas de melhoramento, os quais buscam de forma contínua novas características desejáveis agronomicamente. Conhecer a diversidade genética é fator limitante para o progresso da agricultura, principalmente no que concerne a plantas de interesse econômico. Os resultados revelaram que os marcadores moleculares foram eficientes na estimativa da variabilidade genética existente entre as 48 variedades crioulas analisadas.

Neste trabalho o número de fragmentos amplificados com os *primers* RAPD foi superior ao encontrado por Carvalho et al. (2004) ao avaliar 81 variedades de milho com 32 *primers*, da mesma forma que Garcia et al. (2004) e Lanza et al. (1997), ao estudar a divergência genética entre 18 linhagens endogâmicas de milho. Adicionalmente, a porcentagem de polimorfismo obtida foi semelhante à encontrada por Bruel et al. (2007), Lanza et al. (1997) e Souza et al. (2008). Por outro lado, Carvalho et al. (2004), Moeller e Schaal (1999) e Rinaldi et al. (2007) obtiveram índices de polimorfismo inferiores, com amplitude de 71 a 76 %. O número de fragmentos polimórficos por *primer* (11,2) está de acordo com o encontrado por Bruel et al. (2006) e Moller e Schaal (1999), embora proporções inferiores tenham sido relatadas (CARVALHO et al., 2004; LANZA et al., 1997; RINALDI et al., 2007). Possivelmente estas diferenças encontradas quanto ao número de fragmentos amplificados bem como a porcentagem de polimorfismo em relação aos dados da literatura estejam associadas à base genética dos diferentes genótipos de milho analisados, ou ainda, aos ajustes necessários a adequação da metodologia entre os laboratórios para este marcador.

A genotipagem com o marcador microsatélite permitiu identificar 134 fragmentos, com média de 2,9 fragmentos por *primer*, da mesma forma que Garcia et al. (2004) e Barbosa et al. (2003) que encontraram o mesmo número de alelos por *loci* em linhagens de milho através de 68 pares de *primers* SSR. Xiang et al. (2010) estudando a diversidade entre variedades crioulas de milho com 41 *primers* SSR encontraram uma média de 6,9 alelos por

loci, do mesmo modo que Yao et al. (2007a). Valores muito diferenciados em relação ao número de alelos por *loci* foram relatados por Yang et al. (2011) onde 82 *primers* SSR geraram em média 8,2 alelos por *loci* e por Eschholz et al. (2008) que obtiveram em média 10,8 alelos por *loci* com apenas 10 *primers* SSR em germoplasma de milho doce. A porcentagem de polimorfismo encontrada no presente trabalho foi semelhante a relatada por Xiang et al. (2010) e muito abaixo da observada por Yao et al. (2007a), com 97 % de polimorfismo. Em relação ao número de fragmentos polimórficos por *primer*, o valor encontrado neste trabalho (2,2) foi inferior ao observado por Adeyemo et al. (2011) e Yao et al. (2008).

As diferenças quanto ao número de fragmentos e a porcentagem de polimorfismo descritos na literatura possivelmente estão associadas ao tipo de matriz (agarose ou poliacrilamida) utilizada na separação dos fragmentos (PINTO et al., 2001). Esta constatação fica evidenciada nos trabalhos de Yao et al. (2007a) e de Xiang et al. (2010) que relataram maior número de alelos por *loci* para este marcador utilizando matriz de poliacrilamida. Além disso, Kostova et al. (2006) afirmaram que no caso dos SSR o uso de repetições de dinucleotídeos pode produzir um maior número de alelos, o que está de acordo com o encontrado por Yang et al. (2011) e Eschholz et al. (2008) ao utilizarem 44 e 50 % do total dos *primers* que amostram essas regiões de repetição, respectivamente. No presente estudo 38 % dos *primers* SSR apresentaram repetições de dinucleotídeos. Possivelmente, o menor número de fragmentos por *loci* seja devido ao menor número de *primers* que amostram essas regiões.

Os resultados obtidos com o marcador AFLP, 1889 fragmentos a partir de 25 combinações de *primers* *EcoRI/MseI*, foi muito superior a maioria dos trabalhos, os quais mostraram amplitude de 278 até 638 fragmentos, utilizando em média apenas 8 combinações de *primers* (LEGESSE et al., 2008; LABORDA et al., 2005; HARTINGS et al., 2008; KIULA; LYIMO; BOTHA, 2008). Os trabalhos de Barbosa et al. (2003) e Garcia et al. (2004) foram os que mais se aproximaram em relação ao número de *primers* analisados (20 combinações) embora o número de fragmentos amplificados tenha sido respectivamente 1100 e 774. A porcentagem de polimorfismo (40,3 %) está muito abaixo da relatada por diversos autores como Barbosa et al. (2003), Legesse et al. (2008) e Kiula; Lyimo e Botha (2008). Por outro lado, o número de fragmentos polimórficos por *primer* (30,5) está de acordo com Hartings et al. (2008) e Barbosa et al. (2003) embora proporções superiores tenham sido

detectadas (LABORDA et al., 2005; LEGESSE et al., 2008; KIULA; LYIMO; BOTHA, 2008).

As diferenças nestes resultados podem ser o reflexo do número de combinações de *primers* utilizados, os quais superaram a literatura encontrada em estudos de diversidade genética de milho, aliado à ausência de seleção prévia das melhores combinações de *primers* visando aumentar a porcentagem de polimorfismo. Ou seja, das 25 combinações (*EcoRI* + *MseI*) disponíveis todas foram utilizadas para genotipar o conjunto das variedades crioulas. Segundo Caixeta et al. (2009) as diferentes combinações de enzimas de restrição além de variar a complexidade do padrão dos fragmentos, podem afetar o número de *loci* polimórficos produzidos.

Ao analisar os índices de polimorfismo gerados para cada marcador molecular percebe-se que o SSR e o RAPD revelaram as maiores porcentagens de polimorfismo (78,3 e 74,1 %, respectivamente), o que está de acordo com Caixeta et al. (2009) ao afirmarem que em geral o nível de polimorfismo detectado pelo AFLP é menor que o detectado por outros marcadores, como os microssatélites. Entretanto, quando avalia-se a eficiência dos diferentes marcadores na geração de polimorfismo, destaca-se o AFLP com média de 30,5 fragmentos polimórficos por *primer*. Estes resultados indicam eficiência relativa de 3 vezes ao RAPD e de 14 vezes ao microssatélite, o que concorda com Caixeta et al. (2009), Gerber et al. (2000) e Vos e Kuiper (1997), os quais afirmam que um pequeno número de combinações de *primers* AFLP é suficiente para gerar um número adequado de fragmentos polimórficos nas análises.

Outros aspectos importantes a serem considerados dizem respeito ao número de acessos analisados, a base genética do germoplasma (temperado ou tropical) e principalmente à região genômica que cada marcador molecular está amostrando. De maneira geral, quanto maior o número de acessos estudados bem como provenientes de base genética ampla espera-se maiores porcentagens de polimorfismo. As diferenças inerentes aos marcadores também devem ser consideradas. Por exemplo, os RAPD`s utilizam *primers* curtos (10 nucleotídeos) de sequência aleatória, ao passo que os SSR`s utilizam *primers* específicos (20 a 25 pb) para as regiões que flanqueiam os microssatélites. Por outro lado, o AFLP combina a especificidade das enzimas de restrição com a amplificação exponencial do PCR.

O número de fragmentos amplificados bem como os índices de diversidade confirmam a ampla base genética das variedades crioulas. As amplitudes de diversidade genética estimadas entre o conjunto de variedades, 30 a 54 % para o RAPD e 24 a 59 % para o

microssatélite, reforçam a hipótese inicial da existência de grande variabilidade genética disponível entre os acessos de milho crioulo. Muitas vezes fragmentos amplificados pelos marcadores RAPD e SSR apresentam diferenças muito pequenas em relação ao número de pares de bases e por serem tradicionalmente resolvidos em géis de agarose não conseguem ser adequadamente genotipados nesta matriz. Neste sentido, a separação de fragmentos com pequenas diferenças (1 pb) poderia ser melhor resolvida em géis de alta resolução, através da matriz de poliacrilamida.

A baixa diversidade genética entre os acessos de milho obtida pelo marcador AFLP em relação ao RAPD e ao SSR possivelmente esteja associada aos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *MseI* estarem em regiões altamente conservadas no genoma destas variedades crioulas de milho. Segundo Mank et al. (1999) analisando a distribuição dos fragmentos AFLP no genoma do milho através de diferentes combinações de enzimas de restrição com níveis variáveis de metilação revelaram que os agrupamentos de fragmentos são prioritariamente co-localizados nas regiões centroméricas dos cromossomos em milho, principalmente quando são utilizadas as combinações do tipo: *EcoRI/MseI* e *^mPstI/MseI* enquanto a combinação *PstI/MseI* gera fragmentos aleatoriamente mais dispersos pelo genoma. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura utilizam a combinação *EcoRI/MseI* para a amplificação de fragmentos com o marcador AFLP. Além disso, de acordo com Jansen et al. (1996) a combinação *EcoRI/MseI* é mais adequada para genomas pobres em guanina + citosina (G+C), *HindIII/MseI* para genomas com conteúdo intermediário de G+C (40 a 50 %) e *ApaI/TaqI* para genomas ricos em G+C.

Resultados semelhantes ao marcador AFLP foram obtidos a partir da análise conjunta dos três marcadores, demonstrando claramente que o AFLP sozinho sobressaiu em relação aos demais marcadores na análise conjunta. Esta constatação está de acordo com Laborda et al. (2005) onde as estimativas de diversidade baseadas no AFLP foram pouco correlacionadas com as do SSR. Os autores preconizaram que a análise conjunta (AFLP + SSR) não foi a forma mais eficiente de avaliar a variabilidade entre acessos de origem tropical. Essas evidências são confirmadas pela elevada correlação (96 %) das matrizes de similaridade entre o AFLP e a análise conjunta dos marcadores.

A correlação das matrizes de similaridade genética entre o RAPD e o AFLP (46 %) e RAPD e SSR (31 %) está de acordo com o obtido por Garcia et al. (2004). Os autores afirmam que o RAPD foi o marcador mais divergente em relação ao RFLP, AFLP e SSR,

enquanto os demais mostraram padrões de associações mais elevados entre si. Por outro lado, os marcadores SSR e AFLP foram os que apresentaram o menor valor de correlação neste estudo (30 %), abaixo do observado por Laborda et al. (2005) e muito inferior ao encontrado por Barbosa et al. (2003) e Garcia et al. (2004).

Laborda (2003) estudando linhagens de milho tropical através dos marcadores SSR e AFLP afirmou que a discrepância dos resultados entre as técnicas pode ser o resultado de diferenças na taxa de evolução para cada marcador. Por exemplo, Vigouroux et al. (2002) afirmaram que os SSR's mutam numa taxa de 10^{-3} enquanto os AFLP's numa taxa de 10^{-6} (MARIETTE et al., 2002). Possivelmente, estas diferenças na taxa de mutação repercutem numa avaliação diferencial do genoma em relação à genotipagem com estes marcadores. Provavelmente, a menor variabilidade genética entre as variedades crioulas expressas pelo marcador AFLP em relação ao SSR possa ser reforçada por este fato, uma vez que a similaridade genética estimada pelo SSR foi ligeiramente inferior ao obtido com o AFLP. Em contrapartida, a amplitude de variação dos valores da diversidade foi maior no SSR em comparação ao AFLP. Esses resultados confirmam a hipótese que os SSR's possuem maior capacidade de explorar a diversidade, revelando maior polimorfismo e consequentemente amostrando maior variabilidade genética entre os acessos de milho crioulo.

Os dendogramas construídos com os dados de similaridade obtidos a partir de cada marcador ilustraram algumas discrepâncias. Analisando os agrupamentos de forma geral, observa-se que as combinações de variedades crioulas que apresentaram os maiores índices de similaridade genética a partir do AFLP e da análise conjunta foram a Asteca (V6) com a Carioca (V11); para o SSR: Nutricional (V1) com Branco para Palha (V9) e para o RAPD: Asteca (V6) com Caiano (V7). Por outro lado, percebe-se nos agrupamentos combinações de variedades que poderiam maximizar a heterose a partir de esquemas de cruzamentos artificiais pelos programas de melhoramento. Por exemplo, no RAPD as variedades crioulas do grupo A com as variedades isoladas: População Nonoai (V28), Crioulo Rosa (V34) e Crioulo 8 Carreiras (V31). Para o microssatélite, a maior heterose poderia ser esperada a partir do cruzamento de genótipos do grupo A com aqueles do grupo H (V25, V32 e V41). Os dendogramas gerados pelo AFLP e análise conjunta revelaram a mesma topologia de árvore com pequenas alterações. Particularmente, esquemas de cruzamentos envolvendo o grupo A em relação aos genótipos isolados mais distantes possibilitariam maior sucesso na geração de variabilidade genética possibilitando maximizar a exploração da heterose e a segregação nestes cruzamentos.

As discrepâncias nos dendogramas gerados pelos três marcadores e pela análise conjunta se devem principalmente ao fato dos três acessarem regiões distintas no genoma. As variedades que se mantiveram no mesmo grupo (A) nos 4 dendogramas foram Nutricional (V1), Milho Grande (V2), Palha Roxa (V3) e Paiol (V4), indicando alta similaridade genética entre estes acessos independentemente do marcador analisado. Comparando os dendogramas obtidos através do RAPD e SSR percebe-se um número maior de variedades crioulas mantidas no mesmo grupo (A): Branco (V5), Asteca (V6), Caiano (V7), Branco para Palha (V9), Carioca (V11), Vinten (V13), Encantilado (V15), Amarelo Antigo (V17) e Crioulo 8 Carreiras (V18).

O dendograma obtido através do marcador AFLP foi muito semelhante ao da análise conjunta. Em ambos, no grupo B doze variedades mantiveram-se em comum (V1, V11, V12, V13, V14, V15, V17, V18, V19, V20, V23 e V30); no Grupo C duas (V46 e V47) e no Grupo E apenas a variedade Caiano FE 121 (V37). Da mesma forma, onze variedades crioulas isoladas no dendograma (AFLP) foram as mesmas da análise conjunta (V39, V24, V25, V43, V31, V40, V8, V38, V42, V27 e V16). As variedades Branco (V16), Branco Dentado (V38) e Crioulo 8 Carreiras (V31) foram as mais divergentes a partir da análise de similaridade genética bem como através da análise de agrupamento.

Em relação aos locais de coleta das variedades crioulas foi possível observar que em dois dendogramas (RAPD e AFLP) houve o predomínio de grupos formados exclusivamente por genótipos oriundos do RS, seguido de agrupamentos com genótipos apenas do PR (AFLP) ou de ambos os locais (AFLP e RAPD). No dendograma resultante do SSR predominaram grupos com variedades procedentes das duas localidades (5) e apenas 3 com genótipos exclusivos do RS. Por outro lado, a partir da análise conjunta dos marcadores houve a formação de 3 grupos provenientes apenas do RS, 2 exclusivos do PR e 2 com genótipos de ambos os locais de coleta. Fato interessante pode ser visualizado no grupo A para o dendograma do RAPD e do SSR. Particularmente, neste grupo houve um predomínio de variedades crioulas oriundas do PR em relação ao RS (15:1 e 13:5, respectivamente). Possivelmente a presença de variedades do RS neste grupo seja devido às variedades do PR terem sido introduzidas no passado através da colonização gaúcha neste estado. Mesmo assim observou-se a formação de grupos exclusivos do PR, possivelmente pela fixação regional de alelos diferenciados durante a expansão geográfica dessas variedades pelo isolamento das mesmas através de barreiras físicas ao fluxo gênico entre os diferentes locais. Além disso, a conscientização dos agricultores familiares para não misturar as sementes provavelmente

contribuíram muito para o agrupamento prioritário das variedades de acordo com os locais de coleta.

De maneira geral, o marcador AFLP sobressaiu em relação aos demais marcadores na análise conjunta. A provável explicação deve-se ao número não igualitário de fragmentos polimórficos utilizados para a análise conjunta entre os marcadores. Neste contexto, o AFLP representou 63 % dos fragmentos presentes na análise conjunta em relação aos fragmentos do RAPD e SSR. Este fato justificaria a elevada correlação entre as matrizes de similaridade genética do AFLP e análise conjunta bem como os valores medianos a baixos entre os marcadores individuais.

