

ÉDER CRISTIAN MALTA DE LANES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL  
POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

ÉDER CRISTIAN MALTA DE LANES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL  
POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

**APROVADA: 27 de Julho de 2010**

---

Dr. Eveline Teixeira Caixeta  
(Co-orientador)

---

Prof. José Marcelo Soriano Viana  
(Co-orientador)

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike

---

Prof. Cosme Damião Cruz

---

Prof. Glauco Vieira Miranda  
(Orientador)

“Primeiro concebo com a mente; depois, interrogo a natureza por meio de uma experiência. Depois, verifico se o que concebi é falso ou verdadeiro. O resultado será um simples sim ou não”. (Galileu, 1623)

Dedico este trabalho com muito amor, aos meus pais, ao meu irmão e a toda a minha família, aos meus amigos e, principalmente a Deus pela proteção constante.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, e por ter-me dado o dom da inteligência e a oportunidade de crescimento e perseverança no alcance de meus ideais.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Glauco Vieira Miranda, pelo enorme incentivo e confiança, durante toda a pós-graduação.

À Dr. Eveline Teixeira Caixeta, pelo o enorme incentivo e confiança, mas principalmente, pela admirável disponibilidade em ajudar e ensinar, competência, empenho e pela amizade, pelos conselhos e pela orientação em todas as etapas deste trabalho. Você sempre será uma referência de profissionalismo e comprometimento por toda a minha vida!

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike, pela alegria e palavras de incentivo durante a execução do trabalho. Ao Prof. José Marcelo Soriano Viana, pelas sugestões na elaboração deste trabalho. Ao Prof. Cosme Damião Cruz, pelo esclarecimento de dúvidas e sugestões. As secretarias do Programa de Genética e Melhoramento, onde fui sempre bem recebido.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Leite em especial ao PhD. Jackson Silva e Oliveira e Dr. Fernando César Ferraz Lopes pela oportunidade e confiança, competência, empenho e pela amizade, pelos conselhos e estímulos. Durante o período de Graduação e estágio.

Aos meus colegas de Mestrado, Doutorado e Programa Milho em especial ao Marcelo Soares, Ciro Brito, Paulinho, Cândida, Paulo Coutinho, Filipe, Júlio César, Luciano, Keny, Lucimar, Luciana, Julliane, Jardécio, Ítalo, José Roberto de Bem, Pedro, Roberto, pelo estímulo e a agradável convivência nestes dois e longos anos de pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório, em especial a Renata Dias, Telma Miranda, Filipe Knopp, Janaína, Francisco, Marcos. Não posso deixar de lembrar a chefe e Dr. Márcia Fabiana de Paula pelos orçamentos e compra de reagentes, além da grande ajuda na realização do trabalho. À Geisa Paes pela enorme contribuição, parceira de todos os momentos durante o período de execução do experimento. Gostaria de agradecer a todos pela a alegria e descontração durante todo este tempo de trabalho. Gostaria de agradecer também a todos do Laboratório do Biocafé onde fui muito bem recebido, principalmente, ao Flávio Souza, Kátia Pestana, Samuel Alvarenga e Rejane. A partir de agora vocês fazem parte da historia de minha vida, obrigado!

Aos meus pais Sueli Aparecida Malta de Lanes e João Alves de Lanes pelo constante incentivo, pelos esforços dedicados a minha educação e

formação cristã, pelo amor e fonte de luz nesta longa caminhada, pelas preces e pelas lições de vida.

Ao meu irmão Everton Lanes, pelas palavras de apoio e carinho, pela amizade, pelo amor, à cumplicidade e união.

Aos meus avós José e Felizarda pelo exemplo de vida e de fé.

À memória de meus avós falecidos: Valentin e Nelza.

Aos meus tios e tias em especial, ao Jairo, ao Eli, ao Edison, ao José, ao Antônio, ao Erli, à Marlene, à Filinha, à Nelsi, ao Mauri, à Leila, ao Valcy, e em especial a minha tia Marly por ter me recebido e acolhido em sua casa durante toda o período de graduação e parte do ensino médio.

A todos os meus primos e primas em especial, Wilson, Alan, Édipo, Camila, Paula, Evelin, Michele, Grayce, Monaliza, Aline, João Vitor, Christian, David, Thiago, Raíla, Lílian, Leandro, Diana, Laianara, Luciano, Fabiano, Ellen, Eleno.

A minha namorada Julieta Neta pela paciência, compreensão, amor e carinho.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

## RESUMO

LANES, Éder Cristian Malta de, M.Se., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Caracterização molecular de linhagens de milho tropical por marcadores microssatélites.** Orientador: Glauco Vieira Miranda, Co-orientadores: Eveline Teixeira Caixeta e José Marcelo Soriano Viana.

O conhecimento da diversidade genética (GD) e as relações entre linhagens de milho podem permitir caracterizar o germoplasma e classificar os genótipos em grupos heteróticos distintos, sendo essas informações importantes na escolha de genitores para a obtenção de híbridos com maior heterose e alta produtividade de grãos. Os objetivos deste estudo foram (1) investigar o nível de diversidade genética existente entre as linhagens de milho tropical do Banco de Germoplasma do Programa Milho, (2) estimar o potencial de informatividade dos locos SSRs nas linhagens de milho estudadas e (3) averiguar a presença de alelos exclusivos presentes em grupos de linhagens pertencentes a diferentes empresas de melhoramento. A similaridade genética entre todos os pares de linhagens ( $i, j$ ) foi calculada pelo índice ponderado, e para o cálculo da medida de dissimilaridade ( $D_{ij}$ ) utilizou-se o complemento aritmético ( $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ ). No total, 471 alelos SSR foram identificados, com uma média de 5,81 alelos por loco. O conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) foi de 0,5733. A dissimilaridade genética entre as linhagens variou 0,19-0,67, com uma média de 0,49. A análise de agrupamento pelo método de Tocher e UPGMA foi eficiente no agrupamento das linhagens, sugerindo um total de dezoito grupos. A maioria das linhagens esteve condizente com suas origens, embora com algumas discrepâncias. O padrão de agrupamento das linhagens revelou haver uma base genética ampla entre a maioria das linhagens. Uma explicação plausível é que estas foram originadas de grupos heteróticos diferentes. A variabilidade detectada nos grupos formados por meio de locos SSR pode contribuir para a utilização eficaz das linhagens para a exploração da heterose e ampliação da base genética do programa.

## ABSTRACT

LANES, Éder Cristian Malta de, M.Se., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Molecular characterization of tropical maize lines by microsatellite markers.** Adviser: Glauco Vieira Miranda, Co- Adviser: Eveline Teixeira Caixeta and José Marcelo Soriano Viana.

Knowledge of genetic diversity (GD) and relationships among maize inbred lines may allow characterization of the germplasm sort the genotypes into distinct heterotic groups, and this information is important in the choice of parents to obtain hybrids with high heterosis and increased grain yield. Our objectives in this study were (1) investigate the genetic diversity among tropical maize inbred lines from the germplasm collection of Maize Program<sup>®</sup> UFV, (2) estimate the potential informativeness of the SSR loci studied in maize inbred lines and (3) investigate the presence of alleles present in groups of strains belonging to different companies for improvement. The genetic similarity between all pairs of strains ( $S_{ii}$ ) were calculated by the weighted index, and for calculating the dissimilarity measure ( $D_{ii}$ ) we used the arithmetic complement ( $D_{ii} = 1 - S_{ii}$ ). In total, 471 SSR alleles were identified, with an average of 5.81 alleles per locus. The average polymorphism information content (PIC) was 0.5733. The genetic dissimilarity between strains ranged from 0.19 to 0.67, with an average of 0.49. Cluster analysis by the Tocher and UPGMA method was efficient in grouping inbred lines, suggesting a total of eighteen groups. Most of the inbred lines were consistent with its origins, although with some discrepancies. The pattern of groupings of the inbred lines revealed that there is ample genetic base among the majority of inbred lines. The plausible explanation is that these were derived from different heterotic groups. The variability detected in the groups formed by SSR loci may contribute to the efficient use of inbred lines for exploitation of heterosis and broadening the genetic base of the program. The variability detected in the small number of groups formed by SSR loci may contribute to the effective use of inbred lines for the exploitation of heterosis and broadening the genetic base of the program.

## INTRODUÇÃO GERAL

Devido à característica de alta adaptabilidade a diversos ambientes, o milho é o cereal mais cultivado em termos de número de países (Laborda, 2003) e devido a sua importância econômica no mundo é uma das espécies vegetais mais estudadas, fazendo com que programas de melhoramento busquem constantemente novos procedimentos para a obtenção de variedades mais produtivas e economicamente rentáveis (Guimarães, 2007). De acordo com Bison et al. (2003) a obtenção de cultivares híbridas foi a principal causa do espetacular aumento em produtividade de grãos na cultura do milho, possibilitando, mesmo com a redução da área cultivada, atender à demanda crescente por esse cereal observada no último século.

O melhoramento de milho, visando à produção de híbridos, está baseado na identificação das melhores linhagens endogâmicas e posteriores cruzamentos entre estas para a obtenção de híbridos superiores (Amorim, 2005; Lima et al., 2000). O emprego de linhagens em programas de melhoramento está associado à busca do vigor híbrido, ou heterose, fenômeno que proporciona maior produtividade de F1 em relação aos genitores porque exibem alta divergência entre si (Paterniani et al., 2008). Na tentativa de escolha dos melhores genitores, ensaios vêm sendo realizados para mostrar que cruzamentos entre linhagens com relativa divergência entre si resultam em híbridos com alto vigor (Guimarães, 2007).

No caso da cultura do milho, visando à produção de híbrido, normalmente são escolhidas duas populações que apresentam alta capacidade específica de combinação. A heterose ou a capacidade específica do cruzamento de duas populações dependem da existência de dominância no controle do caráter e da divergência entre elas (Falconer, 1981), de forma que, na escolha dos genitores dessas populações, a preferência é que sejam divergentes e adaptados (Dias & Kageyama, 1997).

A variabilidade genética dentro de uma população é de grande importância pois que sem ela a seleção não é eficiente, conforme relatado por Johanssen em 1906 (Allard, 1971). Sob o ponto de vista agrônomo a importância dessa variabilidade está relacionada à tentativa de se diminuir a vulnerabilidade da cultura ao ataque de pragas e doenças e a outras adversidades (Borrero et al., 1997). Ampliar a base genética de uma cultura cultivada seria, portanto, uma solução para tenta minimizar essa vulnerabilidade.

Estudos de divergência genética são importantes para o conhecimento da variabilidade genética existente nos bancos de germoplasmas (Cruz & Carneiro, 2003), possibilitando o monitoramento, auxiliando na identificação de possíveis duplicatas e fornecendo parâmetros para escolha de progenitores, que ao serem cruzados, possibilitem maior heterose aumentando as chances de obtenção de genótipos superiores. Como a heterose só se manifesta quando as populações são divergentes geneticamente e quando o caráter tiver alto nível de dominância direcional (Falconer & Mackay, 1996), pode-se direcionar os cruzamentos para capitalizar a heterose nos híbridos e, conseqüentemente, os híbridos formados por cruzamentos de linhagens oriundas de diferentes grupos heteróticos apresentarão desempenhos superiores daqueles híbridos formados por cruzamentos de linhagens oriundas do mesmo grupo heterótico (Hallauer et al., 1988 citado por Amorin & Souza, 2005).

O sucesso de um programa de melhoramento de milho visando à obtenção de híbridos está ligado à identificação da população mais promissora para a extração de linhagens. Entre os procedimentos que auxiliam os melhoristas nessa escolha, destaca-se os cruzamentos dialélicos, no qual uma série de genótipos são cruzados entre si, em todas as combinações possíveis. Os dialélos tem se mostrado eficientes para detectar divergências genéticas entre linhagens e a alocação destas em grupos heteróticos distintos, além destes, possibilita estimar a capacidade geral de combinação (CGC) e da capacidade específica de combinação (CEC) das linhagens (Soengas et al., 2003). Barbosa et al. (2003) relata que tem sido muito utilizado pelos melhoristas métodos de cruzamentos dialélicos associados aos marcadores moleculares na tentativa de facilitar a etapa de

avaliação e escolha de linhagens quanto à capacidade de combinação para maximizar a heterose dos híbridos.

Dentre os vários métodos de estudo da diversidade, os dados obtidos por meio de técnicas moleculares superam a grande maioria das limitações existentes nas demais formas de análise (Laborda et al., 2005). De acordo com Guimarães (2007) as novas técnicas utilizando biologia molecular estão sendo empregadas, com o intuito de alocar as linhagens em grupos distintos, baseando-se a divergência genética entre elas, reduzindo o número de cruzamentos a serem efetuados, dirigindo os cruzamentos que possibilitarão a obtenção de híbridos heteróticos e aumentando a possibilidade de obtenção de híbridos superiores.