A estabilidade do dendograma é um aspecto importante a ser considerado nos estudos que envolvem o agrupamento de genótipos através de índices de similaridade/dissimilaridade genética (CARVALHO et al., 2004). A análise da diversidade genética envolvendo diferentes linhagens de milho tropical evidenciou que a partir de 150 fragmentos polimórficos foi suficiente para estabilizar o agrupamento das respectivas linhagens (LANZA et al., 1997; PEJIC et al., 1998). A análise de *bootstrap* realizada por Barbosa et al. (2003) e Garcia et al. (2004) indicaram que para estabilizar o coeficiente de variação a 10 % seria necessário obter pelo menos 262 (RAPD), 232 (AFLP) e apenas 29 fragmentos polimórficos para o SSR. O número de fragmentos polimórficos utilizados nas análises foi de 335 para o RAPD, 762 para o AFLP e 105 para o SSR. Neste sentido, confirma-se que o número de fragmentos utilizados foi muito superior ao recomendado para obter informações precisas a respeito dos índices de similaridade genética bem como promover a estabilidade da análise de agrupamento das variedades crioulas de milho.

As variações em uma população são induzidas pela ocorrência de mutações, recombinação meiótica e introgressões gênicas. Por outro lado, a deriva genética e seleção natural/artificial são responsáveis pela redução da diversidade genética existente em qualquer espécie. Ao longo dos anos, esses fatores associados permitiram o desenvolvimento de inúmeras variedades de polinização aberta com elevada adaptação aos nichos ecológicos que foram rotineiramente desenvolvidas.

Embora em poucos pares de combinações de variedades crioulas os índices de similaridade genética tenham sido elevados, a maioria revelou elevada diversidade genética a partir da genotipagem com os três marcadores moleculares. Estes resultados são confirmados quando leva-se em consideração a caracterização agrônômica destes acessos (MATIELLO et.

al., 2010; ARAÚJO; NASS, 2002). Além disso, destacam-se positivamente como fonte de variabilidade genética para características de interesse agrônomo até então pouco explorada neste germoplasma como: resistência a podridão do colmo (MATIELLO et al., 2006), tolerância ao alumínio tóxico (COELHO, 2011) e precocidade reprodutiva (MATIELLO et al., 2010). Neste sentido, a genotipagem molecular através de diferentes marcadores juntamente com a caracterização agrônoma destes acessos crioulos permitirão prospectar novos genes de interesse econômico, indicar os cruzamentos mais promissores visando maximizar a heterose, bem como preservar parte desta variabilidade genética até então pouco utilizada pelos programas de melhoramento genético da cultura.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da Fundação Araucária (protocolo número 15520/2009) e pela concessão de bolsa de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico.

Tabela 6 - Relação dos *primers* RAPD's, número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por *primer*. Ponta Grossa, 2012.

<i>Primer</i>	Sequência	Fragmentos	Monomórficos	Polimórficos	Polimorfismo (%)
01) OPAR - 04	5'- CCAGGAGAAG -3'	5	1	4	80,0
02) OPAW - 10	5' - GTTGTGTTGCC - 3'	18	3	15	83,3
03) OPAV - 13	5' - CTGACTTCCC - 3'	11	2	9	81,8
04) OPAW - 19	5' - GGACACAGAG - 3'	13	4	9	69,2
05) OPAV - 19	5' - CTCGATCACC - 3'	14	3	11	78,6
06) OPAW - 08	5' - CTGTCTGTGG - 3'	8	0	8	100,0
07) OPAR - 05	5' - CATACCTGCC - 3'	12	4	8	66,7
08) OPAW - 14	5' - GGTTCTGCTC - 3'	18	3	15	83,3
09) OPW - 08	5' - GACTGCCTCT - 3'	15	6	9	60,0
10) OPAU - 12	5' - CCACTGGTCT - 3'	17	3	14	82,6
11) OPY - 10	5' - CAAACGTGGG - 3'	21	2	19	90,5
12) OPAD - 14	5' - GAACGAGGGT - 3'	16	2	14	87,5
13) OPW - 09	5' - GTGACCGAGT - 3'	13	5	8	61,5
14) OPAM - 01	5' - TCACGTACGG - 3'	8	4	4	50,0
15) OPAR - 02	5' - CACCTGCTGA - 3'	10	7	3	30,0
16) OPAR - 15	5' - ACACTCTGCC - 3'	14	4	10	71,4
17) OPY - 04	5' - GGCTGCAATG - 3'	18	0	18	100,0
18) OPE - 18	5' - CGACTGCAGA - 3'	10	4	6	60,0
19) OPAV - 03	5' - TGTAGCCGTG - 3'	9	2	7	77,8
20) OPW - 13	5' - CACAGCGACA - 3'	20	2	18	90,0
21) OPP - 05	5' - CCCCCGTAAC - 3'	13	3	10	76,9
22) OPAD - 06	5' - AAGTGACACGG - 3'	13	1	12	92,3
23) OPAX - 10	5' - CCAGGCTGAC - 3'	13	0	13	100,0
24) OPAW - 11	5' - CTGCCACGAG - 3'	17	0	17	100,0
25) OPAT - 08	5' - TCCTCGTGGG - 3'	12	0	12	100,0
26) OPAX - 07	5' -ACGCGACAGA - 3'	15	3	12	80,0
27) OPAK - 15	5' - ACCTGCCGTT - 3'	12	3	9	75,0
28) OPAW - 07	5' - AGCCCCCAAG - 3'	17	2	15	88,2
29) OPAR - 16	5' - CCTTGCGCCT - 3'	14	0	14	100,0
30) OPY - 09	5' - AGCAGCGCAC - 3'	13	1	12	92,3
Total		409	74	335	81,9
Fragmentos Polimórficos/ <i>Primer</i>				11,2	

Tabela 7 - Relação dos *primers* microssatélites, número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por *primer*. Ponta Grossa, 2012.

Nº	Primer	Grupo/Bin	Motivo Repetido	Fragmentos	Monomórficos	Polimórficos	Polimorfismo (%)
1	Bnlg 149	1/00	Indeterminado	2	0	2	100
2	Bnlg 1007	1/02	(AG) 15	3	0	3	100
3	Umc 1035	1/06	(CT) 19	1	1	0	0
4	Bnlg 131	1/11	Indeterminado	5	0	5	100
5	Bnlg 125	2/02	Indeterminado	3	0	3	100
6	Umc 1884	2/05	(TC) 8	5	0	5	100
7	Bnlg 1045	2/07	(AG) 17	5	0	5	100
8	Phi 101049	2/10	(AGAT)	3	0	3	100
9	Umc 2118	3/00	(CTTT) 4	3	0	3	100
10	Umc 1223	3/04	(AG) 7	3	0	3	100
11	Bnlg 197	3/06	Indeterminado	2	1	1	50
12	Umc 1136	3/10	(GCA) 5	2	0	2	100
13	Umc 1759	4/01	(CGG) 4	7	4	3	42,8
14	Umc 2176	4/03	(TGC) 4	3	0	3	100
15	Bnlg 490	4/04	Indeterminado	2	0	2	100
16	Bnlg 2291	4/06	(AG) 17	3	0	3	100
17	Bnlg 1784	4/07	(AG) 13	1	1	0	0
18	Bnlg 1565	4/09	(AG) 27	5	0	5	100
19	Bnlg 1337	4/11	(AG) 21	6	0	6	100
20	Umc 2036	5/01	(GTC) 4	1	1	0	0
21	Bnlg 557	5/03	Indeterminado	2	1	1	50
22	Umc 1348	5/05	(CA) 7	2	1	1	50
23	Umc 1792	5/08	(CGG) 5	1	1	0	0
24	Umc1829	5/09	(AG) 10	4	0	4	100
25	Bnlg 249a	6/01	Indeterminado	3	0	3	100
26	Phi 077	6/01	(AG)	2	0	2	100
27	Umc 1887	6/04	(CGA) 4	2	1	1	50
28	Phi 452693	6/04	(AGCC)	2	0	2	100
29	Umc 1463	6/06	(ACA) 6	3	2	1	33,3
30	Bnlg 1292	7/01	(AG) 14	4	0	4	100
31	Phi 034	7/02	(CCT)	3	1	2	66,7
32	Bnlg 434	7/03	Indeterminado	3	0	3	100
33	Phi 082	7/05	(AG)	1	1	0	0
34	Umc 1799	7/06	(TG) 12	5	0	5	100
35	Umc 1592	8/01	(CA)	2	2	0	0
36	Phi 115	8/03	(AT/ATAC)	2	0	2	100
37	Bnlg 240	8/06	Indeterminado	2	0	2	100
38	Phi 015	8/08	(AAAC)	4	2	2	50
39	Phi 233376	8/09	(CCG)	1	1	0	0
40	Umc 2084	9/01	(CTAG) 4	3	0	3	100
41	Phi 065	9/03	(CACTT)	2	1	1	50
42	Phi 027	9/03	(GCGCT)	2	0	2	100
43	Umc 1519	9/04	(TC) 8	3	1	2	66,7
44	Umc 1319	10/01	(ACC) 5	2	1	1	50
45	Bnlg 640	10/03	Indeterminado	3	1	2	66,7
46	Bnlg 1250	10/05	(AG) 30	4	2	2	50
47	Umc 2021	10/07	(TGG) 4	2	2	0	0
Total				134	29	105	78,3
Fragmentos Polimórficos/ <i>Primer</i>						2,2	

Tabela 8 - Relação das combinações de *primers* AFLP's *EcoRI* (E) + *MseI* (M), número total de fragmentos amplificados, número de fragmentos monomórficos, número de fragmentos polimórficos, porcentagem de polimorfismo e número de fragmentos polimórficos por *primer*. Ponta Grossa, 2012.

Nº	<i>Primers</i>	Fragmentos	Monomórficos	Polimórficos	Polimorfismo (%)
1	E-AGC/M-CCA	64	30	34	53,1
2	E-ATC/M-CCA	90	50	40	44,4
3	E-AGC/M-CAC	68	37	31	45,6
4	E-ACA/M-CAC	81	57	24	29,6
5	E-ATC/M-CAC	89	59	30	33,7
6	E-ACA/M-CCA	93	58	35	37,6
7	E-AAC/M-CAC	82	38	44	53,7
8	E-AGT/M-CAC	92	60	32	34,8
9	E-AAC/M-CAC	88	45	43	48,9
10	E-AGT/M-CCA	55	40	15	27,3
11	E-AGT/M-CGC	58	20	38	65,5
12	E-ATC/M-CGC	42	26	16	38,1
13	E-AGC/M-CGC	73	41	32	43,8
14	E-ACA/M-CGC	59	19	40	67,8
15	E-AAC/M-CGC	55	26	29	52,7
16	E-AGT/M-CTC	66	38	28	42,4
17	E-AGC/M-CTC	72	47	25	34,7
18	E-ATC/M-CTC	60	48	12	20,0
19	E-ACA/M-CTC	77	50	27	35,1
20	E-AAC/M-CTC	91	60	31	34,1
21	E-AGT/M-CAT	67	50	17	25,4
22	E-ATC/M-CAT	84	60	24	28,6
23	E-AGC/M-CAT	98	57	41	41,8
24	E-ACA/M-CAT	106	63	43	40,6
25	E-AAC/M-CAT	79	48	31	39,2
Total		1889	1127	762	40,3
Fragmentos Polimórficos/ <i>Primer</i>				30,5	

Tabela 9 - Valores mínimos, máximos, amplitude e média da similaridade genética obtida através dos marcadores RAPD, SSR, AFLP e da análise conjunta. Ponta Grossa, 2012.

Marcador	Mínimo	Variedades	Máximo	Variedades	Amplitude	Média
RAPD	0,46	V28 e V45 V28 e V34 V28 e V48	0,70	V6 e V7	0,24	0,57
SSR	0,41	V42 e V48	0,76	V1 e V9	0,35	0,56
AFLP	0,59	V16 e V38	0,89	V6 e V11	0,30	0,74
CONJUNTA	0,58	V16 e V38 V16 e V28 V16 e V31	0,81	V6 e V11	0,23	0,69

Tabela 10 – Valores de correlação entre as matrizes de similaridade genética dos marcadores RAPD, SSR, AFLP e análise conjunta. Ponta Grossa, 2012.

Matriz	SSR	AFLP	Conjunta
RAPD	0,31	0,46	0,66
SSR		0,30	0,44
AFLP			0,96

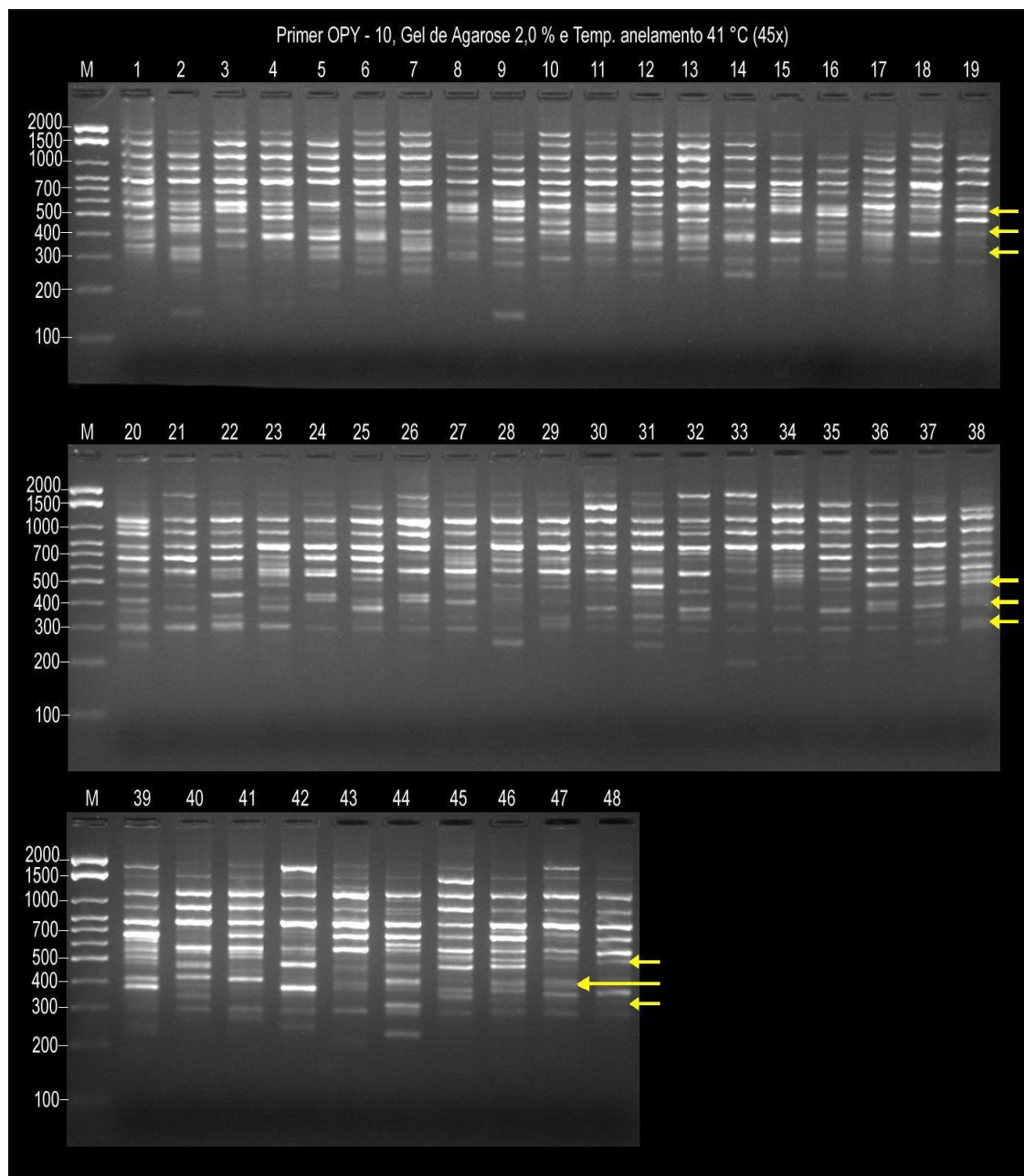


Figura 2 - Gel de agarose 2 % mostrando fragmentos de DNA amplificados através do *primer* RAPD “OPY - 10”. Poços de nº 1 a 48 referem-se às 48 variedades crioulas de milho. As setas indicam fragmentos polimórficos entre as variedades crioulas. M: marcador molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2012.