Os marcadores de DNA são ferramentas moleculares poderosas por atuarem diretamente em nível de DNA pela presença ou ausência de um determinado fragmento amplificado que produzem um padrão de bandas específico conhecido como impressão digital genômica (DNA fingerprinting). O “fingerprinting” ou genotipagem molecular é a “impressão digital” de um determinado genótipo, que permite a obtenção de seu perfil genético e sua diferenciação inequívoca de outro genótipo (Guimarães et. al., 2004; Faleiro, 2007). Os métodos que utilizam diretamente o DNA apresentam grandes vantagens, pois, são isentos de influência ambiental, são potencialmente ilimitados, independem da idade da planta, apresentam um elevado poder de discriminação e são passíveis de utilização em uma série de procedimentos relacionados ao melhoramento de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Guimarães et. al., 2004). O uso de marcadores moleculares permite identificar o polimorfismo diretamente do DNA, havendo diferentes técnicas para este propósito podendo estes, serem utilizados para estudos de diversidade genética, mapeamento e localização de QTLs, etc (Caixeta et al., 2009).

Segundo Guimarães et. al. (2004) dentre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats – Sequências Simple Repetidas) que consistem de pequenas seqüências de dois a seis pares de bases de comprimento repetidas em tandem, são os mais indicados para a diferenciação varietal. De acordo com este mesmo autor esses marcadores são baseados em uma metodologia simples e rápida, que gera marcadores com elevado conteúdo de informação genética e amplamente distribuídos no genoma do milho, além do que, a técnica SSR apresentam alta

resolução genética e tem como vantagem o uso semi-automatizado, o que aumenta a capacidade para processamento de dados. Powell et al. (1996) relatam que os SSRs são úteis para uma variedade de aplicações em genética devido a sua reprodutibilidade, natureza multialélica, pelo alto grau de polimorfismo, herança co-dominante, relativa abundância e boa cobertura do genoma. Estas e outras características fazem com que marcadores baseados em SSR sejam marcadores ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação, discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Devido à natureza co-dominante estes marcadores podem ser usados em estudos de parentesco, de proteção e de identificação de variedades de plantas em bancos de germoplasma (Lopes et al., 1999; Diwan & Cregan, 1997; Caixeta et al., 2009).

Pinto et al., (2003) empregaram os SSRs com o objetivo de avaliar a divergência genética em populações de milho tropical submetidas a alta intensidade de seleção recorrente recíproca. Foram utilizados 30 loci de microssatélites para medir e comparar a distância genética nas populações de estudo e de seus sintéticos. Verificaram que não houve diferença significativa nas populações considerando os dados de distância genética obtidos. Também verificaram que, como consequência da seleção, a variabilidade foi perdida em termos de números de alelos por loci e pela proporção de loci polimórficos. Oliveira et al., (2004) avaliaram a relação genética entre 96 linhagens endogâmicas de milho tropical através de marcadores AFLP. O nível de polimorfismo entre os genótipos e a possibilidade de sua alocação em grupos heteróticos foram avaliados. A informação obtida pelos dados AFLP pode agrupar essas linhagens em grupos heteróticos distintos, mostrando ser um marcador de grande poder de detecção da variabilidade genética em milho tropical. Laborda et al., (2005) em seu estudo de diversidade genética com 85 linhagens de milho obtidas do banco de germoplasma do IAC e CIMMYT utilizando SSR e AFLP, relataram que a variabilidade existente entre as linhagens de milho tropical analisadas é vasta e grupos divergentes bem definidos não são formados, e quando o parâmetro “número médio de alelos” é considerado, observa-se que o milho tropical talvez exiba mesmo nível de variabilidade que o milho de clima temperado. Beyene et al. (2006) utilizando SSR no estudo de diversidade genética em 62 acessos de milho tradicional de diferentes regiões de terras altas da Etiópia, relataram a

existência de 5 grupos de acessos com uma média de dissimilaridade genética de 0,49. Em outro trabalho semelhante, Legesse et al. (2007) também obtiveram pelo método UPGMA cinco grupos de linhagens, no qual foram avaliados 56 linhagens de milho do CIMMYT para terras altas obtidos a partir de programas na Etiópia e Zimbabué. De acordo com Melchinger (1999), ao se comparar os RFLPs com SSRs em milho observou-se alta correlação ( $r = 0,95$ ) entre as estimativas de distância genética (DG) e concordância ( $r \geq 0,80$ ) com os dados genealógicos. Enquanto os valores do PIC foram semelhantes para ambos os tipos de marcadores, os SSRs apresentaram menores desvios do modo de herança mendeliana que os RFLPs. E de acordo com este mesmo autor, levando em consideração os relatos de vários autores a tecnologia por SSRs oferece vantagens sobre RFLPs em termos de confiabilidade, reprodutibilidade, discriminação, padronização e custo-eficácia. Resultado similar foi obtido por Taramino & Tingey (1995), em análise comparativa entre marcadores RFLP e SSR, onde concluíram que marcadores SSR são mais informativos que marcadores RFLP e podem ser usados como ferramenta para análise de espécies altamente polimórficas como o milho.

Assim, os objetivos deste estudo foram (1) investigar o nível de diversidade genética existente entre as linhagens de milho tropical do Banco de Germoplasma do Programa Milho, (2) estimar o potencial de informatividade dos locos SSRs nas linhagens de milho estudadas e (3) averiguar a presença de alelos exclusivos presentes em grupos de linhagens pertencentes a diferentes empresas de melhoramento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Análise molecular e Material vegetal

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (LBMV\ DFT\UFV), em Viçosa, MG.

O total de 90 linhagens de milho tropical foi utilizado neste estudo, no qual foram selecionadas do germoplasma do Programa Milho<sup>®</sup> UFV, programa de melhoramento situado no Campo Experimental Diogo Alves de Mello, pertencente ao Departamento de Fitotecnia - UFV. As linhagens de milho são oriundas de híbridos comerciais, que foram autofecundados por várias gerações, sendo o histórico do pedigree assim como suas origens apresentados na (Tabela 1). As linhagens foram semeadas em vaso cultivado em casa de vegetação (DFT\UFV) para coleta de material vegetal e posterior extração de DNA.

### Extração de DNA

Amostras de tecidos foliares jovens (2-3 semanas após a germinação) foram coletadas individualmente de cada linhagem, envolvidas em papel alumínio, identificadas e mergulhadas em isopor em Nitrogênio líquido, para que não houvesse degradação do DNA.

O DNA genômico foi isolado usando-se hexa-decyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) procedimento de extração de DNA, como descrito por Doyle & Doyle (1990) modificado por Lanes et al. (2009), descritas a seguir.

O tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e aproximadamente 250 mg de amostras foram transferidos para tubos de 2,0 mL, adicionando-se 1000 µL de tampão de extração pré-aquecido, constituído por NaCl 1,4 M; Tris-HCl 110 mM, pH 8,0; EDTA 55 mM; CTAB 2% e água Milli-Q. Juntamente com o tampão adicionou-se 100 µL de SDS 20%, e em seguida, os materiais foram incubados a 65 °C em banho-maria por 60 minutos sendo as amostras invertidas suavemente a cada 10 minutos.

**Tabela 1.** Identificação, histórico do Pedigree e origem das 90 linhagens de milho utilizadas no estudo de diversidade genética por SSR.

Nº	Identificação	Pedigree e história de seleção <sup>a</sup>	Origem <sup>b</sup>	Empresa <sup>c</sup>	Nº	Identificação	Pedigree e história de seleção <sup>a</sup>	Origem <sup>b</sup>	Empresa <sup>c</sup>
1	<b>08-841-2</b>	PopC195-CI03C195-B-24-1-3-1	34M11	Agromen	46	<b>09-6926</b>	PopC51-CI03C51-B-12-2-1-2-1-1	A 3663	Nidera
2	<b>08-919</b>	PopC42-CI03C42-B-3-2-2-1	Pointer	Syngenta	47	<b>09-6927</b>	PopC53-CI03C53-B-4-1-1-1-1-1	Garra	Syngenta
3	<b>08-970-3</b>	PopC51-CI03C51-B-5-2-1-1	A3663	Nidera	48	<b>09-6928</b>	PopC55-CI03C55-B-20-3-2-1-1-1	Balu 551	Balu
4	<b>08-984-1</b>	PopC53-CI03-C53-B-16-1-2-1	Garra	Syngenta	49	<b>09-6929</b>	PopC56-CI03-C56-B-26-1-1-2-1-1	Balu 184	Balu
5	<b>08-1003-1</b>	PopC54-CI03C54-B-2-2-1-1	Balu 761	Balu	50	<b>09-6930</b>	PopC56-CI03C56-B-6-1-2-1-1-1	Balu 184	Balu
6	<b>08-1014-1</b>	PopC55-CI03C55-B-6-2-2-1	Balu 551	Balu	51	<b>09-6931</b>	PopC5-(Desconhecido)-B-1-2-B	P 30F88	Pionner
7	<b>08-1026-1</b>	PopC56-(CI00-517-1-2-3)-B-1-1-2-2-1-1	Balu 184	Balu	52	<b>09-6932</b>	PopUFV8-CI??-FMI004-B-1-1-B	P 3041	Pionner
8	<b>08-1129-1</b>	PopC46-CI?C46-B-8-9-1-3-1-1	Forte	Syngenta	53	<b>09-6933</b>	PopC4-CI?C4-B-1-1	Z8480	Zeneca
9	<b>08-1153-2</b>	PopC35- (Desconhecido)-CF07-794-B	AG8080	Monsanto	54	<b>09-6934</b>	PopC7-CI?C7-B-5-1-1	CO 32	Dow
10	<b>08-1182-2</b>	PopC43-(Desconhecido)-CF07-845-B	P30P70	Pionner	55	<b>09-6935</b>	PopC9-CI?C9-B-3-1-2	DKB350	Dekalb
11	<b>08-1202-2</b>	PopC37-(Desconhecido)-CF07-875-B	P30F87	Pionner	56	<b>09-6936</b>	PopC15-(CI00-396-1-2-3-4)-B-3-1-1-3-1-6-1-2	P 3041	Pionner
12	<b>08-1217</b>	PopC75-(Desconhecido)-CF07-891-B	Valente	Syngenta	57	<b>09-6937</b>	PopC33-(CI00-361-1-2-3)-B-1-1-2-10-1-1-1-1	DKB435	Monsanto
13	<b>08-1309-1</b>	PopC4-(Desconhecido)-CF07-083-B	Z8420	Dow	58	<b>09-6938</b>	PopC34-CI02C34-B-10-1-1-2-1-1-2	Z8447	Zeneca
14	<b>08-1378-2</b>	PopC7-CI?C7-B-9-3-1-5-1	CO 32	Dow	59	<b>09-6939</b>	PopC46-CI02C46-B-8-9-1-3-1-1-2	Forte	Syngenta
15	<b>08-1408-1</b>	PopC35-CI?C35-B-8-8-2-2-1	AG 8080	Monsanto	60	<b>09-6940</b>	PopC74-CI02C74-B-20-5-1-3-1-1-2	XB 8028	Semeali
16	<b>08-1429-2</b>	PopC16-(CI00-311-1-1-2-3)-B-1-1-1-5-1-1-1	BR106	Embrapa	61	<b>09-4580-3</b>	PopC1-CI02C1-B-2-7-1	DKB C901	Cargill
17	<b>08-1468-1</b>	PopC15C?C15-B-22-2-2-1-1	P 3041	Pionner	62	<b>09-4589</b>	PopC3-CI02C3-B-4-3-1	AG 9010	Agrocerec
18	<b>08-1696-2</b>	PopC55-CI03C55-B-8-1-1-2-1	Balu 551	Balu	63	<b>09-4593-2</b>	PopC3-CI02C3-B-7-6-1	AG 9010	Agrocerec
19	<b>08-1714</b>	PopC56-CI03C56-B-26-1-1-2-1	Balu 184	Balu	64	<b>09-4594-3</b>	PopC5-CI02C5-B-12-6-1	P 30F88	Pionner
20	<b>08-1718-1</b>	PopC56-CI03C56-B-8-1-2-2-1	Balu 184	Balu	65	<b>09-4596-1</b>	PopC7-CI02C7-B-1-1-1	CO 32	Dow
21	<b>08-1801</b>	PopC54-CI03C54-B-4-1-5-1-1	Balu 761	Balu	66	<b>09-4597-1</b>	PopC7-CI02C7-B-6-3-1	CO 32	Dow
22	<b>08-1803-1</b>	PopC3-CI03-C3-B-5-1-1-1-1	AG 9010	Agrocerec	67	<b>09-4602</b>	PopC8-CI02C8-B-15-1-1	Z8420	Dow
23	<b>08-1806</b>	PopC15-CI03C15-B-7-1-2-2-1	P3041	Pionner	68	<b>09-4605</b>	PopC8-CI02C8-B-10-6-1	Z8420	Dow
24	<b>08-1807-2</b>	PopC46-CI03C46-B-11-1-2-1-1	Forte	Syngenta	69	<b>09-4610-1</b>	PopL4-(Desconhecido)-B-CF05-4094-B	-	-
25	<b>08-1812-1</b>	PopC43-CI03C43-B-1-1-3-2-1	P30 P70	Pionner	70	<b>09-4612-2</b>	PopC32-CI02C32-B-15-5-1	BR201	Embrapa
26	<b>08-1816</b>	PopC74-CI03-C74-B-1-1-2-1-1	XB 8028	Semeali	71	<b>09-4621-1</b>	PopC32-(CI00-396-1-2-3-4)-B-3-1-1-2-2-1	BR201	Embrapa
27	<b>08-1828-1</b>	PopC5-(Desconhecido)-CF07-791-B	P 30F88	Pionner	72	<b>09-4626-2</b>	PopC100-(CI00-361-1-2-3)-B-1-1-2-1-1-1	AL 30	Cati
28	<b>08-1870-1</b>	PopC74-(Desconhecido)-CF07-865-B	XB 8028	Semeali	73	<b>09-4627-1</b>	PopC100-(CI00-361-1-2-3)-B-1-1-2-1-3-1	AL 30	Cati
29	<b>08-1876-1</b>	PopC37-(Desconhecido)-CF07-875-B	P30F87	Pionner	74	<b>09-4629-1</b>	PopC100-(CI00-361-1-2-3)-B-1-1-2-2-3-1	AL 30	Cati
30	<b>08-1879-2</b>	PopC78-(Desconhecido)-CF07-878--B	Pointer	Syngenta	75	<b>09-4634-1</b>	PopC100-(CI00-311-1-2-3)-B-1-1-1-5-1-1	AL 30	Cati
31	<b>09-6941</b>	PopC36-CI?C36-B-7-1-2-2-2-1-2	AG7575	Monsanto	76	<b>09-4635-1</b>	PopC86-CI99C-B-1-1-1-2-2-B(-2-2)-1	BRCMS50	Embrapa
32	<b>09-6942</b>	PopC37-CI?C35-B-2-4-1-2-2-1-2	P30F87	Pionner	77	<b>09-4640-1</b>	PopC86=CI99C-B-1-1-1-2-10-1-1	BRCMS50	Embrapa
33	<b>09-6943</b>	PopC1-(Desconhecido)-B-1-1	DKB C901	Cargill	78	<b>09-4642-1</b>	PopC86-C99D-B-1-1-1-1-4-1-1	BRCMS50	Embrapa
34	<b>09-6944</b>	PopC9-C?C9-B-3-1-2	DKB350	Dekalb	79	<b>09-4646-1</b>	PopC87-CI99D-B-1-1-1-1-7-1-1	BRCMS28	Embrapa
35	<b>09-6945</b>	PopC16-(CI00-443-1-2-3-4-5)-B-4-1-1-7-1-1-1-1-1	BR106	Embrapa	80	<b>09-4649-1</b>	PopC87-CI99D-B-1-1-1-1-9-2-1	BRCMS28	Embrapa
36	<b>09-6946</b>	PopC34-CI?C34-B-13-1-1-1-1-1	Z8447	Zeneca	81	<b>09-4660-1</b>	PopC81-(CI00-517-1-2-3)-B-1-1-1-2-1	BRCMS28	Embrapa
37	<b>09-6947</b>	PopC74-CI03C74-B-1-1-2-1-1-3	XB 8028	Semeali	82	<b>09-4669-4</b>	PopC4-CI02C4-B-5-4-1-1	Z8480	Zeneca
38	<b>09-6948</b>	PopC53-CI03C53-B-1-1-1-2-1-2	Garra	Syngenta	83	<b>09-4670-1</b>	PopC4-CI02C4-B-6-1-1-1	Z8480	Zeneca
39	<b>09-6949</b>	PopC39-CI?C39-B-1-1-1-1-9-3-1-1-4	Speed	Syngenta	84	<b>09-4672-4</b>	PopC4-CI02C4-B-1-2-1-1	Z8480	Zeneca
40	<b>09-6950</b>	Pop?CI??-B-1-1-1-1-10-1-1-1-4	-	-	85	<b>09-4673-2</b>	PopC5-CI02C5-B-2-2-1-1	P 30F88	Pionner
41	<b>09-6921</b>	PopC35-CI?C35-B-1-3-1-1-1-1	AG 8080	Agrocerec	86	<b>09-4678-2</b>	PopC5-CI02C5-B-12-7-2-1	P 30F88	Pionner
42	<b>09-6922</b>	PopC15-(CI00-233-1-2-3)-B-1-1-1-10-1-1-1-2	P 3041	Pionner	87	<b>09-4679-1</b>	PopC6-CI02C6-B-1-4-2-1	DKB C333	Cargill
43	<b>09-6923</b>	PopP195-CI?C195-B-2-3-1-3-1-3	34M11	Agromen	88	<b>09-4680-3</b>	PopC6-CI02C6-B-2-9-1-1	DKB C333	Cargill
44	<b>09-6924</b>	PopC38-CI02C38-B-7-1-1-2-1-1-3	P30A00	Pionner	89	<b>09-4682-1</b>	PopC6-CI02C6-B-2-2-1-1	DKB C333	Cargill
45	<b>09-6925</b>	PopC42-CI03C42-B-7-1-2-2-1-1	Pointer	Syngenta	90	<b>09-4683-1</b>	PopC6-CI02C6-B-8-6-1-1	DKB C333	Cargill