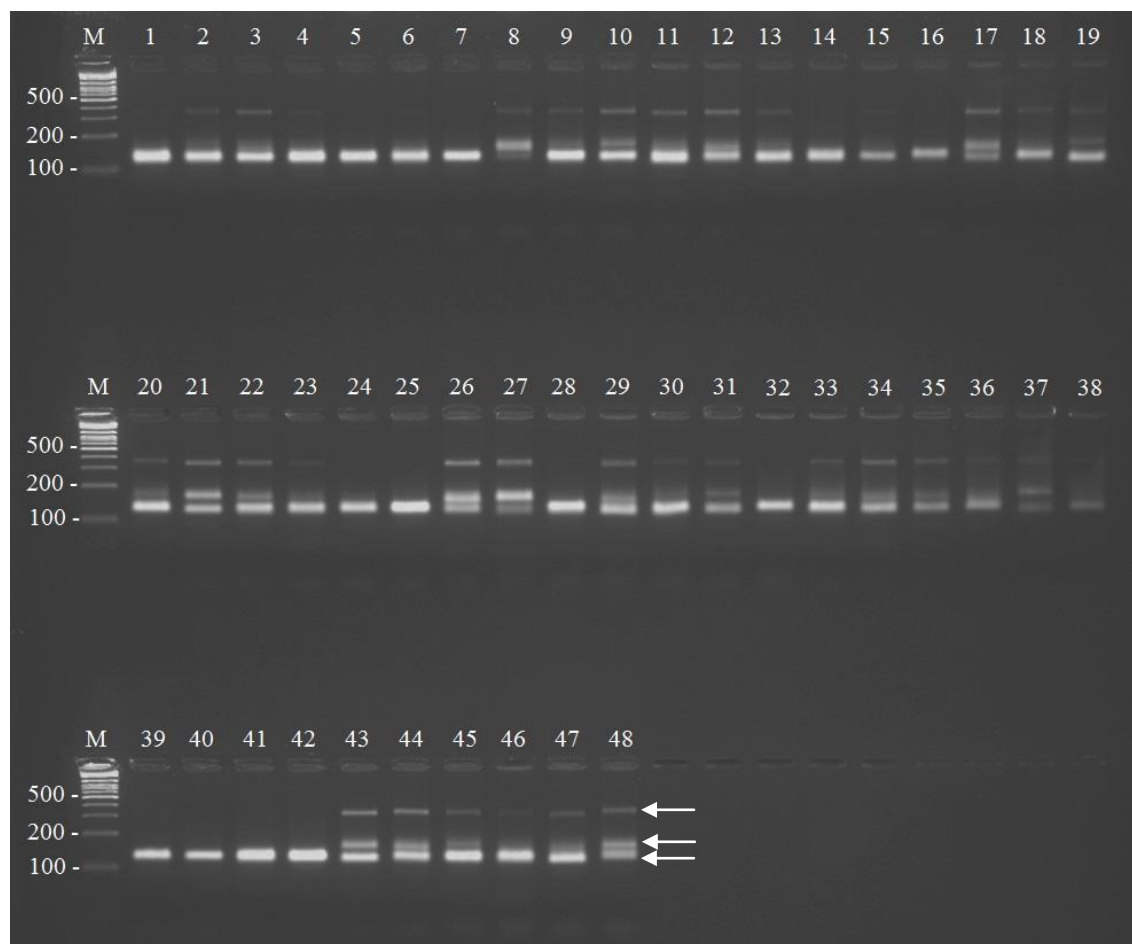


Figura 3 - Gel de agarose 3 % mostrando os fragmentos monomórficos e polimórficos através do *primer* SSR Umc 1519. Os poços de nº 1 a 48 referem-se às 48 variedades crioulas de milho. M: marcador molecular de 100 pb. Ponta Grossa, 2012.

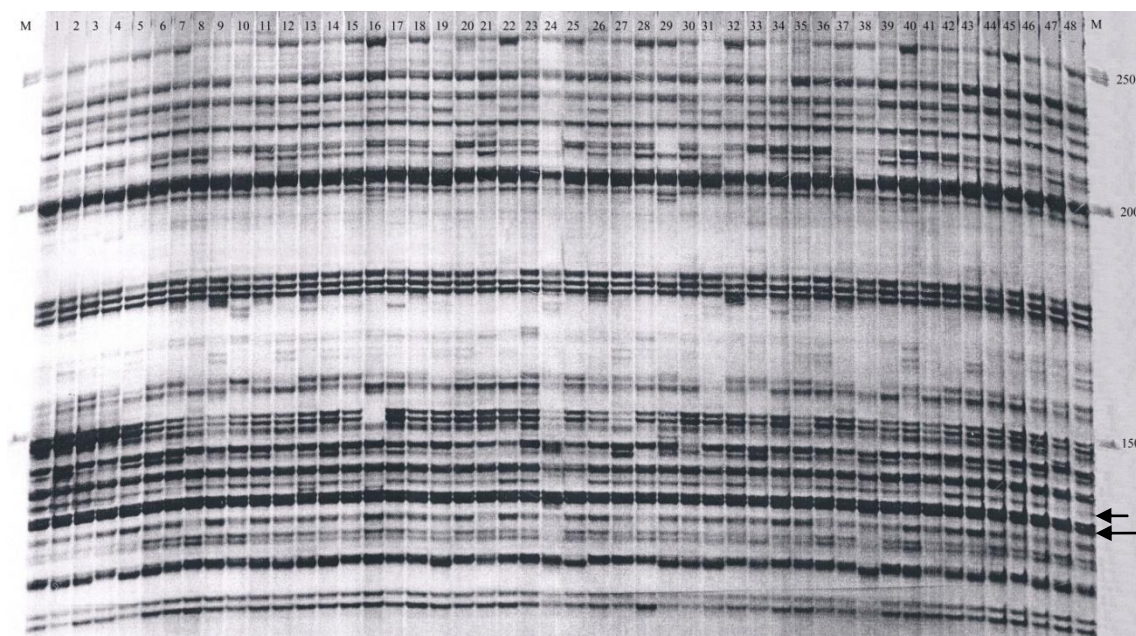


Figura 4 - Gel de poliacrilamida 6 % mostrando os fragmentos monomórficos (seta maior) e polimórficos (seta menor) através da combinação de *primers* *E-AGA/M-CAC*. Os poços de nº 1 a 48 referem-se às 48 variedades crioulas de milho. M: marcador molecular de 50 pb. Ponta Grossa, 2012.

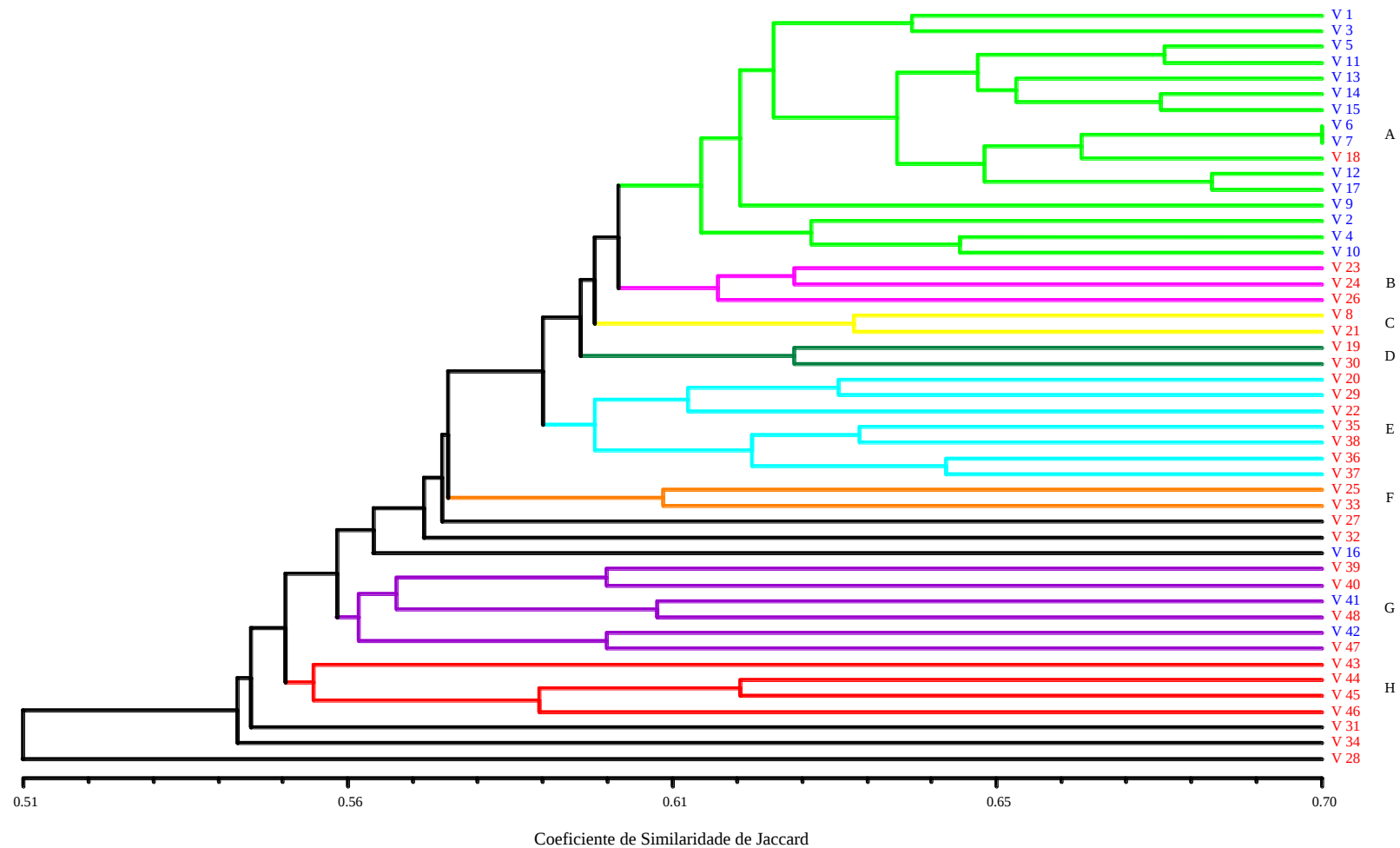


Figura 5 - Dendograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através do marcador RAPD. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 8 grupos distintos (A – H) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.

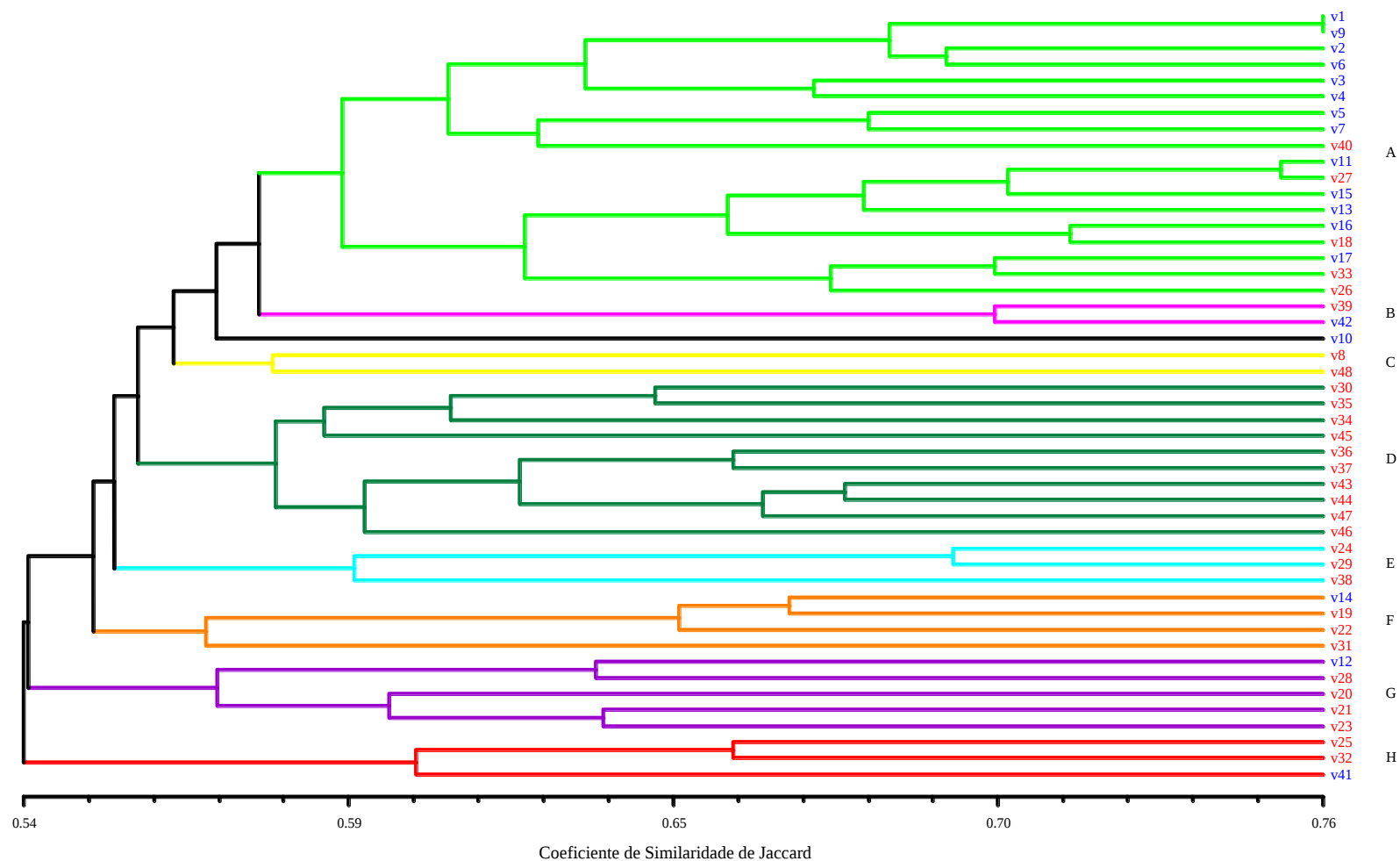


Figura 6 - Dendrograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através do marcador SSR. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 8 grupos distintos (A – H) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.

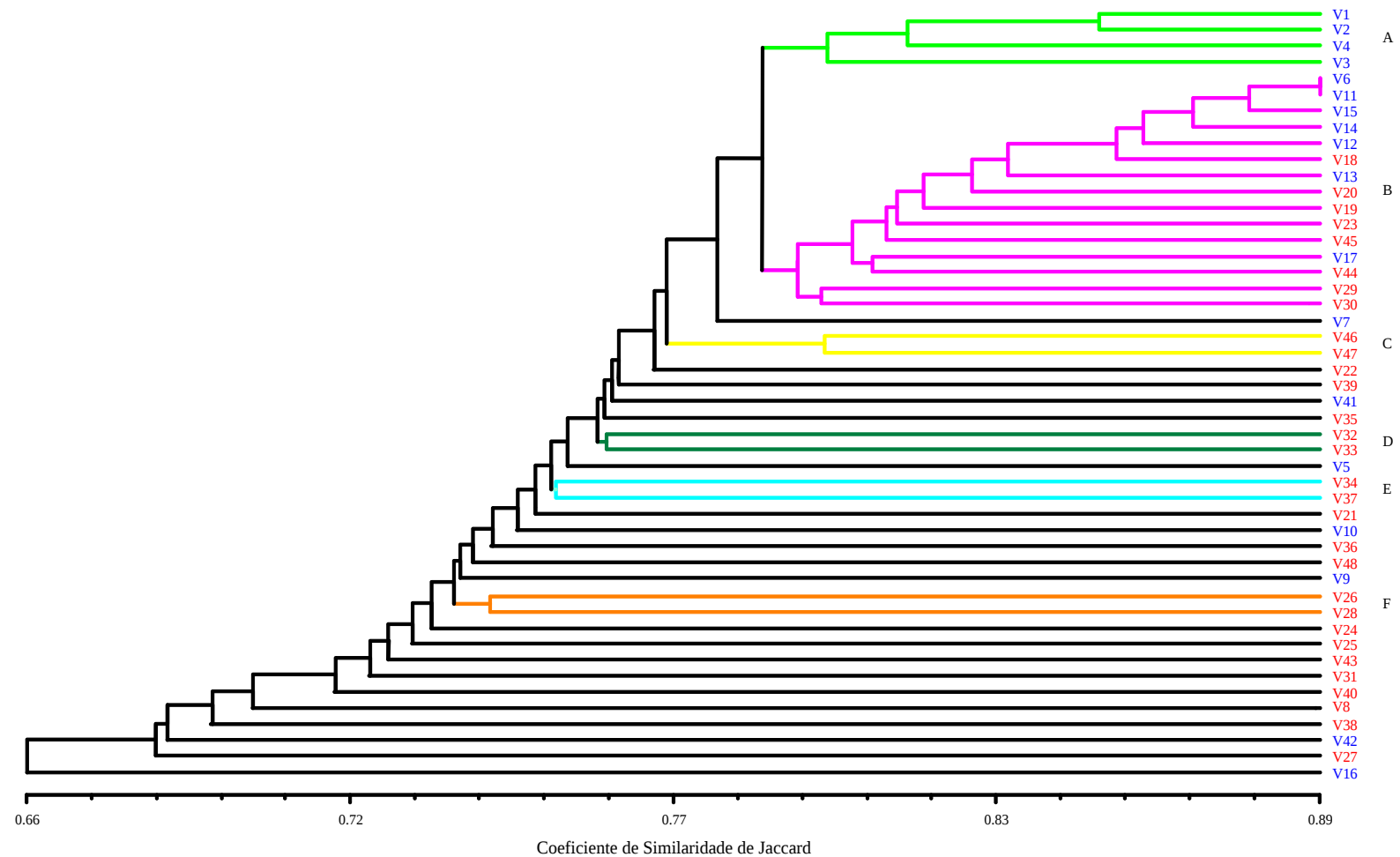


Figura 7 - Dendrograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através do marcador AFLP. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 6 grupos distintos (A – F) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.

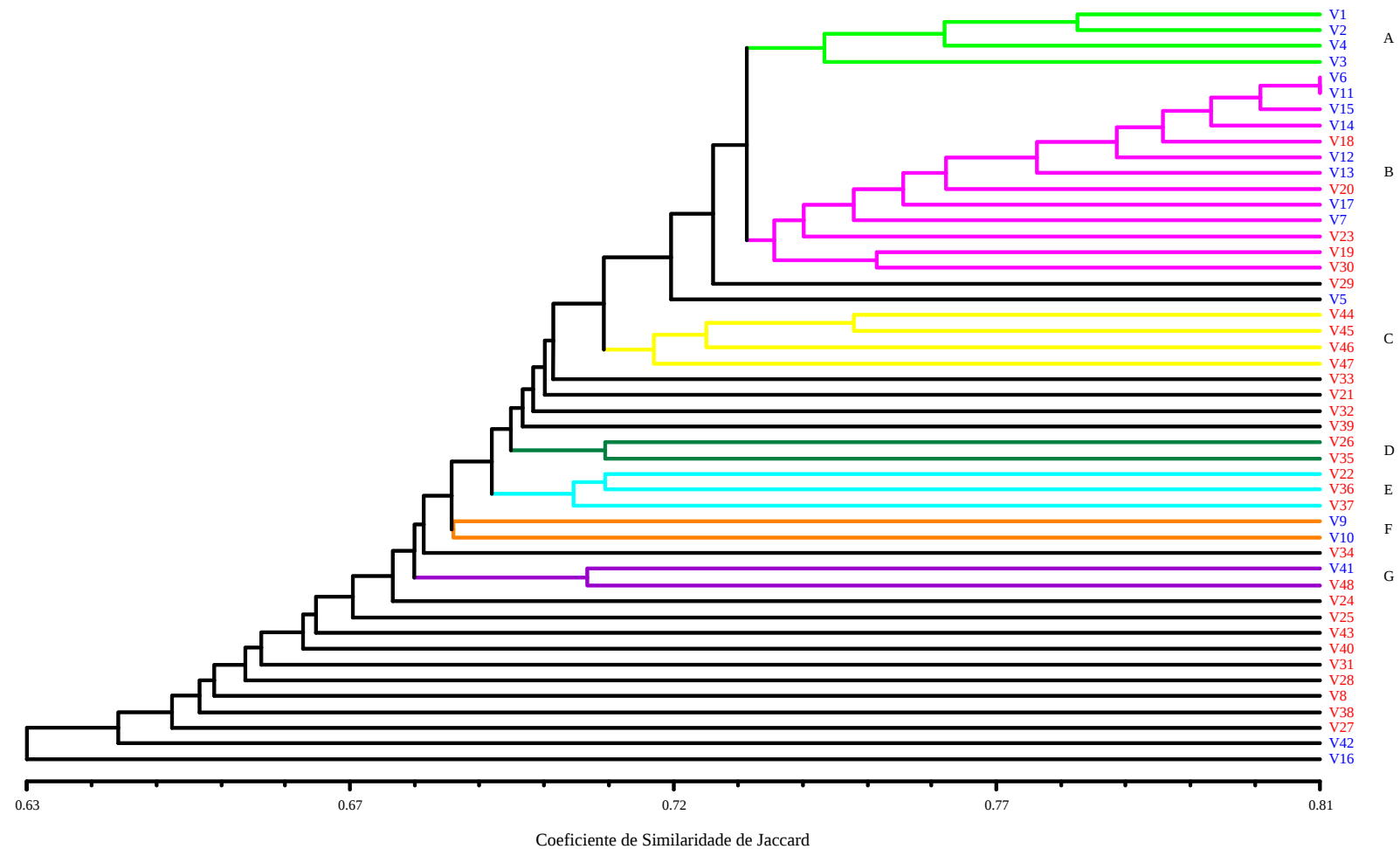


Figura 8 - Dendrograma produzido a partir da similaridade genética existente entre as 48 variedades crioulas de milho através dos marcadores RAPD, SSR e AFLP. A identificação dos números das variedades em azul refere-se aos genótipos oriundos do Paraná e em vermelho do Rio Grande do Sul. As diferentes cores nas ramificações referem-se aos 7 grupos distintos (A – G) formados a partir do índice de similaridade de Jaccard através do método UPGMA. Ponta Grossa, 2012.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A genotipagem molecular das variedades crioulas de milho permitiu identificar variabilidade genética dentro deste germoplasma independente do marcador utilizado;

2. Os marcadores RAPD e microsatélite apresentaram os maiores índices médios de polimorfismo em relação ao AFLP embora este tenha gerado maior número de fragmentos polimórficos por reação de amplificação. Esta constatação confirma a eficiência deste marcador uma vez que possibilitou a obtenção de 3 até 14 vezes mais fragmentos polimórficos por reação em relação aos demais marcadores;

3. Os coeficientes de similaridade genética entre as combinações de variedades crioulas variaram de 41 a 89 %. Os marcadores RAPD e microsatélite revelaram índices de similaridade genética equivalentes entre si. Por outro lado, o AFLP demonstrou maior magnitude na similaridade genética entre os acessos crioulos;

4. Prioritariamente as variedades crioulas foram agrupadas de acordo com os locais de coleta. De maneira geral, os dendogramas gerados pelo RAPD e AFLP apresentaram predomínio de grupos constituídos por variedades do Rio Grande do Sul. Em contrapartida, no SSR grupos compostos por acessos de ambos os locais;

5. As observações através dos dendogramas de grupos de variedades crioulas exclusivas do Rio Grande do Sul e do Paraná reforçam a hipótese de divergência entre estes grupos possivelmente pela fixação de alelos de adaptação regional ao longo dos anos bem como por barreiras espaciais ao fluxo gênico entre esses locais. Embora, o tempo evolutivo não tenha sido suficiente para separar completamente as variedades crioulas em grupos exclusivos do Rio Grande do Sul e do Paraná.

6. As semelhanças na topologia dos dendogramas gerados pelo AFLP e pela análise conjunta referem-se ao predomínio de fragmentos polimórficos do marcador AFLP em relação ao total de fragmentos utilizados na análise conjunta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIE, T. et al. A coleção nuclear de germoplasma de milho no Brasil. In: UDRY, C.W.; DUARTE, W. (Eds) **Uma História Brasileira do Milho: O Valor dos Recursos Genéticos**. Paralelo 15, Brasília, 2000. p. 65-77.
- ADEYEMO, O. et al. Genetic diversity assessment and relationship among tropical-yellow endosperm maize inbred lines using SSR markers. **Maydica**, v. 56, p. 1703, 2011.
- AJMONE-MARSAN, P. et al. AFLPTM markers for DNA fingerprinting in cattle. **Animal Genetics**, v. 28, p. 418-426, 1997.
- AJMONE-MARSAN, P. et al. Identification of QTLs for grain yield and grain related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different testers, and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 230-243, 2001.
- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, p. 131-139, 1992.
- ARAÚJO, P. M. de; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.
- ARAUJO, E. S. et al. Uso do RAPD para análise de diversidade genética em arroz. **Agronomia**, v. 37, n. 1, p. 33-37, 2003.
- ARENS, P. et al. Molecular genetic analysis of Black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 11-18, 1998.
- ASINS, M. J.; CARBONELL, E. A. Distribution of genetic variability in a durum wheat world collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 287-294, 1989.
- BANTTE, K.; PRASANNA, B. M. Simple sequences repeat polymorphism in quality protein maize (QTL) lines. **Euphytica**, v. 129, p. 337-344, 2003.
- BARBOSA, A. M. M. et al. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, v. 130, p. 87-99, 2003.
- BARUFFI, L. et al. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. **Heredity**, v. 74, p. 425-437, 1995.
- BEISMANN, H. et al. AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 989-993, 1997.
- BERED, F. et al. Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 25, p. 1123-1128, 2005.
- BERNAL, R. V. et al. Mejoramiento de maíces criollos tropicales mediante selection recurrente. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 19, p. 9-19, 1996.

- BERTAN, I. et al. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância genética morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 279-286, 2006.
- BHAT, K. V.; JARRET, R. L. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germoplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 42, p. 107-118, 1995.
- BISOGNIN, D. A. et al. Potencial de variedades de polinização aberta de milho em condições adversas de ambiente. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 3, n. 1, p. 29-34, 1997.
- BONOMO, P. et al. Comparação entre ganhos preditos e realizados na produção de grãos da população de milho Palha Roxa. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 272, p. 383-392, 2000.
- BORÉM, A. Aplicação dos Marcadores Moleculares no Melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXIETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, 2009. p. 95-102.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215, 2001.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BOWCOCK, A. M. et al. High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, London, v. 368, p. 455-457, 1994.
- BRETTING, P. K.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Isozymatic variation in Guatemalan races of maize. **The American Journal of Botany**, v. 77, p. 211-225, 1990.
- BROWN, A. D. H.; BURDON, J. J.; GRACE, J. P. Genetic structure of *Glycine canescens*, a perennial relative of soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, p. 729-736, 1990.
- BRUEL, D. C. et al. Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1491-1498, 2006.
- BRUEL, D. C. et al. Assessment of genetic diversity in maize inbred lines using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 173-178, 2007.
- BUDAK, H. et al. Development and Utilization of SSRs to Estimate the Degree of Genetic Relationships in a Collection of Pearl Millet Germoplasm. **Crop Science**, v. 43, p. 2284-2290, 2003.
- CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG. 2009. p. 54-66.
- CALDERÓN, A. E. et al. Variedades mejoradas no convencionales de maiz para agrosistemas de mediana productividad. **Agricultura Técnica en México**, Texcoco, v. 25, n. 2, p. 83-87, 1999.

- CAMOLESI, M. R. **Parâmetros genéticos obtidos com progênies de meio-irmãos de duas variedades de milho crioulo em sistemas de agricultura familiar**. 2002. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.
- CARVALHO, V. P. et al. Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 228-236, 2004.
- CASTIGLIONI, P. et al. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 425-431, 1999.
- CECCARELLI, S. Adaptation to low/high input cultivation. **Euphytica**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 203-214, 1996.
- CERVERA, M. T. et al. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 733-737, 1996.
- CHANNAPPA, K. M. B. et al. DNA marker-assisted evaluation of cultivated and local mulberry genotypes of southern India. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 239-245, 2009.
- CHIN, E. C. L. et al. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, v. 39, p. 866-873, 1996.
- CHOUKAN, R. et al. Use of SSR data to determine relationships and potential heterotic groupings within medium to late maturing Iranian maize inbred lines. **Field Crop Research**, v. 95, p. 212-222, 2006.
- COELHO, C. J. **Avaliação da tolerância ao alumínio através da solução mínima em diferentes germoplasmas de milho**. 2011, 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.
- COHEN, J. I.; GALINAT, W. C. Potential use of alien germplasm for maize improvement. **Crop Science**, v. 24, p. 1011-1015, 1984.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em: <<http://www.conab.org.br>>. Acesso em: 27 set. 2011.
- COOMBS, J. J.; FRANK, L. M.; SOUCHES, D. S. An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. **American Journal of Potato Research**, v. 81, p. 234-250, 2004.
- CORREA, C.; WEID, J. M. von der. Variedades crioulas na Lei de Sementes: avanços e impasses. **Agriculturas**, v. 3, n. 1, p. 11-14, 2006.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of simple sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.

- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382p.
- CUTLER, H. H.; BLAKE, L. W. Plants from archaeological sites east of the Rocky Mountains. **Missouri Botanical Garden**, St. Louis, Mo, 1973.
- DOEBLEY, J. F.; ILTIS, H. H. Taxonomy of *Zea* (Gramineae): I. A subgeneric classification with key to taxa. **American Journal of Botany**, v. 67, p. 982-993, 1980.
- DOEBLEY, J. F.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Exceptional divergence of Northern Flint corn. **American Journal of Botany**, v. 73, p. 64-69, 1986.
- DOEBLEY, J. F.; STEC, A. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinto. **Genetics**, Baltimore, v. 129, p. 285-295, 1991.
- DOEBLEY, J. F. Morphology, molecules, and maize. In: JOHANNESSEN, S.; HASTORF, C.A. (Eds) **Corn and culture in the prehistoric New World**. Westview Press, Boulder, Colo., 1994. p. 101-112.
- DOEBLEY, J. F.; BACIGALUPO, A.; STEC, A. Inheritance of Kernel weight in two maize – teosinte hybrid populations: implications for crop evolution. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 85, p. 191-195, 1994.
- DUAN, Y. P. et al. The genetic diversity among 27 maize populations based on SSR data. **Scientia Agricola Sinica**, v. 39, p. 1102-1113, 2006.
- DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, 1999.
- EMYGDIO, B. M. et al. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 243-250, fev. 2003.
- ESCHHOLZ, T. W. et al. Genetic diversity of Swiss maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) assessed with individuals and bulks on agarose gels. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 971-983, 2008.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Edinburgh: Longman, 1996. 462 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. p. 121-130.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.
- FERREIRA, J. M.; MOREIRA, R. M. P.; HIDALGO, J. A. F. Capacidade combinatória e heterose em populações de milho crioulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 332-339, 2009.
- FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. The application of RAPD markers for potato cultivar identification. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 48, p. 1213-1217, 1997.

FREITAS, F. O. As expansões do Milho – *Zea mays mays*, L. – para a América do Sul, baseado no resgate e estudo de DNA ancião de amostras arqueológicas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** - Embrapa, Brasília, Dez./2002, 20 p.

GALINAT, W. C. **Corn and Corn Improvement**. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Eds.), Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am., Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI, 1988. p. 1-31.

GALINAT, W. C. Evolution of corn. In: SPARKS, D. L. **Advances in Agronomy**. London: Academic Press, 1992. 403 p.

GARCIA, A. A. F. et al. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 579-588, 2004.

GERBER, S. et al. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1037-1048, 2000.

GOLOUBINOFF, P.; PÄÄBO, S.; WILSON, A. C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an Adh2 gene segment from archaeological specimens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 90, p. 1997-2001, 1993.

GONZALEZ, M. et al. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, v. 88, p. 292-299, 1998.

GOODMAN, M. M.; BROWN, W. L. **Corn and Corn Improvement**. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Eds.), American Society of Agronomy, Crop Sci. Soc. Am., Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI, 1988. p. 33-39.