<sup>a</sup> Abreviaturas usadas no pedigree: **Pop** = população; **CI** = código inicial (ano e pop); **FMI** = família de meios irmãos; **B** = autofecundação; **-1,-2,-3...**= avanço de geração da espiga; **CF** = código final; ? = informação desconhecida. <sup>b</sup> Selecionadas a partir de híbridos comerciais; <sup>c</sup> Empresa detentoras dos materiais comerciais: Dow = Dow AgroSciences

Após o período em banho-maria, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos até esfriarem. Dando-se início a primeira etapa de extração de DNA, onde imediatamente foi adicionado 400 µL de solução composta por clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e estas misturadas por inversão por 10 minutos. Em seguida, realizou-se a primeira centrifugação a 10000 rpm, por 10 minutos, objetivando separar as fases orgânicas e aquosas, e posteriormente feita a retirada do sobrenadante (aproximadamente 650 µL), transferindo-o para um novo tubo. Esta etapa foi repetida novamente, contudo, foi transferido aproximadamente (500 µL) de sobrenadante para um novo tubo, ao qual se adicionou três vezes o volume da solução etanol 95%:acetato de amônio 7,5 M (6:1) gelado, suavemente invertidos e colocado no freezer (-20 °C) por aproximadamente 2 hora para precipitar o DNA.

Precipitado o DNA, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos, possibilitando a obtenção do “pellet” de DNA e o descarte do sobrenadante. No tubo contendo o pellet foi adicionado 50 µL de TE 0,1x com RNase (1 µL de 10mg/ml da solução de RNase por mL de TE 0,1X) e incubado em banho a 65° C por 10 minutos para digestão com RNA. Posteriormente, adicionou-se três vezes o volume de etanol 95%:acetato de sódio (3M) (20:1), o qual, foi deixado no freezer (-20 °C) por 1 hora. Após este, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos, obtendo-se novamente o pellet o qual foi lavado com 300 µL de etanol 70%, seco por aproximadamente 40 minutos em temperatura ambiente e ressuspenso em 70 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0), denominado “DNA estoque”, este foi armazenado a -20 °C.

Concluído o processo de extração, a quantificação e o nível de pureza do DNA foram determinados pelo valor da absorbância de (260 nm) e a razão de (260/280 nm), respectivamente, medidas em espectrofotômetro digital (GENESYS™ 10 Series – Thermo Scientific). A integridade das moléculas de DNA foi avaliada por eletroforese (~100V) em gel de agarose 0,8% utilizando solução tampão TAE 1x (Tris-base 0,04 M; ácido acético glacial 0,114%; EDTA 1 mM, pH 8,0) corado com brometo de etídio e visualizado e fotografado em ultravioleta utilizando fotodocumentador L-PIX ST. Para obter o “DNA de trabalho” todas as linhagens tiveram suas concentrações padronizadas em 10 ng.µL<sup>-1</sup>, através de diluições em tampão TE.

## Seleção de primer sequências simple repetidas

Os primers SSR utilizados neste estudo foram obtidos e escolhidos com base em unidades de repetição e locais no “Bin” para fornecer uma cobertura uniforme de todo o genoma do milho. As seqüências (Forward e Reverse) dos 358 marcadores microssatélites foram obtidas por meio do Banco de Dados de Genética e Genômica do Milho - MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>) e estes analisados em duas linhagens contrastantes de milho, onde 96 primers SSR foram selecionados com base em seu conteúdo informativo de polimorfismo, amplificação de forma consistente em PCR e localização nos cromossomos (pelo menos 9 primers SSRs por cromossomo) . Estes foram genotipados nas 90 linhagens, e com base na facilidade de avaliação das bandas, um conjunto final de 81 primers SSR polimórficos foi utilizado nas análises estatísticas, apenas o primer (umc2139) foi monomórfico, e os outros 14 primers foram excluídos devido à dificuldade de caracterizar com precisão os alelos.

Os 81 locos SSR, assim como todos os outros marcadores, foram escolhido com base em estudos anteriores (XU et al., 2004; Wassom et al., 2008; Ji-Hua et al., 2007; Coque e Gallais, 2006; Zhu et al., 2006; Mano et al., 2007; Li et al., 2008; Danson et al., 2006; Wisser et al., 2008; Brunelli et al., 2002; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2008) sendo que grande parte destes locos são QTL ligados a eficiência do uso de nitrogênio (EUN) e fósforo (EUP); produção, peso e número de grãos; formação e número de raízes; teor de amido e proteína e outras características de interesse agrônômico, conforme apresentado na Figura 1.

Os microssatélites foram sintetizados em escala inicial de 25 nmol pela a empresa norte-americana especializada em oligonucleotídeos (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES - IDT-USA) distribuídos exclusivamente pela (PRODIMOL BIOTECNOLOGIA S.A.). Todos os primers SSR foram diluídos primeiramente para uma concentração final de 100 µM (Primers Estoque) e a partir destes, diluídos para uma concentração final de 2 µM (Primers de Trabalho).

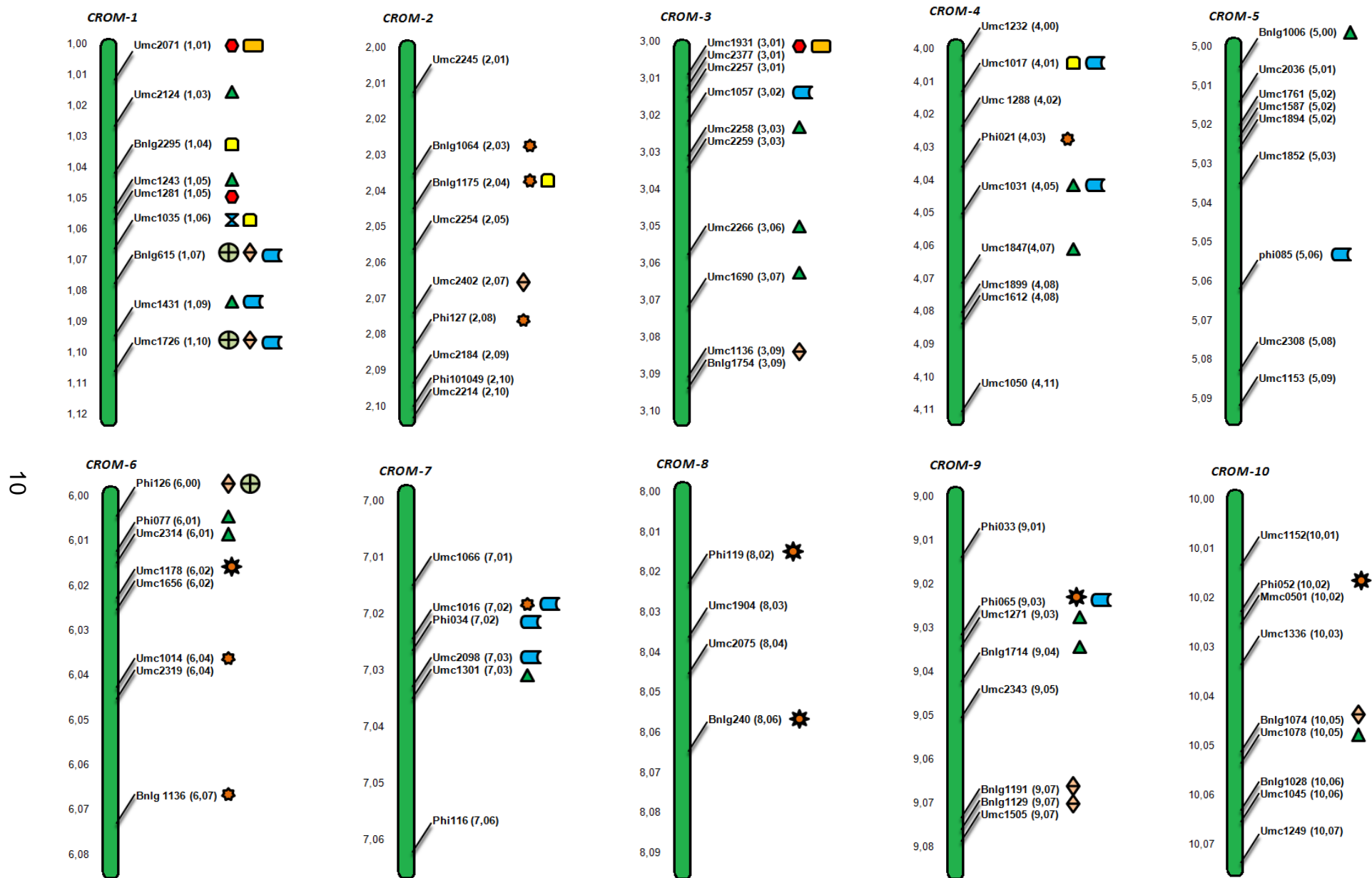


Figura 1. Distribuição dos 81 locos SSRs nos 10 cromossomos do milho, e informações de alguns locos ligados a QTL para características agrônômicas: Teor de amido [Yellow square] e proteína [Red circle]; Eficiência de fósforo [Green triangle with plus] e nitrogênio [Green triangle]; Produção [Green star], peso [Yellow square] e número [Blue square] de grãos; Formação e/ou numero de raiz [Green diamond]; Resistência a doenças [Green star]; Enzimas [Blue square] (Glutamina Sintetase, Cytochrome P450, metabolismo de N e outros).