GOTMISKY, S. A.; KOKAEVA, Z. G.; BOBROVA, V. K. Use of molecular marker for the analysis of plant genome. **Research Journal of Genetics**, v. 11, n. 35, p. 1538-49, 1999.

GUIMARÃES, P. S. et al. Correlação da heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 811-816, jun. 2007.

GUPTA, P. K. et al. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, v. 70, p. 45-54, 1996.

GUR-ARIE, R. et al. Simple Sequence Repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. **Genome Research**, v. 10, p. 62-71, 2000.

HAHN, V. et al. Relationships among early European maize inbreds. III. Genetic diversity revealed with RAPD markers and comparison with RFLP and pedigree data. **Maydica**, v. 40, p. 299-310, 1995.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. Ames: Iowa University Press, 1988. 468 p.

HARTINGS, H. et al. Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 831-842, 2008.

HECKENBERGER, M. et al. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines with regard to the identification of essentially derived varieties. I. Genetic technical sources of variation in SSR data. **Molecular Breeding**, v. 10, p. 181–191, 2002.

HILTON, H.; GAUT, B. S. Speciation and domestication in maize and its wild relatives: evidence from the globuline-1 gene. **Genetics**, v. 150, p. 863-872, 1998.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZALEZ DE LEON, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. 2. ed. México: CIMMYT, 1994. 88 p.

JAMES, C. M.; LESEMANN, S. S.; DOWN, G. J. Modified AFLP analysis method for species with small genomes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 303-307, 2003.

JANSSEN, P. et al. Evaluation of the DNA fingerprint method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

JANSSEN, P. et al. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1179-1187, 1997.

JONES, C. J. et al. Reproducibility testing of RAPD, AFLP, and SSR markers in plants by a network of European laboratories, **Molecular Breeding**, v. 3, p. 381-390, 1997.

KATO Y. T. A. Chromosome morphology and the origin of maize and its races. **Evolutionary Biology**, v. 17, p. 219-253, 1984.

KIULA, B. A.; LYIMO, N. G.; BOTHA, A. M. Association between AFLP-based genetic distance and hybrid performance in tropical maize. **Plant Breeding**, v. 127, p. 140-144, 2008.

KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M. J.; FORTIN, M. G. Genetic variation within between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. **Euphytica**, v. 84, n. 1, p. 237-246, 1995.

KORZUN, V. Molecular markers and their application in cereals breeding. In: **Marker Assisted Selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?** FAO Conference 10, 2003.

KOSTOVA, A. et al. Molecular characterization of Bulgarian maize germoplasm collection via SSR markers. **Biotechnology & Biotechnological**, v. 20, n. 2, p. 29-36, 2006.

KUBIK, C. et al. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. **Crop Science**, v. 41, p. 1565-1572, 2001.

LABORDA, P. R. **Diversidade Genética entre Linhagens de Milho Tropical: Estudo com Base em Marcadores Moleculares**. 2003, 103 f. Dissertação (Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

- LABORDA, P. R. et al. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1288-1299, 2005.
- LANZA, L. L. B. et al. 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.
- LEGESSE, B. W. et al. Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. **Hereditas**, v. 144, p. 10-17, 2007.
- LEGESSE, B. W. et al. Relationship between hybrid performance and AFLP based genetic distance in highland maize inbred lines. **Euphytica**, v. 162, p. 313-323, 2008.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- LOPES, R. et al. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp). Aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 56-60, 2002.
- LOPES, M. T. G. **Mapeamento de genes de resistência a mancha de Phaeosphaeria em milho**. 2003. 117 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- LOUETTE, D. et al. In situ conservation of maize in Mexico: genetic diversity and maize seed management in a tradicional community. **Economic Botany**, St. Louis, v. 51, n. 1, p. 20-38, 1997.
- LU, H.; BERNARDO, R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 613-617, 2001.
- MACHADO, C. T. T.; PATERNIANI, M. L. S. Origem, domesticação e difusão do milho. In: SOARES, A. C. et al. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185 p.
- MACIEL, L. F. et al. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 887-893, 2003.
- MACKAY, T. F. C. A-maize-ing Diversity. **Science**, Raleigh, NC, v. 325, p. 688-689, 2009.
- MACKILL, D. J. et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. **Genome**, v. 39, p. 969-977, 1996.
- MANK, M. V. R. et al. Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 921-935, 1999.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, p. 209-220, 1967.

- MARIETTE, S. et al. Sampling within the genome for measuring within population diversity: trade-offs between markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1145-1156, 2002.
- MARSHALL, D. R. The advantages and hazards of genetic homogeneity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 287, p. 1-20, 1997.
- MATIELLO, R. R. **Patossistema Milho X *Colletotrichum graminicola*: Estudo de Herança, Mapeamento de Genes de Resistência e Estimativas de Danos na Produção**. 2004, 128 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- MATIELLO, R. R. et al. Avaliação da resistência genética de variedades crioulas de milho a infecção artificial por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. In: Congresso Brasileiro de Genética, 52., 2006, Foz do Iguaçu. **Resumo**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2006. p. 1219-1219.
- MATIELLO, R. R. et al. Diversidade genética entre variedades crioulas de milho através de caracteres agrônômicos. In: Congresso Brasileiro de Genética, 56., 2010, Guarujá, SP. **Resumo**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2010.
- MATSUOKA, et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, 2002.
- MATSUOKA, Y.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Microsatellites in *Zea* - variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 436-450, 2002.
- McCLINTOCK, B.; KATO, T. A.; BLUMENSCHNEIN, A. **Chromosome constitution of races of maize: Its significance in the interpretation of relationships between races and varieties in the Americas**. Chapingo, Mexico: Colegio de Postgraduados, 1981. 517p.
- MELO, W. M. C. et al. Utilização de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares para avaliação da divergência entre híbridos de milho. **Revista Ceres**, v. 48, p. 195-207, 2001.
- MENEGUETTI, G. A. et al. Milho crioulo: tecnologia viável e sustentável. **Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Porto Alegre, v. 3, n. 1, p. 12-17, 2002.
- MEYER, A. S. et al. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.) **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 83-91, 2004.
- MILACB, S.C.K. Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 5, p. 14-17, 1998.
- MOELLER, D. A.; SCHAAL, B. A. Genetic relationships among Native American maize accessions of the Great Plains assessed by RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 1061-1067, 1999.

- MORALES, M.; DECKER, V.; ORNELLA, L. Analysis of genetic diversity in Argentinian heterotic maize populations using molecular markers. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 37, n. 1, p. 151-160, 2010.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.
- MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.
- NASS, L. L.; PELLICANO, I. J.; VALOIS, A. C. C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 16, p. 983-988, 1993.
- NASS, L. L.; PATERNIANI, E. Perspectivas do pré-melhoramento do milho. In: UDRY, C. W.; DUARTE, W. (Eds) **Uma História Brasileira do Milho: O Valor dos Recursos Genéticos**. Paralelo 15, Brasília, 2000. p. 43-63.
- NASS, L. L.; SANTOS, M. X.; PATERNIANI, E. Importância das coleções de milho e perspectivas de coleta. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Eds). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 634-661.
- NEALE, D. B. et al. Use of DNA markers in forest tree improvement research. **New Forests**, v. 6, p. 391-407, 1992.
- NETO, J. F. B. et al. Milho. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. (Eds) **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF, 2008. p. 577-649.
- NIENHUIS, J. et al. Genetic similarity among *Brassica oleracea* genotypes as measured by restriction fragment length polymorphisms. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 2, p. 298-303, 1993.
- NYBON, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-1155, 2004.
- OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, R. L.; CAMARGO, L. E. A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 395-398, 2000.
- OLIVEIRA, A. C. de. et al. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. **Genome**, v. 39, n. 3, p. 579-587, 1996.
- PAPA, R.; GEPTS, P. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 239-250, 2003.
- PARIDA, S. K. et al. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 808-817, 2006.
- PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. **Races of maize in Brazil and adjacent áreas**. México: Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo, 1977. 95 p.

PATERNIANI, E. Diversidade genética e raças de milho no Brasil. In: SOARES, A.C. et al. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185 p.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento de milho. In: BORÉN, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817 p.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C. W.; DUARTE, W. (Org). **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília: Paralelo 15, 2000. Cap.1, p. 11-14.

PEJIC, I. et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 1248-1255, 1998.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. Marcadores Moleculares no Pré-Melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXIETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, 2009. p. 103-128.

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

PINAZZA, L. A. Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 1-10.

PINTO, L. R. et al. Isoenzimas e microssatélites em plantas. Aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 16-19, 2001.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: New accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 4, p. 2101-2103, 2001.

POWELL, W. et al. Polymorphic simple sequences repeat regions in chloroplast genomes: application on population genetics of pines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 92, p. 7759-7763, 1995.

POWELL, W. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.

REEVE, H. K.; WESTNEAT, D. F.; QUELLER, D. C. Estimating average within-group relatedness from DNA fingerprinting. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 223-232, 1992.

REEVES, R. G. The use of teosinte in the improvement of corn inbreds. **Agronomy Journal**, v. 42, p. 248-251, 1950.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 752 p.

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

RINALDI, D. A. et al. Correlação entre heterose e divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 183-192, 2007.

ROHLF, F. J. **NTSYS - pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Applied Biostatistics, 1992. 237 p.

RONGWEN, J. et al. The use of simple sequence repeat DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 43- 48, 1995.

SAGHAI-MAROOF, M. A. et al. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 91, p. 5466–5470, 1994.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SALLA, M. F. S. et al. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 15-22, 2002.

SENIOR, M. L. et al. Simple sequences repeat markers developed from maize sequences found in the GENE BANK database: map construction. **Crop Science**, v. 36, p. 1676-1683, 1996.

SENIOR, M. L. et al. Utility of SSRs for determining geneic similarities and relationships in maize using and agarose gel system. **Crop Science**, v. 38, p. 1088-1098, 1998.

SHEHATA, A. I.; AL-GHETHAR, H. A.; AL-HOM Aidan, A. A. Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 16, p. 57-62, 2009.

SILVA, A. T. **Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD)**. 1999. 197 f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

SMITH, B. D. **The Emergence of Agriculture**. New York: Scientific American Library, 1998. 231 p.

SOUZA, S. G. H. et al. Comparative Analysis of Genetic Diversity Among the Maize Inbred Lines (*Zea mays* L.) Obtained by RAPD and SSR Markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 1, p. 183-192, Jan./Feb. 2008.

SPANER, D. et al. Comparison of open-pollinated stresstolerant and landrace maize for production under stress conditions in trinidad. **Maydica**, Bergamo, v. 40, n. 4, p. 331- 337, 1995.

SPANER, D. et al. Mass selection for ear size to improve green maize yield in a West Indian landrace. **Plant Varieties and Seeds**, London, v. 10, n. 2, p. 121-128, 1997.

SPRAGUE, G. F. Germplasm resources of plants: their preservation and use. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 147-165, 1980.

TABELI, R. et al. AFLP-based fingerprinting of diverse chickpea genotypes: origin, history of chickpea. In: European Congress on Biothenology, 14 th., 2009, Barcelona, Spain. **Resumo**. New Biotechnology, v. 255, 2009.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, v. 39, p. 277-287, 1996.

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

TENAILLON, M. I. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9161-9166, 2001.

TEREFEWORK, Z.; KAIJALAINEN, S.; LINDSTROM, K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 169-180, 2001.

TERRA, T. F. et al. Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 205-211, 2011.

TOHME, J. et al. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, v. 36, p. 1375-1384, 1996.

VIGOUROUX, Y. et al. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 1251-1260, 2002.

VIGOUROUX, Y. et al. An Analysis of Genetic Diversity Across the Maize Genome Using Microsatellites. **Genetics**, v. 169, p. 1617-1630, 2005.

VILELA-MORALES, E.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 11-42, 2000.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

VOS, P; KUIPER, M. AFLP analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. (Eds). **DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews**. Wiley, 1997. p. 115-131.

WANG, R. L. et al. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, New York, v. 398, p. 236-239, 1999.

WANG, F. G. et al. Selection and development of representative simple sequence repeat primers and multiplex SSR sets for high throughput automated genotyping in maize. **Chinese Science Bulletin**, v. 52, n. 2, p. 215-223, Jan. 2007.

- WARBURTON, M. L. et al. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. **Crop Science**, v. 42, p. 1832-1840, 2002.
- WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.
- WEID, J. M.; DANTAS, R. Impactos potenciais do programa de sementes de milho crioulo. In: SOARES, A.C. et al. (Orgs). **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. Cap.1, p. 13-18.
- WEISING, K. et al. Microsatellite markers for molecular breeding. **Journal of Crop Production**, v. 1, p. 113-143, 1998.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WHITE, S. E.; DOEBLEY, J. F. Of genes and genomes and the origin of maize. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 327-332, 1998.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6355, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v. 218, p. 704-40, 1993.
- WINFIELD, M. O. et al. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 3-10, 1998.
- WU, K. S.; TANKSLEY, S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 241, p. 225-235, 1993.
- WU, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in maize as revealed by AFLPs and RAPDs. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, v. 74, p. 62-63, 2000.
- XIANG, K. et al. Genetic diversity and classification of maize landraces from China's Sichuan basin based on agronomic traits, quality traits, combining ability and SSR markers. **Maydica**, v. 55, p. 85-93, 2010.
- XU, Y. et al. Developing marker-assisted selection strategies for breeding hybrid rice. **Plant Breeding Reviews**, v. 23, p. 73-174, 2003.
- YANG, W. et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 6, p. 1669-1676, 1996.
- YANG, X. et al. Comparison of SSRs and SNPs in assessment of genetic relatedness in maize. **Genetica**, v. 139, p. 1045-1054, 2011.

YAO, Q. et al. Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 1, p. 851-860, 2007a.

YAO, Q. et al. A Comparative Analysis of B Chromosomes and Genetic Diversity in Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 10, p. 1166-1172, 2007b.

YAO, Q. et al. Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. **Journal of Genetics**, v. 87, n. 3, p. 287-291, 2008.

ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. Publication 0534858A1. Munich, Germany: **European Patent Office** 92402629, 1993.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. et al. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. **Crop Science**, v. 40, p. 1156-1167, 2000.