## Amplificação de fragmentos microssátelites e gel de eletroforese

Para as amplificações em PCR (polymerase chain reaction) utilizou-se microtubos de 1,5 mL para o preparo do “mix” da reação, constituído por 30 ng de DNA genômico, tampão de reação 1x (20 mM de Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl - Invitrogen), 0,1 mM de cada dNTPs (Invitrogen), 0,1  $\mu$ M de cada primer (Forward e Reverse), 1 mM de  $MgCl_2$  (Invitrogen), 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e completado com água Milli-Q autoclavada para um volume final de 20  $\mu$ L.

Os ciclos do programa de PCR foram ajustados conforme indicado pelo site MaizeGDB, com modificações na temperatura de anelamento (elevação em 1 ° C), visando aumentar a exstringência das reações (para eliminação de bandas inespecíficas), e conseqüentemente, qualidade dos resultados (bandas específicas). As amplificações de PCR para análises de microssatélites foram realizadas em microplacas de 96 poços (PCR-96-MB-C - 0,2 mL – Axygen Scientific), utilizando o termociclador PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA) seguindo o método “touchdown” de otimização, composto por: uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, e uma primeira etapa constituída de 10 ciclos a 94 °C por 1 minuto; 66 °C por 1 minuto (redução de 1 °C por ciclo), e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos; e uma segunda etapa de 30 ciclos, iniciada por uma desnaturação de 94 °C por 1 minuto; anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Por fim, realizou-se uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Aos produtos da reação de PCR foram adicionados 6,0  $\mu$ L de tampão de corrida (*loading buffer*) composto por (formamida 98%; EDTA 10 mM, pH 8,0; xylene cyanol 1 mg/mL e bromophenol blue 1 mg/mL ) e em seguida desnaturadas em termociclador PTC-200 a 95 °C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação de SSR foram separados em gel de poliacrilamida [acrilamida/bis –acrilamida (19:1) 6,0% (Bio-Rad); 7,5M de uréia; TBE 5,0X], utilizando-se o sistema eletroforético “Sequi-Gen GT” (Bio-Rad) em solução tampão TBE 1x (Tris-base 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e 2 mM EDTA, pH 8,0).

As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas, empregando etanol 70% (procedimento repetido por três vezes). Na placa maior, onde o gel deve ser aderido, foi aplicado 1,1 mL de solução contendo

95% de etanol absoluto, 0,5% de ácido acético e 2,2 µL de *Bind silane* (Sigma). Esta solução foi aplicada na superfície da placa e deixada secar por 10 minutos, após este tempo, o excesso foi retirado com etanol absoluto 70%. A placa menor foi cuidadosamente limpa utilizando o mesmo procedimento anterior descrito, contudo, nesta foi aplicado Sigmacote (Sigma), substância hidrofóbica que tem como objetivo evitar que o gel venha a se aderir nesta placa na etapa de desmontagem, logo após a eletroforese. Após dez minutos de secagem, o excesso foi retirado com etanol absoluto 70%.

No preparo do gel foram empregados 70 mL da solução estoque de bis-acrilamida 6%, 40 µL de TEMED (Sigma) e 250 µL de persulfato de amônio 10%, polimerizado por duas horas. Anterior a aplicação das amostras, procedeu-se uma pré-corrída de 40 minutos a 90 Watts. Antes e após a pré-corrída a canaleta foi limpa com o auxílio de uma seringa, onde posteriormente, ajustou-se o pente (Dente de tubarão - 49 canaletas – Bio-Rad) de forma que apenas a ponta do dente estivesse aderida ao gel. Em seguida, as amostras foram aplicadas nos poços, e estas submetidas à eletroforese sob voltagem constante de 50 Watts e temperatura de 50 ° C de 1 - 3 horas dependendo do tamanho do fragmento amplificado.

Para a coloração do gel, empregou-se o método de coloração com nitrato de prata (Brito et al., 2010), modificado. Após a eletroforese, a placa contendo o gel foi imersa em solução fixadora (etanol absoluto 1% e ácido acético 1%, mantido sob agitação lenta por 10 minutos. Subseqüentemente, o gel foi lavado com 2L de água destilada sob agitação por 1 minuto. O pré-tratamento foi realizado pela imersão do gel em solução contendo ácido nítrico 1% por 3 minutos. Efetuou-se mais uma lavagem utilizando 2L de água destilada por 1 minutos, sob agitação. O gel foi corado com solução de AgNO<sub>3</sub> ( 0,2%) por 20 minutos, e em seguida efetuou-se duas lavagens de 30 segundos cada com água destilada, sob agitação. Posteriormente, preparou-se 2L de solução reveladora, onde o gel foi imerso em 800 mL desta solução composta por Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,5%) e formaldeído (0,01%), mantido sob agitação até que as primeiras bandas pudessem ser visualizadas. Esta solução foi descartada, e adicionada ao processo o restante da solução reveladora (1200 mL). O gel foi corado até apresentar padrão de coloração aceitável.

Após a imersão do gel em 2L de solução bloqueadora (ácido acético) por 5 minutos, sob lenta agitação, finalmente, procedeu-se a lavagem do gel

em 2L de água destilada por 1 minuto. O gel corado foi mantido na posição vertical em local arejado para a secagem e posterior análise dos fragmentos de DNA amplificados.

## **Análise dos dados**

### **Codificação dos alelos**

Diferentemente da codificação binária (presença 1 e ausência 0 do alelo), respeitou-se o multialelismo característico deste tipo de marcador, e desta forma, a descrição genotípica de cada indivíduo foi determinada por códigos numéricos informativos, em função do número de alelos por cada loco (Cruz, 2008).

Para cada um dos alelos verificados, este foi numerado conforme o tamanho do fragmento amplificado, ou seja, para cada loco SSR a banda ou alelo (A) de maior fragmento, correspondeu ao alelo  $A_1$ , o segundo maior fragmento codificou-se como alelo  $A_2$ , e assim por diante, até que todos os alelos identificados para um determinado loco SSR estivessem devidamente codificados, obtendo-se ao final n-alelo ou  $A_n$ .

A partir das informações de cada loco nos diferentes acessos analisados no gel de poliacrilamida, construiu-se o arquivo de dados (Planilha 1) de dimensão  $g \times L$ , contendo  $L$  colunas, para descrição dos valores assumidos pelos marcadores moleculares genotipados nos  $g$  indivíduos (Cruz, 2008). Para exemplificar, na existência de três alelos  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$  em um loco qualquer, os genótipos homocigotos foram descritos por 11, 22, 33. Porém, esta situação é válida somente se, o número de alelos for (igual ou inferior a 9), sendo assim, a caracterização dos alelos é codificada por dois dígitos (Planilha 2). Contudo, a exemplo do que ocorreu neste experimento, o aparecimento de mais de 9 alelos em um dos locos, torna-se obrigatório a descrição genotípica em quatro dígitos (Planilha 3), ver exemplo a seguir:

Exemplo de arquivo de dados é apresentado a seguir:

	M1	M2	M3	L
1	A1	A2	A5	...
2	A2	A3	A7	...
3	A3	A1	A2	...
...	...	...	...	...
g	A3	A5	A11	...

**(Planilha 1)**

	M1	M2	M3	L
1	11	22	55	...
2	22	33	77	...
3	33	11	22	...
...	...	...	...	...
g	33	55	1111	...

**(Planilha 2)**

	M1	M2	M3	L
1	01.01	02.02	05.05	...
2	02.02	03.03	07.07	...
3	03.03	01.01	02.02	...
...	...	...	...	...
g	03.03	05.05	11.11	...

**(Planilha 3)**

O valor (0) foi utilizado para designar a falta de informação (dado perdido) a respeito do genótipo do indivíduo. É importante ressaltar que as informações descritas acima, foram tomadas para que às análises pudessem ser realizadas por meio do software GENES versão 2010 (Cruz, 2010).

### Dissimilaridade genética e análise de agrupamento

As estimativas das distâncias de dissimilaridade e similaridade genéticas, o número de alelos por loco e a geração da matriz de dissimilaridade foram obtidas a partir do arquivo de dados com as informações moleculares. A similaridade genética entre todos os pares de linhagens (ii') foram calculadas pelo índice ponderado, e para o cálculo da medida de dissimilaridade ( $D_{ii'}$ ) utilizou-se o complemento aritmético ( $D_{ii'} = 1 - S_{ii'}$ ) do índice de similaridade ( $S_{ii'}$ ), em que:

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

No qual,

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

$a_j$ : número total de alelos do loco  $j$

$A$ : número total de alelos estudados

$$\text{Sendo } \sum_{j=1}^L p_j = 1$$

$c_j$ : número de alelos comuns entre os pares de acessos  $i$  e  $i'$  para o loco  $j$

$L$ : número total de locos

A partir dos dados da matriz de dissimilaridade genética, foram realizadas as análises de agrupamentos pelo método de otimização de Tocher, e o dendograma foi construído pelo método de UPGMA (unweighted pair-group method averages). Foi calculado o valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de distâncias genéticas e a matriz dos valores cofenéticos, a fim de verificar a consistência do agrupamento.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada *primer*, foi calculado por meio da expressão:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1}^a \sum_{i \neq j} p_i^2 p_j^2$$

em que  $p_{ij}$  : freqüência do  $j$ -ésimo alelo no  $i$ -ésimo loco microssatélite e  $a$  é o número de alelos por loco.

### Avaliação de *bootstrap* dos locos SSR

Com o propósito de verificar se a diversidade genética nas linhagens de milho foi bem representada, realizou-se o método de *bootstrap* ou reamostragem, que tem como finalidade, identificar um número mínimo ótimo de marcadores capaz de representar tão bem a diversidade dos acessos quanto aquele originalmente utilizado (Cruz, 2008).

O processo de simulação dos dados consistiu em determinar um número inicial de marcadores ( $n_i = 20$ ) com incremento de ( $\Delta=3$ ) e número de amostras por simulação ( $r = 20$ ). As re-amostragens de diferentes tamanhos (20, 23, 26, ..., 74, 77, 80 locos de SSR) foram estimadas, realizando-se 1220 análises de dados. O programa obtém estimativas de correlação de valores da matriz de distância original com os de outras matrizes de distância, obtidas considerando-se diferentes números de locos SSR. Além disso, o programa ainda disponibiliza dois outros parâmetros: a soma dos quadrados dos desvios em relação às re-amostragens e um valor de estresse (E) que é indicativo de ajuste entre a matriz original, considerando todos os SSR e a matriz amostral.

## Análise Discriminante

Análises discriminantes, baseadas no método do vizinho médio, foram aplicadas considerando o seguinte critério de classificação *a priori*: empresas detentoras dos híbridos e/ou variedades comerciais das quais foram selecionadas as linhagens. O método do vizinho médio é baseado na alocação de um indivíduo em um população de acordo com a classe de seus vizinhos mais próximos, seguindo critérios específicos (algoritmos). Supondo que  $n_i$  seja o número de indivíduos da  $i$ -ésima população estudada, a dissimilaridade média de um indivíduo a cada população será:

$$\bar{D}_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} d_{kj}}{n_i}$$

Onde,

$d_{ij}$ : medida de dissimilaridade do indivíduo  $k$ , a ser classificado, em relação ao  $j$ -ésimo indivíduo da  $i$ -ésima população.

A classificação *a priori* das linhagens estudados, de acordo com o critério baseado em empresas detentoras dos híbridos e/ou variedades comerciais e pelo desempenho da linhagem em cruzamentos testcrosses, foi assim estabelecido:

- |                            |                                   |
|----------------------------|-----------------------------------|
| a) Balu - 10 linhagens     | h) Dekalb – 2 linhagens           |
| b) Pionner – 16 linhagens  | i) Dow AgroSciences – 7 linhagens |
| c) Semeali – 4 linhagens   | j) Embrapa – 10 linhagens         |
| d) Agroceres – 4 linhagens | k) Monsanto – 4 linhagens         |
| e) Agromen – 2 linhagens   | l) Nidera – 2 linhagens           |
| f) Cargill – 6 linhagens   | m) Syngenta – 11 linhagens        |
| g) Cati – 4 linhagens      | n) Zeneca – 6 linhagens           |

As duas linhagens restantes foram alocadas *a posteriori*, por não atenderem aos critérios de inclusão nas populações pré-definidas.