APÊNDICE A - Tabela 11 – Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador RAPD, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

Tabela 11 – Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador RAPD, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

VAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
1		0,39	0,36	0,35	0,38	0,32	0,36	0,43	0,39	0,41	0,37	0,38	0,38	0,37	0,38	0,45	0,43	0,39	0,43	0,38	0,40	0,45	0,37	0,41	0,44	0,43	0,44	0,47	0,42	0,42	0,47	0,42	0,42	0,45	0,38	0,44	0,38	0,42	0,45	0,45	0,39	0,45	0,47	0,42	0,44	0,45	0,46	0,45	
2	0,61		0,40	0,37	0,38	0,36	0,39	0,46	0,40	0,38	0,40	0,41	0,40	0,39	0,43	0,45	0,37	0,36	0,42	0,41	0,45	0,45	0,41	0,43	0,45	0,43	0,46	0,46	0,41	0,45	0,48	0,45	0,41	0,47	0,43	0,49	0,44	0,46	0,45	0,44	0,41	0,44	0,48	0,43	0,47	0,45	0,50	0,46	
3	0,64	0,60		0,39	0,35	0,34	0,35	0,42	0,38	0,40	0,36	0,35	0,38	0,42	0,40	0,42	0,41	0,43	0,41	0,38	0,40	0,43	0,38	0,36	0,41	0,43	0,42	0,48	0,40	0,42	0,44	0,40	0,41	0,46	0,39	0,42	0,41	0,45	0,42	0,45	0,40	0,45	0,44	0,44	0,45	0,45	0,48	0,47	
4	0,65	0,63	0,61		0,34	0,33	0,39	0,40	0,36	0,35	0,39	0,40	0,36	0,37	0,33	0,44	0,42	0,36	0,41	0,38	0,42	0,43	0,37	0,41	0,44	0,39	0,44	0,50	0,42	0,40	0,44	0,38	0,43	0,47	0,39	0,40	0,39	0,43	0,42	0,44	0,45	0,42	0,46	0,45	0,46	0,46	0,46		
5	0,63	0,62	0,65	0,66		0,33	0,37	0,38	0,35	0,39	0,32	0,36	0,36	0,37	0,33	0,39	0,39	0,39	0,40	0,38	0,36	0,40	0,35	0,39	0,38	0,38	0,39	0,46	0,35	0,37	0,43	0,40	0,39	0,44	0,37	0,38	0,36	0,37	0,43	0,42	0,43	0,38	0,43	0,41	0,45	0,44	0,42	0,44	
6	0,68	0,64	0,66	0,67	0,67		0,30	0,39	0,37	0,38	0,35	0,31	0,33	0,34	0,33	0,38	0,34	0,31	0,40	0,34	0,38	0,40	0,39	0,36	0,39	0,41	0,39	0,45	0,37	0,40	0,42	0,41	0,38	0,43	0,35	0,40	0,39	0,41	0,42	0,43	0,36	0,40	0,43	0,43	0,46	0,44	0,43	0,46	
7	0,64	0,61	0,65	0,61	0,63	0,70		0,42	0,35	0,40	0,36	0,32	0,35	0,34	0,37	0,45	0,42	0,36	0,42	0,36	0,40	0,47	0,39	0,40	0,44	0,44	0,44	0,50	0,42	0,43	0,46	0,44	0,45	0,48	0,41	0,45	0,41	0,43	0,46	0,46	0,42	0,43	0,52	0,46	0,48	0,49	0,47	0,48	
8	0,57	0,54	0,58	0,60	0,62	0,61	0,58		0,42	0,44	0,40	0,40	0,39	0,43	0,43	0,43	0,38	0,43	0,41	0,44	0,37	0,46	0,42	0,43	0,43	0,46	0,44	0,48	0,45	0,42	0,46	0,47	0,47	0,50	0,42	0,46	0,41	0,42	0,47	0,41	0,46	0,47	0,47	0,46	0,50	0,45	0,47	0,49	
9	0,61	0,60	0,62	0,64	0,65	0,63	0,65	0,58		0,39	0,40	0,35	0,37	0,40	0,40	0,43	0,45	0,39	0,39	0,42	0,40	0,45	0,41	0,41	0,42	0,45	0,42	0,50	0,42	0,41	0,47	0,40	0,41	0,45	0,41	0,41	0,39	0,42	0,43	0,42	0,44	0,39	0,50	0,44	0,47	0,44	0,47	0,46	
10	0,59	0,62	0,60	0,65	0,61	0,62	0,60	0,56	0,61		0,43	0,40	0,42	0,40	0,42	0,42	0,42	0,39	0,41	0,41	0,42	0,49	0,42	0,42	0,44	0,42	0,42	0,48	0,46	0,40	0,48	0,43	0,44	0,51	0,40	0,44	0,46	0,44	0,44	0,46	0,43	0,42	0,43	0,45	0,48	0,49	0,49	0,49	
11	0,63	0,60	0,64	0,61	0,68	0,65	0,64	0,60	0,60	0,57		0,32	0,33	0,35	0,34	0,44	0,35	0,36	0,38	0,40	0,39	0,41	0,38	0,39	0,40	0,40	0,44	0,47	0,40	0,40	0,42	0,41	0,40	0,42	0,41	0,38	0,39	0,36	0,41	0,42	0,42	0,47	0,44	0,42	0,45	0,43	0,45	0,45	
12	0,62	0,59	0,65	0,60	0,64	0,69	0,68	0,60	0,65	0,60	0,68		0,35	0,37	0,33	0,40	0,31	0,34	0,39	0,37	0,37	0,45	0,39	0,41	0,41	0,43	0,41	0,46	0,41	0,42	0,47	0,42	0,44	0,43	0,37	0,39	0,39	0,38	0,42	0,44	0,39	0,44	0,46	0,41	0,45	0,41	0,48	0,43	
13	0,62	0,60	0,62	0,64	0,64	0,67	0,65	0,61	0,63	0,58	0,67	0,65		0,33	0,36	0,33	0,40	0,37	0,40	0,38	0,37	0,39	0,45	0,38	0,36	0,45	0,41	0,46	0,48	0,43	0,38	0,45	0,42	0,39	0,44	0,39	0,43	0,41	0,43	0,40	0,43	0,40	0,40	0,43	0,40	0,41	0,45	0,44	0,44
14	0,63	0,61	0,58	0,63	0,63	0,66	0,66	0,57	0,60	0,60	0,65	0,63	0,67		0,32	0,41	0,39	0,34	0,38	0,37	0,37	0,44	0,39	0,38	0,43	0,41	0,44	0,46	0,42	0,40	0,43	0,42	0,41	0,47	0,39	0,41	0,41	0,42	0,41	0,39	0,41	0,39	0,45	0,40	0,44	0,42	0,43	0,44	
15	0,62	0,57	0,60	0,67	0,67	0,67	0,63	0,57	0,60	0,58	0,66	0,67	0,64	0,68		0,39	0,41	0,37	0,42	0,36	0,39	0,42	0,36	0,40	0,42	0,40	0,42	0,42	0,45	0,41	0,41	0,43	0,40	0,43	0,44	0,39	0,42	0,39	0,42	0,44	0,43	0,41	0,41	0,44	0,43	0,43	0,44	0,44	
16	0,55	0,55	0,58	0,56	0,61	0,62	0,55	0,57	0,58	0,56	0,60	0,60	0,59	0,61	0,61		0,43	0,43	0,48	0,45	0,45	0,44	0,42	0,44	0,44	0,47	0,47	0,51	0,45	0,46	0,48	0,45	0,47	0,49	0,43	0,45	0,44	0,45	0,46	0,48	0,41	0,43	0,47	0,48	0,51	0,47	0,50	0,48	
17	0,57	0,63	0,59	0,58	0,61	0,66	0,58	0,62	0,55	0,58	0,65	0,69	0,63	0,61	0,59	0,57		0,35	0,38	0,38	0,35	0,41	0,41	0,42	0,43	0,42	0,43	0,50	0,41	0,38	0,45	0,48	0,44	0,45	0,42	0,46	0,41	0,39	0,44	0,42	0,39	0,44	0,43	0,38	0,42	0,44	0,47	0,46	
18	0,61	0,64	0,57	0,64	0,61	0,69	0,64	0,57	0,61	0,61	0,64	0,66	0,66	0,63	0,57	0,65	0,38		0,39	0,38	0,42	0,41	0,41	0,43	0,39	0,42	0,49	0,42	0,40	0,49	0,41	0,41	0,40	0,41	0,41	0,39	0,39	0,42	0,44	0,45	0,45	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43		
19	0,57	0,58	0,59	0,59	0,60	0,60	0,58	0,59	0,61	0,59	0,62	0,61	0,62	0,62	0,61	0,58	0,52	0,62	0,62		0,40	0,43	0,43	0,38	0,43	0,46	0,44	0,44	0,48	0,44	0,37	0,41	0,42	0,44	0,48	0,40	0,44	0,43	0,45	0,42	0,40	0,42	0,46	0,49	0,42	0,43	0,44	0,49	0,46
20	0,62	0,59	0,62	0,62	0,62	0,66	0,64	0,56	0,58	0,59	0,60	0,63	0,63	0,63	0,64	0,55	0,62	0,61	0,60	0,38		0,39	0,41	0,40	0,40	0,42	0,40	0,47	0,37	0,40	0,41	0,45	0,42	0,43	0,40	0,38	0,41	0,41	0,42	0,42	0,42	0,41	0,45	0,42	0,44	0,42	0,43	0,48	
21	0,60	0,55	0,60	0,58	0,64	0,62	0,60	0,63	0,60	0,58	0,61	0,63	0,61	0,63	0,61	0,55	0,65	0,62	0,57	0,62	0,45		0,38	0,37	0,39	0,39	0,40	0,48	0,42	0,39	0,42	0,43	0,41	0,48	0,38	0,39	0,37	0,38	0,46	0,42	0,44	0,42	0,46	0,39	0,40	0,44	0,45	0,46	
22	0,55	0,55	0,57	0,57	0,60	0,60	0,53	0,54	0,55	0,51	0,59	0,55	0,55	0,56	0,58	0,56	0,59	0,58	0,57	0,61	0,55	0,44		0,46	0,44	0,42	0,43	0,48	0,38	0,41	0,44	0,46	0,50	0,42	0,42	0,41	0,39	0,39	0,46	0,43	0,42	0,48	0,48	0,43	0,50	0,41	0,47	0,46	
23	0,63	0,59	0,62	0,63	0,65	0,61	0,61	0,58	0,59	0,58	0,62	0,61	0,62	0,61	0,64	0,58	0,59	0,59	0,62	0,59	0,62	0,56	0,37		0,39	0,39	0,43	0,44	0,40	0,40	0,44	0,40	0,40	0,45	0,41	0,42	0,42	0,47	0,45	0,41	0,43	0,41	0,47	0,41	0,44	0,44	0,45	0,42	
24	0,59	0,57	0,64	0,59	0,61	0,64	0,60	0,57	0,59	0,58	0,61	0,59	0,64	0,62	0,60	0,56	0,58	0,59	0,57	0,60	0,63	0,54	0,63	0,40		0,38	0,40	0,49	0,41	0,41	0,48	0,44	0,41	0,50	0,41	0,40	0,42	0,47	0,47	0,44	0,41	0,44	0,49	0,45	0,49	0,46	0,47	0,47	
25	0,56	0,55	0,59	0,56	0,62	0,61	0,56	0,57	0,58	0,56	0,60	0,59	0,55	0,57	0,58	0,56	0,57	0,57	0,54	0,60	0,61	0,56	0,61	0,60	0,42		0,43	0,49	0,43	0,41	0,46	0,43	0,39	0,46	0,44	0,46	0,42	0,46	0,47	0,46	0,48	0,46	0,50	0,46	0,48	0,45	0,44	0,48	
26	0,57	0,57	0,57	0,61	0,62	0,59	0,56	0,54	0,55	0,58	0,60	0,57	0,59	0,59	0,60	0,53	0,58	0,61	0,56	0,58	0,61	0,58	0,61	0,62	0,58	0,41		0,46	0,45	0,40	0,43	0,42	0,45	0,45	0,38	0,45	0,38	0,41	0,50	0,46	0,41	0,49	0,46	0,44	0,45	0,45	0,45	0,49	
27	0,56	0,54	0,58	0,56	0,61	0,61	0,56	0,56	0,58	0,56	0,59	0,54	0,56	0,58	0,53	0,57	0,58	0,60	0,57	0,57	0,60	0,57	0,57	0,59	0,50	0,43		0,50	0,43	0,44	0,45	0,47	0,43	0,45	0,38	0,44	0,42	0,42	0,47	0,44	0,45	0,43	0,48	0,4					

APÊNDICE B – Tabela 12 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador SSR, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

Tabela 12 – Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador SSR, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

VAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
1		0,28	0,37	0,32	0,32	0,32	0,44	0,46	0,24	0,33	0,38	0,44	0,39	0,34	0,35	0,43	0,39	0,37	0,44	0,37	0,46	0,43	0,49	0,43	0,42	0,40	0,35	0,51	0,36	0,43	0,44	0,34	0,38	0,36	0,43	0,46	0,48	0,44	0,34	0,37	0,45	0,39	0,40	0,43	0,48	0,46	0,44	0,44	
2	0,72		0,38	0,33	0,40	0,31	0,41	0,47	0,35	0,41	0,41	0,49	0,42	0,43	0,43	0,44	0,42	0,41	0,51	0,44	0,49	0,50	0,54	0,42	0,53	0,47	0,45	0,54	0,44	0,38	0,47	0,38	0,45	0,49	0,48	0,51	0,54	0,53	0,35	0,47	0,49	0,42	0,45	0,48	0,47	0,52	0,49	0,42	
3	0,63	0,62		0,33	0,38	0,35	0,43	0,52	0,43	0,42	0,30	0,52	0,42	0,37	0,44	0,49	0,46	0,40	0,36	0,43	0,54	0,44	0,49	0,49	0,56	0,46	0,36	0,54	0,41	0,40	0,43	0,46	0,47	0,51	0,49	0,48	0,50	0,49	0,52	0,44	0,57	0,56	0,41	0,46	0,48	0,44	0,44	0,45	
4	0,68	0,67	0,67		0,41	0,33	0,36	0,44	0,44	0,40	0,29	0,40	0,38	0,36	0,33	0,43	0,37	0,42	0,42	0,43	0,42	0,45	0,40	0,47	0,48	0,49	0,36	0,44	0,35	0,41	0,43	0,47	0,46	0,44	0,51	0,42	0,48	0,44	0,41	0,46	0,51	0,45	0,41	0,45	0,40	0,46	0,45		
5	0,68	0,60	0,63	0,59		0,31	0,32	0,44	0,32	0,46	0,36	0,46	0,44	0,41	0,42	0,39	0,40	0,42	0,46	0,43	0,50	0,48	0,46	0,49	0,49	0,44	0,38	0,54	0,39	0,40	0,41	0,35	0,43	0,41	0,42	0,38	0,46	0,47	0,35	0,36	0,48	0,42	0,45	0,44	0,44	0,43	0,48	0,47	
6	0,68	0,69	0,65	0,68	0,69		0,34	0,36	0,32	0,46	0,27	0,42	0,35	0,34	0,40	0,37	0,39	0,33	0,36	0,35	0,46	0,39	0,45	0,43	0,46	0,38	0,33	0,48	0,37	0,31	0,48	0,32	0,43	0,38	0,32	0,38	0,40	0,48	0,32	0,38	0,48	0,41	0,32	0,39	0,34	0,40	0,40	0,41	
7	0,56	0,59	0,58	0,64	0,68	0,66		0,41	0,42	0,45	0,37	0,49	0,41	0,44	0,41	0,40	0,43	0,39	0,48	0,48	0,51	0,53	0,47	0,52	0,48	0,51	0,41	0,49	0,42	0,47	0,52	0,41	0,46	0,52	0,47	0,41	0,49	0,50	0,38	0,39	0,51	0,49	0,44	0,49	0,44	0,53	0,44	0,50	
8	0,54	0,53	0,48	0,56	0,56	0,64	0,59		0,42	0,43	0,39	0,47	0,41	0,50	0,43	0,40	0,36	0,39	0,43	0,52	0,47	0,53	0,49	0,43	0,48	0,45	0,43	0,49	0,42	0,47	0,54	0,45	0,44	0,46	0,47	0,41	0,49	0,50	0,44	0,39	0,49	0,47	0,42	0,49	0,45	0,49	0,45	0,42	
9	0,76	0,65	0,57	0,56	0,68	0,68	0,58	0,58		0,46	0,42	0,46	0,44	0,47	0,42	0,36	0,39	0,42	0,44	0,43	0,54	0,47	0,53	0,49	0,49	0,44	0,40	0,52	0,41	0,42	0,45	0,34	0,41	0,41	0,43	0,48	0,48	0,51	0,39	0,40	0,42	0,44	0,47	0,55	0,52	0,54	0,48	0,49	
10	0,67	0,59	0,58	0,60	0,54	0,54	0,55	0,57	0,54		0,39	0,51	0,41	0,42	0,43	0,46	0,41	0,41	0,49	0,48	0,47	0,51	0,49	0,49	0,52	0,47	0,43	0,53	0,48	0,51	0,52	0,47	0,42	0,48	0,47	0,51	0,53	0,56	0,40	0,51	0,53	0,47	0,48	0,45	0,53	0,55	0,47	0,48	
11	0,62	0,59	0,70	0,71	0,64	0,73	0,63	0,61	0,58	0,61		0,42	0,28	0,31	0,32	0,38	0,29	0,30	0,35	0,43	0,47	0,43	0,43	0,47	0,48	0,37	0,25	0,43	0,38	0,41	0,44	0,43	0,42	0,40	0,36	0,39	0,45	0,40	0,40	0,41	0,55	0,43	0,36	0,34	0,35	0,39	0,39	0,44	
12	0,56	0,51	0,48	0,60	0,54	0,58	0,51	0,53	0,54	0,49	0,58		0,45	0,42	0,41	0,50	0,47	0,51	0,44	0,43	0,41	0,49	0,47	0,51	0,46	0,49	0,43	0,37	0,44	0,45	0,50	0,51	0,50	0,46	0,43	0,41	0,49	0,44	0,48	0,45	0,53	0,51	0,52	0,41	0,48	0,48	0,51	0,46	
13	0,61	0,58	0,58	0,63	0,56	0,65	0,59	0,59	0,56	0,59	0,72	0,55		0,44	0,32	0,40	0,38	0,32	0,47	0,38	0,43	0,44	0,41	0,46	0,44	0,41	0,36	0,49	0,33	0,50	0,49	0,44	0,39	0,46	0,42	0,49	0,49	0,41	0,40	0,45	0,49	0,49	0,39	0,44	0,39	0,49	0,41	0,46	
14	0,66	0,57	0,63	0,64	0,59	0,66	0,56	0,50	0,53	0,58	0,69	0,58	0,56		0,44	0,51	0,44	0,44	0,33	0,45	0,46	0,37	0,49	0,45	0,46	0,49	0,44	0,38	0,46	0,41	0,39	0,49	0,39	0,47	0,45	0,45	0,46	0,50	0,47	0,45	0,42	0,48	0,48	0,41	0,43	0,42	0,48	0,44	0,41
15	0,65	0,57	0,56	0,67	0,58	0,60	0,59	0,57	0,58	0,57	0,68	0,59	0,68	0,56		0,36	0,39	0,34	0,45	0,38	0,37	0,45	0,39	0,47	0,44	0,45	0,27	0,41	0,33	0,45	0,40	0,40	0,42	0,46	0,38	0,43	0,45	0,37	0,42	0,45	0,47	0,53	0,40	0,41	0,41	0,45	0,35	0,40	
16	0,58	0,56	0,51	0,57	0,61	0,63	0,60	0,60	0,64	0,54	0,62	0,50	0,60	0,49	0,64		0,35	0,29	0,50	0,43	0,48	0,51	0,42	0,39	0,34	0,36	0,33	0,46	0,43	0,48	0,52	0,37	0,43	0,43	0,37	0,52	0,50	0,45	0,37	0,44	0,42	0,44	0,43	0,48	0,50	0,48	0,44	0,47	
17	0,61	0,58	0,54	0,63	0,60	0,61	0,57	0,64	0,61	0,59	0,71	0,53	0,62	0,56	0,61	0,65		0,29	0,47	0,44	0,41	0,49	0,41	0,49	0,46	0,34	0,34	0,53	0,44	0,49	0,50	0,44	0,30	0,48	0,44	0,45	0,49	0,46	0,35	0,45	0,47	0,45	0,39	0,47	0,39	0,41	0,43	0,42	
18	0,63	0,59	0,60	0,58	0,58	0,67	0,61	0,61	0,58	0,59	0,70	0,49	0,68	0,56	0,66	0,71	0,71		0,43	0,42	0,49	0,42	0,45	0,41	0,38	0,32	0,32	0,51	0,38	0,45	0,50	0,36	0,33	0,44	0,33	0,49	0,41	0,44	0,36	0,41	0,41	0,45	0,35	0,43	0,45	0,45	0,37	0,38	
19	0,56	0,49	0,64	0,58	0,54	0,64	0,53	0,57	0,56	0,51	0,65	0,56	0,53	0,67	0,55	0,50	0,53	0,57		0,43	0,53	0,34	0,51	0,47	0,54	0,44	0,41	0,49	0,42	0,37	0,42	0,45	0,50	0,48	0,41	0,43	0,43	0,42	0,54	0,39	0,53	0,55	0,46	0,45	0,48	0,46	0,42	0,38	
20	0,63	0,56	0,57	0,57	0,57	0,65	0,52	0,58	0,58	0,62	0,55	0,62	0,57	0,56	0,58	0,58	0,40	0,42	0,40	0,46	0,41	0,41	0,40	0,46	0,37	0,40	0,45	0,42	0,41	0,47	0,39	0,40	0,48	0,41	0,41	0,50	0,48	0,41	0,41	0,50	0,42	0,41	0,38	0,43	0,44	0,36	0,47		
21	0,54	0,51	0,46	0,58	0,50	0,54	0,49	0,53	0,46	0,53	0,53	0,59	0,57	0,54	0,63	0,52	0,59	0,51	0,47	0,60		0,51	0,36	0,53	0,46	0,43	0,45	0,41	0,46	0,47	0,48	0,49	0,42	0,50	0,47	0,41	0,47	0,52	0,44	0,55	0,49	0,53	0,46	0,45	0,43	0,47	0,43	0,44	
22	0,57	0,50	0,56	0,55	0,53	0,61	0,48	0,47	0,53	0,49	0,57	0,51	0,56	0,63	0,55	0,49	0,51	0,58	0,66	0,58	0,49		0,46	0,52	0,51	0,38	0,40	0,49	0,39	0,38	0,39	0,46	0,41	0,45	0,44	0,40	0,42	0,41	0,49	0,49	0,51	0,53	0,43	0,38	0,49	0,41	0,43	0,49	
23	0,51	0,46	0,51	0,60	0,54	0,55	0,53	0,51	0,47	0,51	0,57	0,53	0,59	0,51	0,61	0,58	0,59	0,55	0,49	0,60	0,64	0,54		0,48	0,39	0,35	0,45	0,41	0,38	0,50	0,44	0,48	0,42	0,51	0,52	0,47	0,43	0,43	0,46	0,58	0,51	0,53	0,44	0,46	0,43	0,41	0,43	0,44	
24	0,57	0,58	0,51	0,53	0,51	0,57	0,48	0,57	0,51	0,51	0,53	0,49	0,54	0,55	0,53	0,61	0,51	0,59	0,53	0,54	0,48	0,48	0,52		0,47	0,45	0,47	0,53	0,31	0,48	0,57	0,40	0,43	0,49	0,48	0,48	0,53	0,49	0,45	0,51	0,45	0,51	0,53	0,45	0,52	0,52	0,49	0,51	0,42
25	0,58	0,47	0,44	0,52	0,51	0,54	0,52	0,52	0,51	0,48	0,52	0,54	0,56	0,51	0,56	0,66	0,54	0,63	0,46	0,59	0,54	0,49	0,61	0,53		0,42	0,44	0,37	0,45	0,51	0,56	0,34	0,49	0,41	0,45	0,48	0,52	0,45	0,39	0,46	0,42	0,46	0,49	0,51	0,50	0,52	0,44	0,51	
26	0,60	0,53	0,54	0,51	0,56	0,62	0,49	0,55	0,56	0,53	0,63	0,51	0,59	0,56	0,55	0,64	0,66	0,68	0,56	0,59	0,57	0,62	0,65	0,55	0,58		0,43	0,49	0,38	0,43	0,46	0,45	0,31	0,42	0,43	0,45	0,45	0,44	0,38	0,47	0,45	0,41	0,40	0,39	0,44	0,42	0,39	0,44	
27	0,65	0,55	0,64	0,64	0,62	0,67	0,59	0,57	0,60	0,57	0,75	0,57	0,64	0,63	0,73	0,67	0,66	0,68	0,59	0,60	0,55	0,60	0,55	0,53	0,56	0,57		0,43	0,38	0,41	0,48	0,38	0,42	0,42	0,33	0,39	0,39	0,42	0,44	0,43									

APÊNDICE C – Tabela 13 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador AFLP, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

Tabela 13 – Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através do marcador AFLP, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

VAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
1		0,15	0,21	0,20	0,27	0,20	0,24	0,32	0,27	0,24	0,21	0,22	0,22	0,21	0,19	0,34	0,24	0,21	0,23	0,22	0,27	0,26	0,23	0,28	0,28	0,29	0,34	0,28	0,24	0,24	0,31	0,25	0,26	0,27	0,28	0,27	0,27	0,35	0,26	0,31	0,29	0,30	0,30	0,25	0,22	0,27	0,25	0,28	
2	0,85		0,17	0,18	0,24	0,18	0,24	0,31	0,27	0,26	0,17	0,18	0,21	0,17	0,18	0,35	0,21	0,20	0,19	0,20	0,24	0,24	0,22	0,27	0,25	0,27	0,32	0,27	0,22	0,20	0,27	0,23	0,24	0,23	0,26	0,27	0,25	0,32	0,26	0,29	0,25	0,32	0,27	0,21	0,20	0,24	0,23	0,26	
3	0,79	0,83		0,22	0,23	0,20	0,27	0,33	0,29	0,28	0,19	0,22	0,22	0,21	0,22	0,38	0,30	0,20	0,23	0,22	0,24	0,26	0,23	0,28	0,28	0,27	0,34	0,29	0,23	0,22	0,28	0,26	0,25	0,26	0,26	0,28	0,26	0,31	0,28	0,31	0,27	0,33	0,28	0,24	0,20	0,26	0,24	0,29	
4	0,80	0,82	0,78		0,25	0,19	0,22	0,30	0,26	0,25	0,20	0,22	0,22	0,20	0,20	0,34	0,23	0,21	0,23	0,21	0,25	0,25	0,22	0,27	0,26	0,27	0,34	0,29	0,22	0,24	0,29	0,25	0,24	0,28	0,27	0,28	0,26	0,32	0,23	0,30	0,26	0,33	0,29	0,23	0,22	0,25	0,25	0,29	
5	0,73	0,76	0,77	0,75		0,21	0,28	0,32	0,28	0,29	0,21	0,24	0,21	0,23	0,22	0,35	0,23	0,23	0,25	0,24	0,28	0,25	0,23	0,30	0,28	0,29	0,34	0,28	0,25	0,24	0,31	0,28	0,28	0,28	0,27	0,29	0,29	0,33	0,27	0,31	0,27	0,31	0,31	0,25	0,26	0,27	0,25	0,29	
6	0,80	0,82	0,80	0,81	0,79		0,17	0,26	0,22	0,21	0,11	0,14	0,16	0,14	0,12	0,29	0,18	0,16	0,18	0,17	0,24	0,20	0,18	0,24	0,25	0,24	0,28	0,26	0,19	0,20	0,26	0,21	0,23	0,22	0,21	0,24	0,22	0,29	0,22	0,25	0,20	0,28	0,25	0,19	0,17	0,21	0,19	0,21	
7	0,76	0,76	0,73	0,78	0,72	0,83		0,28	0,24	0,23	0,18	0,20	0,22	0,19	0,19	0,30	0,24	0,18	0,23	0,22	0,28	0,26	0,23	0,27	0,26	0,28	0,32	0,30	0,25	0,25	0,29	0,23	0,26	0,27	0,24	0,29	0,28	0,32	0,26	0,29	0,24	0,32	0,29	0,23	0,23	0,26	0,25	0,28	
8	0,68	0,69	0,67	0,70	0,68	0,74	0,72		0,28	0,32	0,25	0,28	0,27	0,25	0,26	0,35	0,28	0,27	0,29	0,29	0,32	0,28	0,30	0,33	0,35	0,30	0,33	0,35	0,29	0,30	0,34	0,32	0,32	0,31	0,29	0,32	0,32	0,35	0,32	0,33	0,31	0,35	0,33	0,27	0,29	0,29	0,29	0,32	
9	0,73	0,73	0,71	0,74	0,72	0,78	0,76	0,72		0,26	0,22	0,24	0,25	0,23	0,23	0,30	0,28	0,22	0,26	0,25	0,32	0,30	0,26	0,30	0,29	0,28	0,35	0,31	0,26	0,28	0,33	0,28	0,29	0,29	0,27	0,29	0,30	0,35	0,25	0,33	0,26	0,31	0,31	0,27	0,26	0,28	0,26	0,29	
10	0,76	0,74	0,72	0,75	0,71	0,79	0,77	0,68	0,74		0,21	0,22	0,23	0,22	0,21	0,34	0,26	0,22	0,24	0,24	0,29	0,28	0,25	0,29	0,29	0,30	0,35	0,29	0,25	0,24	0,31	0,29	0,27	0,27	0,28	0,27	0,29	0,35	0,28	0,31	0,29	0,32	0,30	0,25	0,26	0,28	0,28	0,30	
11	0,79	0,83	0,81	0,80	0,79	0,89	0,82	0,75	0,78	0,79		0,14	0,16	0,13	0,13	0,29	0,19	0,14	0,17	0,17	0,23	0,20	0,19	0,25	0,25	0,23	0,30	0,26	0,20	0,20	0,26	0,22	0,23	0,21	0,20	0,22	0,21	0,29	0,21	0,25	0,20	0,30	0,26	0,19	0,17	0,21	0,21	0,23	
12	0,78	0,82	0,78	0,78	0,76	0,86	0,80	0,72	0,76	0,78	0,86		0,18	0,16	0,14	0,30	0,21	0,16	0,20	0,19	0,27	0,21	0,20	0,24	0,25	0,23	0,31	0,25	0,21	0,21	0,26	0,21	0,24	0,23	0,23	0,25	0,24	0,28	0,22	0,25	0,22	0,28	0,24	0,19	0,19	0,23	0,23	0,25	
13	0,78	0,79	0,78	0,78	0,79	0,84	0,78	0,73	0,75	0,77	0,84	0,82		0,17	0,16	0,31	0,21	0,19	0,20	0,20	0,27	0,23	0,20	0,26	0,26	0,27	0,31	0,26	0,21	0,22	0,28	0,25	0,24	0,24	0,25	0,26	0,24	0,30	0,23	0,27	0,25	0,29	0,28	0,22	0,21	0,24	0,23	0,26	
14	0,79	0,83	0,79	0,80	0,77	0,86	0,81	0,75	0,77	0,78	0,87	0,84	0,83		0,13	0,30	0,19	0,14	0,17	0,15	0,23	0,22	0,18	0,24	0,24	0,24	0,24	0,29	0,25	0,20	0,18	0,25	0,23	0,21	0,24	0,23	0,23	0,28	0,19	0,25	0,20	0,29	0,25	0,18	0,18	0,23	0,20	0,22	
15	0,81	0,82	0,78	0,80	0,78	0,88	0,81	0,74	0,77	0,79	0,87	0,86	0,84	0,87		0,28	0,18	0,14	0,17	0,17	0,23	0,21	0,17	0,24	0,23	0,25	0,30	0,26	0,20	0,21	0,27	0,22	0,22	0,23	0,22	0,23	0,23	0,29	0,21	0,26	0,20	0,30	0,27	0,19	0,17	0,22	0,21	0,23	
16	0,66	0,65	0,62	0,66	0,65	0,71	0,70	0,65	0,70	0,66	0,71	0,70	0,69	0,70	0,72		0,34	0,29	0,32	0,31	0,39	0,34	0,32	0,34	0,37	0,35	0,39	0,38	0,34	0,34	0,38	0,32	0,34	0,37	0,32	0,35	0,37	0,41	0,33	0,38	0,33	0,40	0,39	0,34	0,34	0,35	0,33	0,37	
17	0,76	0,79	0,80	0,77	0,77	0,82	0,76	0,72	0,74	0,81	0,79	0,79	0,81	0,82	0,66	0,66		0,17	0,22	0,20	0,21	0,24	0,20	0,27	0,26	0,26	0,30	0,26	0,22	0,20	0,28	0,25	0,25	0,22	0,26	0,26	0,28	0,27	0,29	0,24	0,33	0,29	0,19	0,21	0,23	0,23	0,26		
18	0,79	0,80	0,80	0,79	0,77	0,84	0,82	0,73	0,78	0,78	0,86	0,84	0,81	0,86	0,86	0,71	0,83		0,18	0,18	0,25	0,21	0,20	0,23	0,24	0,23	0,23	0,29	0,25	0,21	0,19	0,26	0,22	0,21	0,23	0,21	0,24	0,24	0,29	0,21	0,26	0,20	0,30	0,27	0,18	0,19	0,21	0,19	0,25
19	0,77	0,81	0,77	0,77	0,77	0,71	0,74	0,76	0,83	0,80	0,80	0,80	0,83	0,83	0,68	0,78	0,82	0,19		0,25	0,23	0,19	0,26	0,26	0,26	0,31	0,26	0,20	0,19	0,19	0,24	0,24	0,24	0,25	0,22	0,30	0,23	0,28	0,24	0,30	0,26	0,20	0,22	0,23	0,24	0,26			
20	0,78	0,80	0,78	0,79	0,76	0,83	0,78	0,71	0,75	0,76	0,83	0,81	0,80	0,85	0,83	0,69	0,80	0,82	0,81		0,22	0,23	0,18	0,24	0,26	0,26	0,31	0,26	0,21	0,19	0,28	0,22	0,24	0,24	0,24	0,25	0,24	0,31	0,24	0,27	0,23	0,31	0,28	0,21	0,19	0,24	0,23	0,24	
21	0,73	0,76	0,76	0,75	0,72	0,76	0,72	0,68	0,68	0,71	0,77	0,73	0,73	0,77	0,77	0,61	0,79	0,75	0,75	0,78		0,26	0,21	0,30	0,29	0,29	0,30	0,28	0,24	0,22	0,29	0,26	0,27	0,29	0,27	0,30	0,27	0,32	0,28	0,32	0,28	0,35	0,30	0,25	0,22	0,26	0,26	0,28	
22	0,74	0,76	0,74	0,75	0,75	0,80	0,74	0,72	0,70	0,72	0,80	0,79	0,77	0,78	0,79	0,66	0,76	0,79	0,77	0,77	0,74		0,23	0,28	0,29	0,23	0,30	0,26	0,23	0,23	0,28	0,25	0,27	0,24	0,25	0,23	0,24	0,29	0,26	0,27	0,32	0,25	0,22	0,23	0,23	0,24	0,29		
23	0,77	0,78	0,77	0,78	0,77	0,82	0,77	0,70	0,74	0,75	0,81	0,80	0,80	0,82	0,83	0,68	0,80	0,80	0,81	0,82	0,79	0,77		0,22	0,26	0,26	0,29	0,24	0,21	0,19	0,27	0,24	0,23	0,25	0,25	0,27	0,24	0,31	0,24	0,28	0,23	0,31	0,27	0,22	0,20	0,23	0,23	0,25	
24	0,72	0,73	0,72	0,73	0,70	0,76	0,73	0,67	0,70	0,71	0,75	0,76	0,74	0,76	0,76	0,66	0,73	0,77	0,74	0,76	0,70	0,72	0,78		0,30	0,29	0,34	0,31	0,25	0,25	0,32	0,25	0,27	0,29	0,27	0,33	0,31	0,33	0,27	0,30	0,26	0,33	0,32	0,26	0,27	0,28	0,27	0,28	
25	0,72	0,75	0,72	0,74	0,72	0,75	0,74	0,65	0,71	0,71	0,75	0,75	0,74	0,76	0,77	0,63	0,74	0,76	0,74	0,74	0,71	0,71	0,74	0,70		0,30	0,36	0,32	0,25	0,26	0,31	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,31	0,33	0,28	0,31	0,28	0,33	0,31	0,25	0,27	0,29	0,28	0,29	
26	0,71	0,73	0,73	0,73	0,71	0,76	0,72	0,70	0,72	0,70	0,77	0,77	0,73	0,76	0,75	0,65	0,74	0,77	0,74	0,74	0,71	0,77	0,74	0,71	0,70		0,28	0,26	0,25	0,26	0,27	0,28	0,27	0,27	0,24	0,26	0,28	0,31	0,27	0,29	0,28	0,34	0,29	0,25	0,25	0,24	0,26	0,27	
27	0,66	0,68	0,66	0,66	0,66	0,72	0,68	0,67	0,65	0,65	0,70	0,69	0,69	0,71	0,70	0,71	0,69	0,69	0,70	0,70	0,71	0,66	0,64	0,72		0,31	0,30	0,32	0,35	0,33	0,34	0,32	0,29	0,32	0,33	0,36	0,36	0,33	0,32	0,38	0,32	0,30	0,30	0,30	0,28	0,30			