## RESULTADOS

### Polimorfismo e análise de *bootstrap* dos marcadores SSR

Foram identificados o total de 471 alelos e a média de 5,81 alelos por locos foi alcançado nas 90 linhagens de milho. O número de alelos por locos SSR variou de 2 a 17, sendo que, os *primers* (umc2377, umc1057, umc1288, umc1847, umc2036, umc2098, umc2075, umc1505) revelaram o número mínimo de dois alelos, enquanto que, o número máximo de alelos foi detectado no *primer* umc1035 (Tabela 2). Dentro do grupo de 90 linhagens, 79,19% dos 471 alelos ocorreram na frequência de 0,25 ou menos, indicando a alta diversidade alélica. Apenas 2,76% dos alelos ocorreram na frequência de 0,75 ou mais.

Quanto ao tipo de repetição, os di- e tri-nucleotídeo foram os mais abundantes, representando respectivamente, 38% e 32% das classes de microssatélites utilizadas neste trabalho, sendo que, o tipo de repetição composta pela seqüência AG correspondeu a 51% dos di-nucleotídeos. Os outros 30% dos tipos de repetição de marcadores SSR utilizados correspondem aos tetras, penta, hexa e octa-nucleotídeos. Os valores de PIC considerando todos os marcadores variaram de 0,1304 (umc2314) a 0,8711 (umc1035) com uma média de 0,5733. Sendo o valor máximo observado para o PIC pertencente ao loco SSR com tipo de repetição di-nucleotideo (Tabela 2).

Os resultados das análises de *bootstrap* estão apresentados na Figura 2. Pela a análise de *bootstrap*, verificou-se que, o uso de 68 *primers* SSR seria o número mínimo suficiente para o estudo da diversidade genética das 90 linhagens de milho, no qual a estimativa das distâncias genéticas gráficas apresentou alta correlação com as distâncias disponíveis na matriz original. A correlação observada foi de 0,94, com valor de estresse (E) de 0,045 e soma dos quadrados dos desvios (SQD) de 0,91. Segundo Kruskal (1964), o valor de estresse menor que 0,05 é indicativo de excelente precisão. Barbosa et al. (2003), ao genotiparem 18 linhagens de milho, determinaram que 29 dos 68 marcadores SSR seriam necessários para uma precisa estimativa da distância genética entre as linhagens. Laborda et al. (2005), relataram que 20 dos 50

locos SSR permitiriam a precisa análise das distâncias genéticas entre as 85 linhagens de milho. Os estudos realizados por Amorim et al. (2006) concluíram que a precisa estimativa das distâncias genéticas entre as 48 linhagens S<sub>1</sub>, poderia ser alcançada utilizando apenas 25 dos 47 locos SSR utilizados.

Neste estudo, as distâncias genéticas entre as 90 linhagens estimadas por 81 locos SSR permitiram concluir que a genotipagem confiável foi alcançada, principalmente porque os locos foram escolhidos de forma a conseguir a cobertura física representativa de todo o genoma (Tabela 2 e Figura 1).

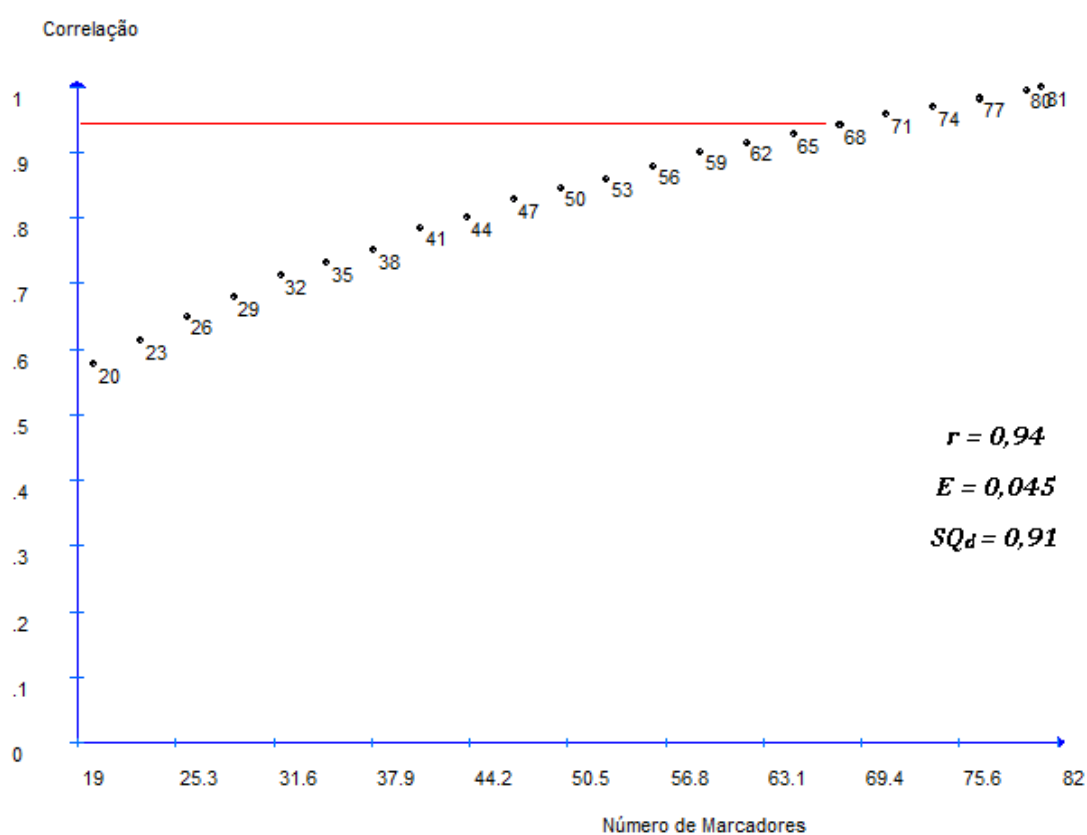


Figura 2. Determinação do número mínimo ótimo de marcadores por meio da análise de *bootstrap* considerando valores de correlação entre matrizes de diversidade genética.

**Tabela 2.** Informação dos Locos SSR utilizados neste estudo, incluindo nome, número do bin, tipo de repetição e valor do PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) calculado nas 90 linhagens de milho.

Locos SSR	Nº do Bin <sup>a</sup>	Tipo de Repetição	Nº de alelos	Valor do PIC	Locos SSR	Nº do Bin <sup>a</sup>	Tipo de Repetição	Nº de alelos	Valor do PIC
umc2071	1,01	(ATGT) <sub>5</sub>	6	0.4517	umc1852	5,03	(TC) <sub>8</sub>	7	0.7426
umc2124	1,03	(TA) <sub>6</sub>	9	0.6203	phi085	5,06	AACGC	6	0.6288
bnlg2295	1,04	(AG) <sub>30</sub>	6	0.6737	umc2308	5,08	(CGGCG) <sub>4</sub>	5	0.5853
umc1243	1,05	(CAT) <sub>4</sub>	3	0.3894	umc1153	5,09	(TCA) <sub>4</sub>	7	0.7706
umc1281	1,05	(CAA) <sub>6</sub>	6	0.7466	phi126	6,00	AG	12	0.8276
umc1035	1,06	(CT) <sub>19</sub>	17	0.8711	phi077	6,01	AG	10	0.8660
bnlg615	1,07	-	6	0.7609	umc2314	6,01	(GT) <sub>6</sub>	5	0.1304
umc1431	1,09	(GCA) <sub>5</sub>	3	0.3298	umc1178	6,02	(GGC) <sub>6</sub>	6	0.6945
umc1726	1,10	(TG) <sub>6</sub>	3	0.4502	umc1656	6,02	(CGGT) <sub>7</sub>	6	0.6576
umc2245	2,01	(CAA) <sub>7</sub>	4	0.6637	umc1014	6,04	(GA) <sub>12</sub>	7	0.5616
bnlg1064	2,03	(AG) <sub>16</sub>	6	0.7074	umc2319	6,04	(GAGGAG) <sub>5</sub>	5	0.7190
bnlg1175	2,04	(AG) <sub>38</sub>	10	0.8313	bnlg1136	6,07	AG <sub>(14)</sub>	7	0.5824
umc2254	2,05	(AGAG) <sub>4</sub>	6	0.6786	umc1066	7,01	(GCCAGA) <sub>5</sub>	3	0.2678
umc2402	2,07	(CAT) <sub>4</sub>	6	0.5515	umc1016	7,02	(CT) <sub>25</sub>	8	0.7358
phi127	2,08	AGAC	5	0.3667	phi034	7,02	CCT	6	0.7700
umc2184	2,09	(GCG) <sub>5</sub>	5	0.4138	umc2098	7,03	(CAG) <sub>5</sub>	2	0.1668
phi101049	2,10	AGAT	12	0.7537	umc1301	7,03	(GCA) <sub>5</sub>	3	0.1456
umc2214	2,10	(CTT) <sub>4</sub>	5	0.4687	phi116	7,06	ACTG/ACG***	6	0.6557
umc1931	3,01	(AC) <sub>8</sub>	6	0.6442	phi119	8,02	AG	5	0.5870
umc2377	3,01	(GAC) <sub>4</sub>	2	0.2743	umc1904	8,03	(TAAGC) <sub>5</sub>	5	0.3768
umc2257	3,01	(CTCCT) <sub>4</sub>	5	0.7304	umc2075	8,04	(AGCCAG) <sub>4</sub>	2	0.3672
umc1057	3,02	(CGG) <sub>6</sub>	2	0.2061	bnlg240	8,06	-	7	0.7493
umc2258	3,03	(GTG) <sub>5</sub>	5	0.6624	phi033	9,01	AAG	4	0.4974
umc2259	3,03	(CCG) <sub>6</sub>	4	0.4305	phi065	9,03	CACTT	4	0.4492
umc2266	3,06	(AAGGAG) <sub>4</sub>	4	0.4779	umc1271	9,03	(CGG) <sub>4</sub>	4	0.4077
umc1690	3,07	(GCA) <sub>4</sub>	3	0.5791	bnlg1714	9,04	AG <sub>(25)</sub>	5	0.3045
umc1136	3,09	(GCA) <sub>5</sub>	7	0.5542	umc2343	9,05	(TGTGTGTG) <sub>4</sub>	10	0.8489
bnlg1754	3,09	AG <sub>(20)</sub>	11	0.8664	bnlg1191	9,07	AG <sub>(39)</sub>	11	0.8030
umc1232	4,00	(ACAG) <sub>4</sub>	3	0.5295	bnlg1129	9,07	AG <sub>(12)</sub>	5	0.6656
umc1017	4,01	(CT) <sub>9</sub> (CA) <sub>8</sub>	7	0.8005	umc1505	9,07	(AAAAAC) <sub>4</sub>	2	0.3290
umc1288	4,02	(TCCA) <sub>4</sub>	2	0.3688	umc1152	10,01	(ATAG) <sub>6</sub>	7	0.7870
phi021	4,03	AG	3	0.5108	phi052	10,02	AAG	3	0.1442
umc1031	4,05	(CT) <sub>6</sub> AT(CT) <sub>9</sub>	16	0.8679	mmc0501	10,02	(GA) <sub>36</sub>	8	0.7795
umc1847	4,07	(CGC) <sub>6</sub>	2	0.2794	umc1336	10,03	(ACCAG) <sub>4</sub>	4	0.6183
umc1899	4,08	(AG) <sub>8</sub>	4	0.5890	bnlg1074	10,05	AG <sub>(14)</sub>	6	0.5194
umc1612	4,08	(GAGT) <sub>6</sub>	4	0.4317	umc1078	10,05	(GT) <sub>13</sub>	9	0.7950
umc1050	4,11	(AAT) <sub>6</sub>	7	0.6645	bnlg1028	10,06	AG <sub>(12)</sub>	6	0.7481
bnlg1006	5,00	AG <sub>(20)</sub>	11	0.8637	umc1045	10,06	GGA <sub>3</sub> GAG <sub>5</sub>	5	0.6548
umc2036	5,01	(GTC) <sub>4</sub>	2	0.2235	umc1249	10,07	(TG) <sub>6</sub>	5	0.6695
umc1761	5,02	(GCA) <sub>5</sub>	4	0.3656	Total			471	
umc1587	5,02	(AT) <sub>8</sub>	6	0.6759	Média			5,81	0,5733
umc1894	5,02	(GA) <sub>8</sub>	5	0.5285					

<sup>a</sup> O nº do Bin indica a localização dos alelos nos grupos de ligação do genoma do milho, podendo ser acessado em (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

## Dissimilaridade genética, análise de agrupamento

Pela a análise estatística descritiva realizada nos valores de distâncias genéticas geradas pelo o complemento aritmético ( $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ ) do índice de similaridade ( $S_{ij}$ ), verificou-se um coeficiente de variação de 10,4%, indicando assim, a boa precisão das estimativas. Os coeficientes de dissimilaridade genética dos 4005 pares de linhagens de milho variaram de 0,19 (linhagem 78 X linhagem 79) a 0,67 (linhagem 5 X linhagem 73) com média de (0,49).

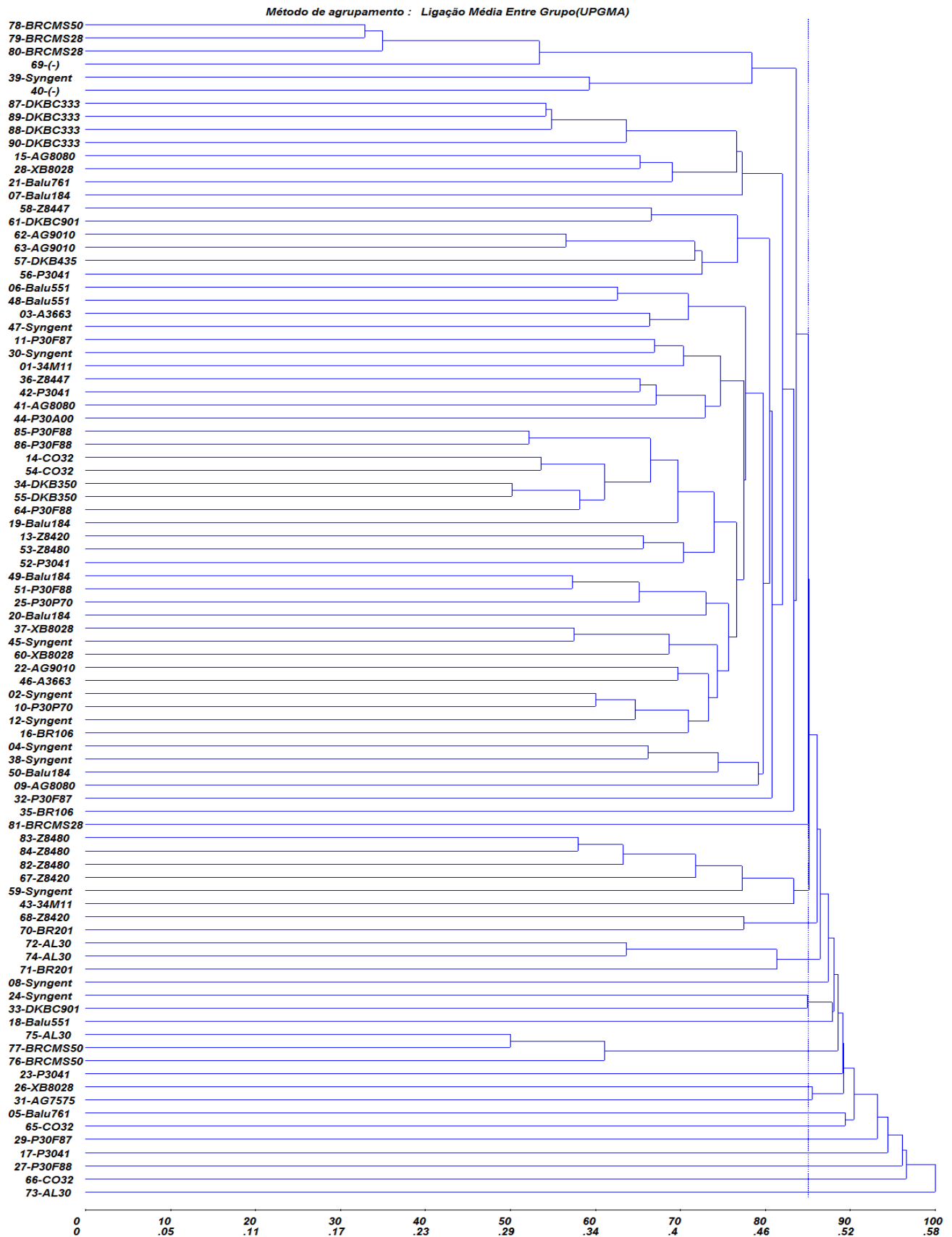
As análises de agrupamentos foram realizadas a partir da matriz de dissimilaridade entre os pares de genótipos, no qual se utilizou o método de otimização de Tocher e o método hierárquico de UPGMA.

Na Tabela 3, encontra-se o agrupamento obtido pelo método de otimização de Tocher. Observa-se a formação de 18 grupos, sendo o primeiro deles subdividido em 29 subgrupos, de forma a facilitar a visualização dos resultados. As linhagens (6, 23, 8, 18, 29, 65, 17, 27, 5, 66, 73) mostraram-se as mais divergentes, constituindo cada uma delas, um grupo isolado (VIII, IX, X, XI, XII, XIII, IXV, XV, XVI, XVII, XVIII) respectivamente.

Quanto aos métodos hierárquicos, verificou-se que a técnica de agrupamento por UPGMA (Figura 3), mostrou bom ajuste para a matriz de dados, conforme indicado pelo valor relativamente elevado do coeficiente de correlação cofenético ( $r = 0,74$ ;  $P < 0,0001$ ). Segundo Bohn et al. (1999) valores do coeficiente de correlação cofenética acima de 0,75 está dentro da faixa aceitável, portanto, os valores apresentados garantem a confiabilidade e a consistência do dendrograma gerado com as estimativas de dissimilaridade genéticas. O dendrograma, resultante do agrupamento UPGMA, apresentou o total de 18 grupos, quando se estabeleceu como ponto de corte o valor (85%) equivalente a média das distâncias (0,49) entre os pares de genótipos. Este resultado é similar àqueles descritos anteriormente pelo método de otimização de Tocher. Além do mais, adotando-se este critério de ponto de corte, pode se constatar que 89% das linhagens de milho presentes no grupo I, foram similares com o grupo/subgrupos (A) formado pelo método de Tocher.

**Tabela 3.** Agrupamento, pelo método de Tocher, de 90 linhagens de milho, com base na dissimilaridade expressa pela distância do complemento aritmético do índice de similaridade ponderado, estimada a partir de 81 locos SSR.

Grupos	Subgrupo	Linhagens	Grupos	Subgrupo	Linhagens
	I – A	78 79 80 69		I – W	50
	I – B	34 55 54 64 14 2 85 86 87		I – Y	75
		12 19 51 47 45 48 42 36		I – Z	61
	I – C	62 63 58 57	<b>I</b>	I – AB	59
	I – D	83 84 67		I – AC	81
	I – E	39 40 46 1		I – AD	70
	I – F	15 28 21 3	<b>II</b>		68 89 90
	I – G	13 53 52 49	<b>III</b>		76 77
	I – H	4 38	<b>IV</b>		71 72
	I – I	11 30 41	<b>V</b>		43 82
	I – J	25 37	<b>VI</b>		24 33
<b>I</b>	I – K	20	<b>VII</b>		26 31
	I – L	22	<b>VIII</b>		6
	I – M	10	<b>IX</b>		23
	I – N	60	<b>X</b>		8
	I – O	16	<b>XI</b>		18
	I – P	9	<b>XII</b>		29
	I – Q	74	<b>XIII</b>		65
	I – R	35	<b>IXV</b>		17
	I – S	7	<b>XV</b>		27
	I – T	56	<b>XVI</b>		5
	I – U	88	<b>XVII</b>		66
	I – V	44	<b>XVIII</b>		73
	I – X	32			



**Figura 3.** Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA, a partir das medidas de dissimilaridades genéticas de 90 linhagens de milho, estimada com base em 81 locos SSR (Número da linhagem - origem).

## Análise Discriminante

Os resultados das análises discriminantes, estimadas pelo vizinho médio são apresentados na Tabela 4. A discriminação das linhagens de acordo com os grupos formados por empresas detentoras dos híbridos comerciais revelou que 100% dos genitores pertencente à população “Dekalb” foram alocadas no próprio grupo. Contudo, observa-se uma tendência das linhagens de outros grupos serem alocadas no grupo “Dekalb”. Dentre os grupos que mais apresentaram genótipos dentro deste grupo destaca-se a “Dow e a Pionner”.

A maioria das linhagens pertencentes aos grupos “Cargill e Cati” foram corretamente alocados nos seus grupos de origem. Por outro lado, o método foi ineficiente para discriminar os grupos Balu, Pionner, Agromen, Dow, Monsanto e Nidera. Para todos os cinco casos citados, nenhuma linhagem foi alocada para seus respectivos grupos. A taxa de erro aparente foi de 77,27%. Este elevado valor é resultante, quase que exclusivamente, da má classificação das linhagens dos grupos citados anteriormente. As duas linhagens classificadas a *posteriori* foram alocadas em dois grupos distintos “Embrapa e Syngenta”.

**Tabela 4.** Análise discriminante de quatorze empresas produtoras de híbridos comerciais, baseada na metodologia de vizinho médio, estimados a partir das medidas de dissimilaridades das 90 linhagens com base em 81 locos SSR.

Grupo de Origem	Nº de Linhagens	Percentual de alocação nos diferentes grupos*													
		Balu	Pionner	Semeali	Agroceres	Agromen	Cargill	Cati	Dekalb	Dow	Embrapa	Monsanto	Nidera	Syngenta	Zeneca
<b>Balu</b>	10	0.00	0.00	0.00	10.00	10.00	0.00	0.00	40.00	0.00	0.00	0.00	40.00	0.00	0.00
<b>Pionner</b>	16	0.00	0.00	0.00	6.25	12.50	0.00	0.00	62.50	0.00	0.00	0.00	12.50	6.25	0.00
<b>Semeali</b>	4	0.00	0.00	<b>50.00</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Agroceres</b>	4	0.00	0.00	0.00	<b>50.00</b>	0.00	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00	0.00	25.00	0.00	0.00
<b>Agromen</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00
<b>Cargill</b>	6	0.00	0.00	0.00	16.67	0.00	<b>66.67</b>	0.00	16.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Cati</b>	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>75.00</b>	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Dekalb</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>100.00</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Dow</b>	7	0.00	0.00	14.29	0.00	0.00	28.57	0.00	57.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Embrapa</b>	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	30.00	20.00	0.00	<b>30.00</b>	0.00	10.00	10.00	0.00
<b>Monsanto</b>	4	0.00	0.00	0.00	25.00	25.00	25.00	0.00	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Nidera</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>Syngenta</b>	11	0.00	0.00	18.18	9.09	18.18	0.00	0.00	27.27	0.00	0.00	0.00	18.18	<b>9.09</b>	0.00
<b>Zeneca</b>	6	0.00	0.00	0.00	16.67	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	<b>50.00</b>
<b>Alocados a Posteriori</b>	2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	50.00	0.00

\*Os valores destacados em negrito referem-se aos percentuais de alocação dos acessos nos seus respectivos grupos de origem.

## DISCUSSÃO

A distância genética entre os genótipos é o principal fator a limitar a identificação de polimorfismo para um determinado loco SSR, e conseqüentemente, influenciando no número médio de alelos encontrado (Legesse et al., 2007). Contudo, outros fatores podem comprometer a genotipagem, como: o número de locos SSR, a classe do marcador (tipo de repetição nucleotídica) e metodologias empregadas na detecção de marcas polimórficas.

A disponibilidade de uso de determinado loco SSR, pouco se relaciona com o polimorfismo, mas na qualidade de amplificação do loco. Um número maior de locos poderia ter sido incorporado se as condições de amplificação tivessem sido otimizadas. Ogliari et al. (2000) relataram que 125 locos SSR, foram ajustados somente modificando a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) e concentração dos *primers*. Contudo, tentar contornar este problema pode não ser o mais indicado, se for levado em consideração o tempo e os custos, principalmente, se estas forem realizadas para cada loco SSR. Assim, o método “touchdown” proposto por Senior et al. (1996) mesmo não englobando a maioria dos SSR é o mais indicado. Laborda et al. (2005) ressaltam que falhas de amplificação no DNA de milho tropical podem também estar relacionadas com o fato dos marcadores disponíveis, terem sido desenvolvidos para milho de clima temperado.

Neste experimento apenas 23% dos locos pôde contribuir como fonte de informação genotípica, ainda assim, durante a genotipagem vários problemas tiveram que ser solucionados. A primeira esteve ligada à eficiência de uso dos microssatélites, pois, cada marcador SSR permite avaliar um único loco por vez. Este problema foi contornado pela técnica do multiplex, onde se utilizou dois marcadores SSR por gel. Diante da possibilidade de se detectar múltiplos alelos em único loco SSR, teve-se um cuidado especial quanto ao tempo de eletroforese, conforme o tamanho do fragmento amplificado.

O segundo problema foi caracterização de alelos, quando apresentavam diferenças mínimas entre o tamanho do fragmento amplificado. Principalmente, quando este tipo de polimorfismo se estendia para as 90 amostras

genotipadas, tornando a avaliação onerosa, mesmo diante da utilização do gel de poliacrilamida. Esta dificuldade também foi relatada por Laborda et al. (2005).