APÊNDICE D – Tabela 14 - Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através dos marcadores RAPD, SSR e AFLP, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

Tabela 14 – Matriz contendo os valores de similaridade (abaixo) e dissimilaridade genética (acima) calculados a partir da comparação entre pares de variedades crioulas de milho através dos marcadores RAPD, SSR e AFLP, pelo coeficiente de Jaccard. As células em vermelho representam o valor máximo de similaridade/dissimilaridade e as em azul os valores mínimos de similaridade/dissimilaridade. Ponta Grossa, 2012.

VAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
1		0,22	0,26	0,25	0,30	0,24	0,28	0,36	0,30	0,29	0,26	0,28	0,27	0,26	0,25	0,38	0,30	0,27	0,29	0,27	0,31	0,32	0,28	0,33	0,33	0,37	0,34	0,29	0,30	0,36	0,30	0,31	0,33	0,32	0,33	0,31	0,37	0,32	0,35	0,33	0,34	0,35	0,31	0,30	0,33	0,32	0,34		
2	0,78		0,24	0,24	0,29	0,23	0,29	0,36	0,31	0,30	0,25	0,26	0,27	0,24	0,26	0,38	0,26	0,25	0,27	0,27	0,31	0,31	0,29	0,32	0,32	0,32	0,37	0,34	0,28	0,28	0,34	0,30	0,30	0,31	0,31	0,34	0,32	0,37	0,31	0,34	0,30	0,36	0,34	0,28	0,29	0,32	0,32	0,32	
3	0,74	0,76		0,27	0,27	0,25	0,30	0,37	0,32	0,32	0,24	0,28	0,27	0,27	0,28	0,40	0,27	0,27	0,28	0,28	0,30	0,32	0,29	0,32	0,33	0,32	0,36	0,36	0,29	0,28	0,33	0,31	0,31	0,33	0,31	0,33	0,32	0,36	0,33	0,35	0,33	0,38	0,33	0,30	0,29	0,32	0,32	0,35	
4	0,75	0,76	0,73		0,28	0,24	0,27	0,34	0,30	0,29	0,26	0,28	0,26	0,25	0,24	0,37	0,29	0,26	0,29	0,27	0,31	0,31	0,27	0,32	0,32	0,32	0,37	0,35	0,28	0,29	0,34	0,30	0,31	0,34	0,32	0,32	0,31	0,36	0,29	0,35	0,32	0,36	0,34	0,30	0,29	0,31	0,32	0,35	
5	0,70	0,71	0,73	0,72		0,25	0,31	0,35	0,30	0,33	0,25	0,29	0,27	0,28	0,27	0,36	0,29	0,28	0,31	0,29	0,32	0,30	0,28	0,34	0,32	0,32	0,35	0,35	0,28	0,28	0,35	0,31	0,32	0,33	0,31	0,32	0,32	0,35	0,32	0,34	0,33	0,34	0,35	0,30	0,32	0,33	0,31	0,34	
6	0,76	0,77	0,75	0,76	0,75		0,22	0,30	0,26	0,27	0,19	0,20	0,22	0,21	0,20	0,32	0,23	0,21	0,25	0,23	0,29	0,26	0,26	0,28	0,30	0,29	0,31	0,32	0,25	0,26	0,32	0,27	0,28	0,29	0,25	0,29	0,28	0,33	0,28	0,31	0,26	0,32	0,30	0,26	0,26	0,29	0,27	0,29	
7	0,72	0,71	0,70	0,73	0,69	0,78		0,32	0,28	0,29	0,24	0,25	0,27	0,24	0,25	0,35	0,30	0,24	0,29	0,28	0,32	0,33	0,29	0,32	0,32	0,34	0,36	0,36	0,30	0,31	0,35	0,30	0,32	0,34	0,30	0,34	0,33	0,36	0,32	0,34	0,30	0,36	0,36	0,31	0,31	0,34	0,32	0,35	
8	0,64	0,64	0,63	0,66	0,65	0,70	0,68		0,33	0,36	0,30	0,33	0,31	0,32	0,32	0,38	0,31	0,32	0,33	0,34	0,35	0,34	0,34	0,36	0,38	0,35	0,37	0,39	0,34	0,34	0,38	0,37	0,37	0,37	0,33	0,36	0,35	0,38	0,37	0,36	0,36	0,39	0,37	0,34	0,36	0,35	0,35	0,37	
9	0,70	0,69	0,68	0,70	0,70	0,74	0,72	0,67		0,31	0,28	0,28	0,29	0,29	0,28	0,34	0,33	0,28	0,31	0,30	0,36	0,35	0,32	0,34	0,34	0,34	0,37	0,37	0,31	0,32	0,37	0,31	0,33	0,34	0,31	0,34	0,34	0,38	0,31	0,36	0,32	0,34	0,37	0,33	0,33	0,34	0,33	0,35	
10	0,71	0,70	0,68	0,71	0,67	0,73	0,71	0,64	0,69		0,28	0,29	0,29	0,28	0,28	0,37	0,31	0,28	0,31	0,30	0,34	0,35	0,31	0,34	0,34	0,34	0,37	0,36	0,32	0,30	0,37	0,34	0,32	0,35	0,32	0,33	0,36	0,39	0,33	0,36	0,34	0,36	0,35	0,31	0,33	0,35	0,35	0,36	
11	0,74	0,75	0,76	0,74	0,75	0,81	0,76	0,70	0,72	0,72		0,20	0,21	0,20	0,19	0,34	0,23	0,21	0,24	0,25	0,29	0,27	0,26	0,30	0,30	0,29	0,34	0,32	0,26	0,27	0,32	0,28	0,29	0,28	0,27	0,27	0,28	0,31	0,27	0,30	0,28	0,35	0,31	0,25	0,25	0,28	0,28	0,30	
12	0,72	0,74	0,72	0,72	0,71	0,80	0,75	0,67	0,72	0,71	0,80		0,24	0,23	0,21	0,34	0,25	0,23	0,27	0,25	0,30	0,29	0,27	0,30	0,31	0,30	0,35	0,31	0,28	0,28	0,33	0,29	0,31	0,30	0,28	0,30	0,30	0,32	0,29	0,32	0,28	0,34	0,32	0,26	0,28	0,29	0,31	0,31	
13	0,73	0,73	0,73	0,74	0,73	0,78	0,73	0,69	0,71	0,71	0,79	0,76		0,23	0,22	0,34	0,26	0,25	0,27	0,25	0,31	0,30	0,26	0,30	0,32	0,31	0,35	0,34	0,28	0,28	0,34	0,31	0,29	0,31	0,30	0,32	0,30	0,34	0,28	0,32	0,30	0,34	0,33	0,28	0,27	0,32	0,30	0,33	
14	0,74	0,76	0,73	0,75	0,72	0,79	0,76	0,68	0,71	0,72	0,80	0,77	0,77		0,20	0,34	0,26	0,21	0,24	0,23	0,28	0,28	0,25	0,29	0,31	0,29	0,33	0,31	0,27	0,25	0,31	0,29	0,28	0,29	0,28	0,29	0,30	0,33	0,26	0,30	0,27	0,33	0,31	0,26	0,26	0,29	0,28	0,29	
15	0,75	0,74	0,72	0,76	0,73	0,80	0,75	0,68	0,72	0,72	0,81	0,79	0,78	0,80		0,31	0,25	0,21	0,25	0,23	0,28	0,28	0,23	0,30	0,29	0,30	0,33	0,31	0,26	0,28	0,32	0,27	0,28	0,30	0,27	0,29	0,29	0,33	0,28	0,31	0,27	0,34	0,32	0,26	0,25	0,29	0,27	0,30	
16	0,62	0,62	0,60	0,63	0,64	0,68	0,65	0,62	0,66	0,63	0,66	0,66	0,66	0,66	0,69		0,36	0,32	0,38	0,36	0,41	0,38	0,35	0,37	0,38	0,38	0,41	0,42	0,37	0,38	0,42	0,36	0,38	0,40	0,35	0,38	0,40	0,42	0,37	0,41	0,36	0,41	0,41	0,38	0,39	0,39	0,38	0,41	
17	0,70	0,74	0,73	0,71	0,71	0,77	0,70	0,69	0,67	0,69	0,77	0,75	0,74	0,74	0,75	0,64		0,22	0,28	0,26	0,26	0,30	0,27	0,32	0,32	0,31	0,34	0,34	0,28	0,27	0,34	0,32	0,30	0,32	0,29	0,32	0,31	0,32	0,32	0,34	0,29	0,37	0,33	0,26	0,27	0,29	0,30	0,32	
18	0,73	0,75	0,73	0,74	0,72	0,79	0,76	0,68	0,72	0,72	0,79	0,77	0,75	0,79	0,79	0,68	0,78		0,25	0,25	0,30	0,28	0,27	0,29	0,30	0,27	0,33	0,33	0,27	0,26	0,33	0,28	0,27	0,30	0,25	0,30	0,29	0,33	0,27	0,30	0,26	0,34	0,31	0,26	0,27	0,28	0,26	0,30	
19	0,71	0,73	0,72	0,71	0,69	0,75	0,71	0,67	0,69	0,69	0,76	0,73	0,73	0,76	0,75	0,62	0,72	0,75		0,26	0,32	0,29	0,27	0,32	0,33	0,31	0,32	0,35	0,33	0,28	0,25	0,26	0,30	0,31	0,32	0,30	0,31	0,29	0,35	0,30	0,32	0,31	0,36	0,33	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32
20	0,73	0,73	0,72	0,73	0,71	0,77	0,72	0,66	0,70	0,70	0,75	0,75	0,75	0,77	0,77	0,64	0,74	0,75	0,74		0,28	0,28	0,26	0,30	0,31	0,31	0,34	0,32	0,26	0,26	0,32	0,29	0,30	0,29	0,30	0,34	0,30	0,33	0,29	0,35	0,33	0,33	0,27	0,27	0,30	0,29	0,32		
21	0,69	0,69	0,70	0,69	0,68	0,71	0,68	0,65	0,64	0,66	0,71	0,70	0,69	0,72	0,72	0,59	0,74	0,70	0,68	0,72		0,33	0,27	0,34	0,33	0,33	0,34	0,34	0,30	0,28	0,34	0,32	0,31	0,36	0,31	0,33	0,31	0,35	0,34	0,36	0,34	0,38	0,35	0,30	0,28	0,32	0,32	0,34	
22	0,68	0,69	0,68	0,69	0,70	0,74	0,67	0,66	0,65	0,65	0,73	0,71	0,70	0,72	0,72	0,62	0,70	0,72	0,71	0,72	0,67		0,30	0,35	0,34	0,29	0,34	0,33	0,28	0,28	0,33	0,32	0,34	0,30	0,31	0,29	0,29	0,33	0,33	0,32	0,32	0,28	0,31	0,31	0,31	0,35	0,31	0,35	
23	0,72	0,71	0,71	0,73	0,72	0,74	0,71	0,66	0,68	0,69	0,74	0,73	0,74	0,75	0,77	0,65	0,73	0,73	0,73	0,74	0,73	0,70		0,28	0,30	0,30	0,34	0,31	0,27	0,27	0,33	0,29	0,29	0,32	0,31	0,32	0,30	0,36	0,31	0,34	0,30	0,35	0,33	0,29	0,28	0,30	0,30	0,31	
24	0,67	0,68	0,68	0,68	0,66	0,72	0,68	0,64	0,66	0,66	0,70	0,70	0,70	0,71	0,70	0,63	0,68	0,71	0,68	0,70	0,66	0,65	0,72		0,34	0,32	0,36	0,37	0,30	0,31	0,38	0,31	0,32	0,36	0,32	0,36	0,35	0,37	0,34	0,34	0,32	0,37	0,37	0,33	0,34	0,34	0,34	0,34	
25	0,67	0,68	0,67	0,68	0,68	0,70	0,68	0,62	0,66	0,66	0,70	0,69	0,68	0,69	0,71	0,62	0,68	0,70	0,67	0,69	0,67	0,66	0,70	0,66		0,34	0,39	0,36	0,31	0,32	0,37	0,32	0,32	0,34	0,34	0,37	0,35	0,37	0,33	0,36	0,34	0,37	0,37	0,33	0,34	0,35	0,33	0,36	
26	0,67	0,68	0,68	0,68	0,68	0,71	0,66	0,65	0,66	0,66	0,71	0,70	0,69	0,71	0,70	0,62	0,69	0,73	0,68	0,69	0,67	0,71	0,70	0,68	0,66		0,32	0,33	0,31	0,30	0,32	0,33	0,32	0,33	0,29	0,32	0,32	0,34	0,33	0,35	0,32	0,38	0,34	0,30	0,32	0,31	0,31	0,34	
27	0,63	0,63	0,64	0,63	0,65	0,69	0,64	0,63	0,63	0,63	0,66	0,65	0,65	0,67	0,67	0,59	0,66	0,67	0,65	0,66	0,66	0,66	0,64	0,61	0,68		0,37	0,34	0,36	0,39	0,37	0,37	0,36	0,31	0,36	0,36	0,38	0,39	0,37	0,36	0,40	0,36	0,34	0,35					