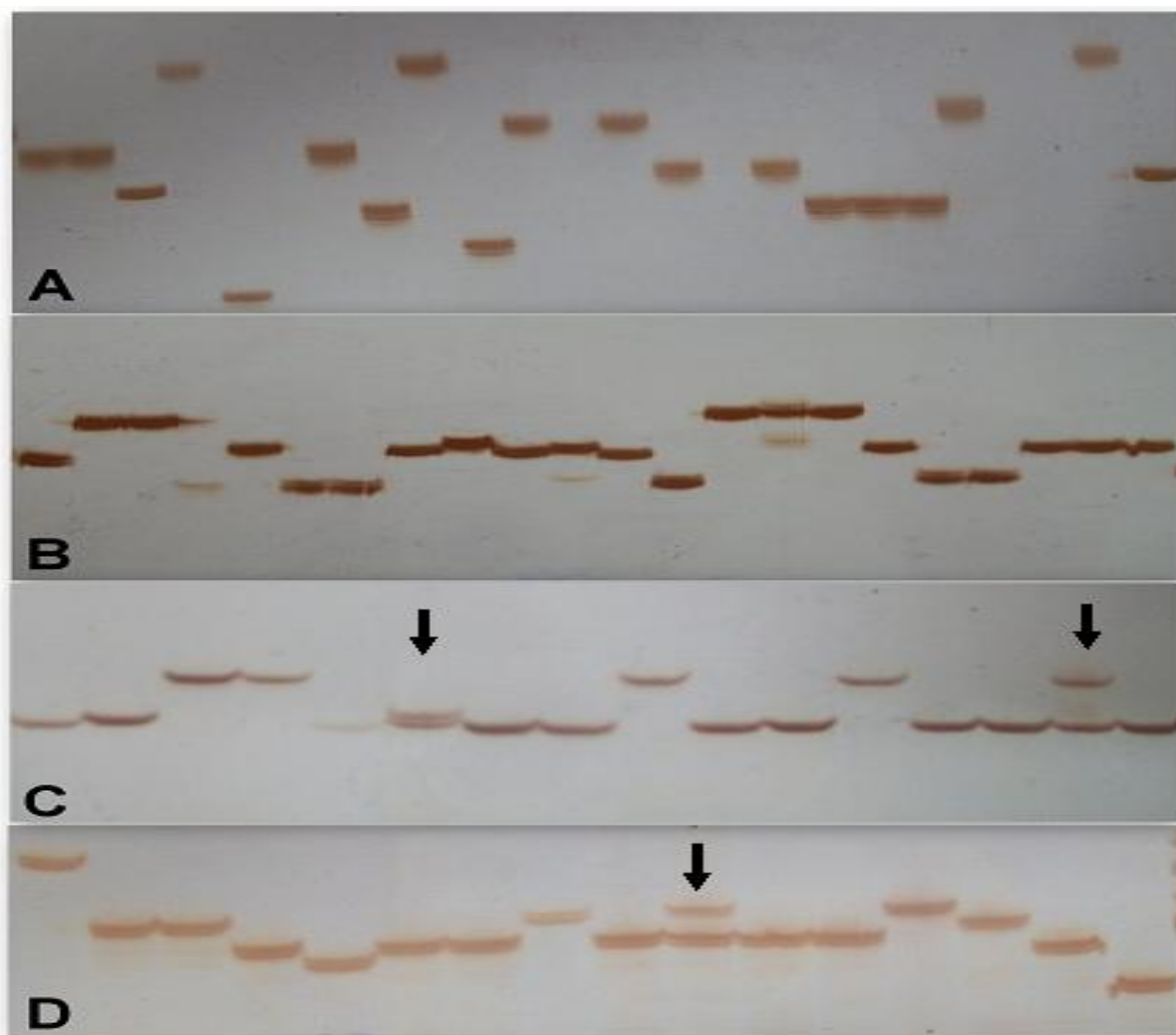
Neste trabalho os 81 locos SSR ficaram bem dispersos por todo o genoma do milho (Tabela 2 e Figura 1) e produziu o número médio de alelos (5,81) valor este, superior do que aqueles anteriormente relatados para milho (Senior et al. 1998; Beyene et al., 2006; Legesse et al., 2007; Aguiar et al., 2008; Balestre et al., 2008). Valor superior encontrado no presente estudo pode ser explicado pelo gel utilizado para detecção do polimorfismo dos marcadores SSR. Nos estudos realizados anteriormente foram usados geis de agarose, ao contrário deste estudo, onde se utilizou gel de poliacrilamida para detecção de alelos (Figura 5). O gel de poliacrilamida apresenta maior acurácia, pois, permite detectar diferenças de nucleotídeos de um par de bases (Senior et al. 1998). Desta forma, o alto poder de resolução do gel de poliacrilamida sobre a agarose pode ter resultado em maior número de alelos por loco, quando comparado com outros trabalhos. Vale ser ressaltado que fatores como o número de locos SSR utilizado, o tamanho da amostra, a diversidade ou similaridade esperada com base no pedigree, não podem ser descartados.

Além destes, o número de alelos pode ser afetado por outro fator de maior importância segundo Choukan et al. (2006), que é o tipo de repetição de SSR. De acordo com estes autores, os locos SSR di-nucleotídeos embora demonstre alto número de alelos, estes não são utilizados pelo CIMMYT devido à dificuldade de dimensionar com precisão os alelos. Esta discussão também é descrita por Senior et al. (1998), no qual relata haver a preocupação particular com locos SSR contendo este tipo de repetição, onde os produtos amplificados estão em uma faixa 130-200 pb, e genótipos que se diferenciam por 2 pb de bases podem não ser detectados. Diante disso, fica evidente que o uso de gel de poliacrilamida, principalmente para locos SSR tipo di-nucleotídeos é indispensável para a precisão das análises.

Os valores médios de PIC constatado neste experimento foram similares com base em pesquisas anteriores utilizando-se locos SSR em linhagens de milho (Senior et al. 1998; Heckenberger et al. 2002; Vaz Patto et al., 2004; Legesse et al., 2007). O valor de PIC considera não somente o número de alelos, mas também suas frequências diminuindo o potencial de

informatividade, ou seja, quanto maior o número de alelos e mais proporcional forem suas freqüências, maior será o valor do PIC. Desta forma, valores reduzidos de PIC podem ser explicados pela presença de alelos raros. Neste trabalho (79,19%) dos alelos identificados ocorreram em uma freqüência abaixo de (0,25). Valor similar foi descrito por Senior et al. (1998), onde atribui este resultado a introdução de germoplasma exótico. De acordo com Vigouroux et al. (2002) e Hamblin et al. (2007) a detecção do maior número de alelos, mas de freqüência baixa (alelos raros) são em decorrência de alta taxa de mutação dos SSRs em milho. Segundo Vigouroux et al. (2002) os microssatélites di-nucleotídeos apresentam taxa de mutação que podem variar de  $(5,2 \times 10^{-4}$  a  $1,1 \times 10^{-3}$  /geração). Considerando apenas os locos SSR di-nucleotídeos deste experimento, observou-se um número médio de alelos (7,5) e média de PIC (0,67), estando estes valores de acordo com aqueles descritos por Smith et al. (1997), Senior et al. (1998), Enoki et al. (2002) e Legesse et al., (2007).

Várias linhagens revelaram mais do que uma banda durante a amplificação (Figura 5). Esta característica é da natureza co-dominante dos marcadores SSR (Caixeta et al. 2009; Faleiro, 2007), no entanto, não é esperada em linhagens com certo nível de endogamia. Resultados similares foram relatados em linhagens de milho por (Smith et al. 1997; Senior et al. 1998; Matsuoka et al. 2002; LIU et al., 2003; Laborda et al., 2005; Legesse et al., 2007). Para estes autores, inúmeras são as causas prováveis para a ocorrência de duas bandas em uma única linhagem, incluindo heterozigidade residual, contaminação de pólen ou semente, mutação específica do loco SSR, ou amplificação de seqüências similares em duas regiões genômicas distintas. Neste trabalho, a explicação possivelmente mais plausível destes resultados, seria a heterozigidade residual, uma vez que diferentes níveis de geração de endogamia ( $S_3$ - $S_9$ ) foram utilizados. Heckenberger et al. (2002) verificaram que o nível de heterozigidade observado nas gerações  $F_{10}$ ,  $F_{11}$  e  $F_{12}$  foi significativamente maior do que o esperado. Ordas et al. (2007) comentam que a seleção parece ocorrer em muitos cromossomos, embora com maior intensidade no cromossomo 7, no qual verificou que a região do (Bin 7,03) a taxa de heterozigotos permaneceu por duas ou mais gerações.



**Figura 5.** Imagens de ampliações realizadas com o conjunto de "primer SSR" umc1035 (A), bnlg1028 (B), umc1894 (C) e umc1656 (D) utilizando DNA genômico de linhagens de milho. As setas indicam que a linhagem encontra-se em heterozigose no loco SSR.

As estimativas de distancias genéticas usando marcadores moleculares revelaram valor mínimo 0,19 entre as linhagens 78 e 79, estando de acordo com o pedigree, já que estas partem de uma origem em comum. Está é uma boa indicação que confirma o poder dos marcadores microssatélites para distinguir entre linhagens intimamente relacionadas (SMITH et al. 1997). A distância média (0,49) observada considerando todos os pares de linhagens apresentou parâmetro similar com os divulgados por Beyene et al. (2006) e próximo de Legesse et al. (2007), indicando níveis intermediários de polimorfismo entre as linhagens.

O algoritmo de UPGMA alocou as linhagens em dezoito grupos, no qual o grupo I ficou representado por 67,8% das linhagens, e os demais grupos

foram compostos pelos 32,2% das linhagens restantes. O valor do coeficiente de correlação cofenético ficou próximo daquele encontrado por Legesse et al. (2007), no qual descreve valor de 0,76 para o UPGMA. Os grupos formados por esta metodologia indicaram que a maior parte das linhagens foi agrupada conforme suas origens. Pesquisas anteriores (Smith et al. 1997; Senior et al. 1998; Reif et al. 2003; Legesse et al., 2007; Choukan et al., 2006), também demonstraram a correspondência entre as distância geradas por locos SSR e as informações geradas pelo histórico do pedigree em milho.

O método de UPGMA e Tocher, embora com algumas discordâncias de linhagens, apresentaram o mesmo número de grupos formados. O grupo I gerado por ambos os métodos tiveram 89% das linhagens em comum e também semelhanças quanto ao grande número de linhagens agrupadas. Este elevado número de linhagens no grupo I torna evidente o elevado padrão de similaridade, e conseqüentemente, a base genética estreita para este grupo de linhagens. Zheng et al. (2008) comentam que as novas linhagens, lançadas pelos programas de melhoramento moderno, freqüentemente são realizadas a partir de híbridos comerciais. Devido a estas circunstancias, torna-se difícil o estabelecimento destas linhagens em grupos heteróticos distintos. Como exemplo, as linhagens 59, 67 e 82 foram selecionadas a partir de três diferentes híbridos. A similaridade genética entre as linhagens variou de 0,4 a 0,6 entre essas três linhagens. Considerando que os híbridos comerciais encontram-se com os alelos já fixados, este resultado não chega a ser uma surpresa, uma vez que o melhoramento genético leva, potencialmente, a um estreitamento da variabilidade genética (Miranda et al., 2007).

A consistência do padrão de agrupamento pode ser averiguada pelo conhecimento das relações de parentesco entre linhagens com base no estudo do pedigree. Linhagens irmãs freqüentemente são agrupadas juntas, como as linhagens 14 e 54, 34 e 55, 85 e 86. Para as linhagens 13 e 53, derivadas respectivamente de Z8420 e Z8480 verificou-se uma alta similaridade com a população UFV8, uma vez que a linhagem 52 foi derivada desta população. A UFV8 é uma população desenvolvida pelo Programa Milho da Universidade Federal de Viçosa.

As linhagens 78, 79 e 80 agrupadas pelo dendograma UPGMA (Figura 3) e por Tocher no grupo/subgrupo I-A (Tabela 3), possuem origem em

comum (BRCMS), e um avanço de sete gerações com mesma história de seleção. A este grupo pode-se incluir também a linhagem 69, embora sua genealogia não seja conhecida, esta também foi inserida no subgrupo I-A, indicando haver padrão de parentesco próximo. Além destas, observa-se que as linhagens 87, 88, 89, e 90, foram agrupadas juntas por UPGMA, estando de acordo com os registros de pedigree, uma vez que todas são derivadas do híbrido comercial DKBC333.

Dentro dos materiais derivados da empresa Syngenta várias discrepâncias foram observadas no pedigree ou na classificação das linhagens com base nos dados de SSR. As linhagens 02, 04, 08, 12, 24, 30, 38, 39, 45, 47e 59, derivadas da Syngenta, não foram agrupadas. A linhagem 39 derivada da (Syngenta Speed) foi agrupada por UPGMA no grupo I, junto com a linhagem 40, no qual apresenta origem desconhecida. As linhagens 59, 08 e 24 derivadas da Syngenta Forte foram agrupada em diferentes grupos (III, VI e VII, respectivamente). Além deste, linhagens irmãs que tiveram origem de outras empresas, como as linhagens 1 e 3, 75 e 73 derivadas, respectivamente, de 34M11 e AL30, também foram alocadas em grupos distintos.

Em geral as linhagens agrupadas estão intimamente relacionadas com o pedigree, embora em alguns casos, linhagens que estão relacionadas com o pedigree não foram concordantes com os dados gerados por microssatélites. Estas discrepâncias não são incomuns quando confrontados os resultados moleculares com as classificações realizadas com base no pedigree (Legesse et al., 2007; Senior et al. 1998; Bernardo e Kahler, 2001), mesmo assumindo que as informações do pedigree estão corretas (Choukan et al., 2006). Conforme alguns estudos, inúmeros são os fatores que podem levar a estas discrepâncias. Involuntárias misturas genéticas (erros na manipulação de sementes) ou informações incompletas sobre o histórico do pedigree são freqüentemente encontradas em programas de melhoramento. Marcadores de DNA podem ser afetados pela seleção, deriva e mutação, além destes, erro humano é um fator que deve ser considerado (Legesse et al., 2007; Choukan et al., 2006; Warburton et al., 2002). Uma causa alternativa, de acordo com (Ajmone-Marsan et al. 2001; Senior et al. 1998) ocorreria durante o processo de agrupamento, sempre que grupos não são sobrepostos, uma linhagem que

está relacionada com outras duas linhagens de grupos distintos só será agrupado com aquele para o qual é mais estreitamente relacionada.

Pela a análise discriminante (Tabela 4), verifica-se que, embora o grupo “Dekalb” tenha alocado 100% de suas linhagens no próprio grupo, esta não é a mais distinta, uma vez que esta empresa compartilha a maioria das linhagens pertencentes aos outros grupos. Desta forma, visando à ampliação da base genética e inserção de novos alelos, é recomendada a exploração das linhagens dos grupos “Cargil e Cati”, desde que se evite para a primeira os genótipos das empresas “Dow e Monsanto”, e para a segunda os genótipos da “Embrapa”.

## Conclusões

As análises de SSR foram efetivas na identificação das relações genéticas entre as linhagens, estando estas frequentemente relacionadas com as informações do pedigree.

Os métodos de Otimização de Tocher e o algoritmo de UPGMA mostraram-se eficiente em determinar as dissimilaridades genéticas entre os genótipos de milho tropical.

A variabilidade genética geral (0,49) apresentou uma base genética ampla dentre todas as combinações de linhagens. Contudo, os dezoito grupos formados, sugerem a possibilidade de exploração de linhagens para formação de grupos heteróticos e planejamento de cruzamentos visando à maximização da heterose.

A proporção elevadas de alelo raro, provavelmente em função das altas taxas de mutação de locos SSR em milho, permite o surgimento de novas variações alélicas. Esta característica dos SSRs de milho contribui para seu poder discriminatório, e pode ser explorado como forma de revelar a impressão digital genética (fingerprinting) de cada indivíduo e acompanhamento do fluxo gênico entre as linhagens.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. G.; SCHUSTER, I.; AMARAL JÚNIOR, A. T. et al. Heterotic groups in tropical maize germplasm by test crosses and simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, 7 (4): 1233-1244, 2008.

AJMONE-MARSAN, P.; GORNI, C.; CHITTO, A. et al. Identification of QTL for grain yield and grain related trait of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different testers and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 230-243, 2001.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 381p. (1971).

AMORIM, E. P.; AMORIM, V. B. O.; DOS SANTOS, J. B. et al. Genetic distance based on SSR and grain yield of inter- and intrapopulational maize single cross hybrids. **Maydica**, 51: 507-513, 2006.

AMORIM, E. P.; SOUZA, J. C. Híbridos de milho inter e intrapopulacionais obtidos a partir de populações S0 de híbridos simples comerciais. **Bragantia**, Campinas, v.64, n. 3, p.561-567, 2005.

BALESTRE, M.; VON PINHO, R. G.; SOUZA, J. C. et al. Comparison of maize similarity and dissimilarity genetic coefficients based on microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, 7(3): 695-705, 2008.

BARBOSA, A. M. M.; GERALDI, I. O.; BENCHIMOL, L. L. et al. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, Netherlands, v.130, p.87-99, 2003.

BEYEBE, Y.; BOTHA, A. M.; MYBURG, A. A. Genetic diversity among traditional Ethiopian highland maize accessions assessed by simple sequence repeat (SSR) markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, V. 53, p. 1579-1588, 2006.

BERNARDO, R.; KAHLER, A. North American study on essential derivation in maize: inbreds developed without and with selection from F2 populations. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 986–992, 2001.

BORRERO, J.; OSPINA, Y.; GUIMARÃES, E. P. et al. Ampliación de la base genética de los acervos de arroz, mediante la introducción de variabilidad. In: GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Selección recurrente en arroz**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1997. p. 55-66.

BISON, O; RAMALHO, M. A. P; RAPOSO, F. V. Potencial de híbridos simples de milho para extração de linhagens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.2, p.348-355, mar./abr., 2003.

BRITO, G. G.; CAIXETA, E. T.; GALLINA, A. P.; MACIEL-ZAMBOLIM, E.; ZAMBOLIM, L.; DIOLA, V.; LOUREIRO, M. E. Inheritance of coffee leaf rust resistancion and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica*, V.173, p.255-264, 2010.

BRUNELLI, K. R.; SILVA, H. P.; CAMARGO, L. E. A. Mapeamento de genes de resistência quantitativa a Puccinia polysora em milho. **Fitopatologia Brasileira**, 27:134-140. 2002.

BOHN, M.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the bases of RFLPs, AFLPs SSRs and their use in predicting progeny variance. **Crop Science**, 39: 228-237, 1999.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G. et al. Tipos de marcadores moleculares. BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**, 2<sup>a</sup> ed. Viçosa, UFV. 2009, 532p.

CHOUKAN, R.; HOSSAINZADEH, A.; GHANNADHA, M. R. et al. Use of SSR data to determine relationships and potential heterotic groupings within medium to late maturing Iranian maize inbred lines. **Field Crops Research**, 95 (2-3), p. 212-222, 2006.

COQUE, M.; GALLAIS, A. Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 112: 1205-1220, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Versão Windows – 2010, Viçosa: UFV.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. 579p.

DANSON, J.; LAGAT, M.; ININDA, J.; KIMANI, M. et al. Application of simple sequence repeats (SSRs) markers to study the resistance of locally adapted maize hybrids to damaging maize streak virus disease. **African Journal of Biotechnology**, 5(16): 1430-1434, 2006.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Multivariate genetic divergence and hibrid performance of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.1, p.63-70, 1997.

DIWAN, N.; CREGAN, P. B. Automated sizing of fluorescent labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 95: 723–733, 1997.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant Dna from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15. 1990.

ENOKI, H.; SATO, H.; AND KOINUMA, K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. **Theoretical and Applied Genetics**, 104: 1270-1278, 2002.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FALCONER, D. S. **Introduction to Quantitative Genetics**. 2<sup>o</sup>ed. Longman, London., 1981.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4<sup>o</sup> ed. Essex, England: Ed. Longman, 1996. 464 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

FU, H.; DOONER, H. K. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 14, p. 9573-9578, July 2002.

FUZATTO, S. R.; FERREIRA, D. F.; RAMALHO, M. A. P. et al. Divergência genética e sua relação com os cruzamentos dialélicos na cultura do milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.22-32, jan./fev., 2002.

GUIMARÃES, C. T.; PADILHA, L.; SOUZA, I. R. P. et al. **“Fingerprinting” Molecular de linhagens de milho. Sete Lagoas**: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 4p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 92).

GUIMARÃES, P. S. **Desempenho de híbridos simples de milho (Zea mays L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Pós-Graduação-IAC.

HAMBLIN, M. T.; WARBURTON, M. L.; BUCKLER, E. S. Empirical Comparison of Simple Sequence Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms in Assessment of Maize Diversity and Relatedness. **PLoS ONE**, 2007; 2(12): e1367.

HECKENBERGER, M.; BOHN, M.; ZEIGLE, J. S. et al. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties I. Genetic and technical sources of variation in SSR data. **Molecular Breeding**, 10: 181-191, 2002.

JI-HUA, T.; WEN-TAO, T.; JIAN-BING, Y. et al. Genetic dissection of plant height by molecular markers using a population of recombinant inbred lines in maize. **Euphytica**, 155: 117–124, 2007.

KRUSKAL J. B. Multidimensional scaling by optimizing good-ness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, 29: 1-27, 1964.

LABORDA, P.R. **Diversidade Genética entre Linhagens de Milho Tropical. Estudo com Base em Marcadores Moleculares.** 2003. 103 f. Tese Dissertação (Mestrado em Genética Vegetal e Melhoramento) – UNICAMP, Campinas. 2003.

LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M.; GARCIA, A. A. F. et al. Tropical maize germoplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1288-1299, 2005.

LANES, E. C. M.; MIRANDA, G. V.; FUSCALDI, J. L. et al. Otimização da metodologia de extração de DNA genômico em plantas de milho para análises de SSR. **Anais do V Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.** Guarapari - ES : Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2009.

LEGESSE, B. W.; MYBURG, A. A.; PIXLEY, K. V. et al. Genetic diversity of African maize inbred lines revealed by SSR markers. **Hereditas**, v. 144: p. 10 – 17, 2007.

LI, X. H.; WANG, Z. H.; GAO, S. R. et al. Analysis of QTL for resistance to head smut (*Sporisorium reilianum*) in maize. **Field Crops Research**, 106(2), 148-155, 2008.

LIMA, M. W. P.; SOUZA, E. A.; RAMALHO, M. A. P. Procedimento para escolha de populações de milho promissoras para extração de linhagens. **Bragantia**, Campinas, 59(2), 153-158, 2000.

LIU, K.; GOODMAN, M.; MUSE, S. et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics**, 165: 2117–2128, 2003.

LIU Z. H.; XIE, H. L.; TIAN, G. W. et al. QTL mapping of nutrient components in maize kernels under low nitrogen conditions. **Plant Breeding**, 127: 279-285, 2008.

LOPES, M. S.; SEFC, K. M.; EIRAS DIAS, E. et al. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. **Theoretical and Applied Genetics**, 99:733–739, 1999.

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

MANO, Y.; OMORI, F.; KINDIGER, B. A. linkage map of maize x teosinte *Zea luxurians* and identification of QTLs controlling root aerenchyma formation. **Molecular Breeding**, 21: 327-337, 2007.

- MIRANDA, Z. F. S.; ARIAS, C. A. A.; PRETE, C. E. C. et al. Genetic characterization of ninety elite soybean cultivars using coefficient of parentage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.363-396, 2007.
- 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, 2000.
- OLIVEIRA, K. M.; LABORDA, P. R.; GARCIA, A. A. F. et al. Evaluating genetic relationships between tropical maize inbred lines by means of AFLP profiling. **Hereditas**, v.140, p.24-33, 2004.
- ORDAS, B.; ROMAY, M. C.; HILL, W. G. Effect of selection on the heterozygosity of inbred lines of maize. **Molecular Breeding**, 20:117–129, 2007.
- PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GUIMARÃES, P. S.; LÜDERS, R. R. et al. Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. **Bragantia, Campinas**, v.67, n.3, p.639-648, 2008.
- PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, C. L. et al. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica**, v.134, p. 277-286, 2003.
- POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v.1, p.215–222, 1996.
- WISSER, R. J.; MURRAY, S. C.; KOLKMAN, J. M. Selection Mapping of Loci for Quantitative Disease Resistance in a Diverse Maize Population. **Genetics**, 180: 583-599, 2008.
- REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; XIA, X. C. et al. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. **Crop Science**, 43: 1275-1282, 2003.
- SENIOR, M. L.; CHIN, E. C. L.; LEE, M. et al. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENBANK Database: map construction. **Crop Science**, 36: 1676-1683, 1996.
- SENIOR, M. L.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M. M. et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. **Crop Science**, 38: 1088-1098, 1998.
- SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H. et al. An evaluation the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLP and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, 95: 163-173, 1997.
- SOENGAS, P.; ORDAS, B.; MALVIR, R. A. et al. Heterotic patterns among flint maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 3, p. 844-849, 2003.

TARAMINO, G.; TINGEY, S.V. SSR (Simple Sequence Repeats) for maize germoplasm analysis. Maize Genetics Conference Abstracts, **Lake Geneva**, v. 37, n. 55, p.48, 1995.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S. et al. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, 137: 63-72, 2004.

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J. S.; MATSUOKA, Y. et al. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. **Molecular Biology and Evolution**, 19: 1251–1260, 2002.

WARBURTON M. L.; XIANCHUN, X.; CROSSA, J. et al. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. **Crop Science**, 42: 1832–1840, 2002.

WASSOM, J. J.; WONG, J. C.; MARTINEZ, E. et al. QTL Associated with Maize Kernel Oil, Protein, and Starch Concentrations; Kernel Mass; and Grain Yield in Illinois High Oil x B73 Backcross-Derived Lines. **Crop Science**, 48: 243-252, 2008.

XU, S. X.; LIU, H.; LIU, G. S. et al. The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize. **Hereditas**, 141(3):207-215, 2004.

ZHANG J.; LU X. Q.; SONG X. F. et al. Mapping quantitative trait loci for oil, starch, and protein contents in grain with high-oil maize by SSR markers. **Euphytica**, 162: 335–344, 2008.

ZHENG, D. H.; VAN, K.; LEE, S. H. Molecular diversity and relationships among elite maize inbreds from US and CIMMYT populations and current heterotic groups in China. **Hereditas**, 145: 182-193, 2008.

ZHU, J.; MICKELSON, S. M.; KAEPLER S. M. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. **Theoretical and Applied Genetics**, 113: 1-10, 2006.