



**MARCADORES MOLECULARES
SEMI-AUTOMATIZADOS NA
CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA
DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE
LINHAGENS DE MILHO TROPICAL**

LILIAN PADILHA

2002

LILIAN PADILHA

**MARCADORES MOLECULARES SEMI-AUTOMATIZADOS NA
CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Maria das Graças G. C. Vieira

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

2002

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Padilha, Lilian

Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. -- Lavras : UFLA, 2002. 85 p. : il.

Orientadora: Maria das Graças G. C. Vieira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Marcador molecular. 3. Caracterização de cultivares. 4. Diversidade genética. 5. Semi-automatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1523

LILIAN PADILHA

**MARCADORES MOLECULARES SEMI-AUTOMATIZADOS NA
CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
área de concentração Fitotecnia, para obtenção
do título de “Doutor”.

APROVADA em 28 de junho de 2002.

Dra. Claudia Teixeira Guimarães	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Edilson Paiva	Embrapa Milho e Sorgo
Dr. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA


Prof. Maria das Graças G. C. Vieira
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

AGRADEÇO

A Deus,

Presente em todos os momentos de minha vida.

OFEREÇO

Aos meus pais, Padilha e Rosa,

exemplos de amor e dedicação e que me ensinaram a lutar por tudo em que acredito, me apoiando incondicionalmente em todos os desafios vividos.

DEDICO

À minha irmã e amiga Luciana (*in memoriam*).

Ao Léo, aos meus irmãos Elaine, Giovani e Cíntia.

À minha sobrinha Luaninha.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria das Graças G.C. Vieira, pelo apoio incondicional, orientação, carinho e incentivos indispensáveis durante todo o curso.

À Dra. Claudia Teixeira Guimarães, exemplo de competência e amor à profissão, pelos preciosos ensinamentos, amizade e convivência.

Ao Dr. Edilson Paiva, pela confiança, sugestões e apoio essenciais à realização desse trabalho.

À Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pela amizade e incentivos.

Ao Léo pelo carinho, paciência, compreensão, apoio e presença constantes.

À equipe do Setor de Sementes da UFLA, Dr. Renato Guimarães, Dr. João Almir e Dra. Maria Laene, que participaram com valiosas contribuições em minha formação durante o curso.

À Dra. Isabel R. Prazeres de Souza, pela amizade e ensinamentos relacionados à técnica de AFLP.

A toda equipe de pesquisadores do NBA da Embrapa Milho e Sorgo, pela amizade e agradável convivência.

Ao pesquisador Sidney Netto Parentoni e a todos os pesquisadores do programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, pelo fornecimento das linhagens utilizadas e informações relacionadas a elas.

Aos amigos do Setor de Sementes, pela agradável convivência e apoio, em especial Kalinka, Andréa, Anderson, Solange, Mary Cleide, Renatinha, Dinara e Elisa.

Aos amigos do NBA, Bira, Lili, Sílvia, Alcione, Edna e Charles, pela estima e companheirismo. Ao Miguel e ao Bira, que além da amizade foram essenciais na realização dos trabalhos de laboratório.

À Embrapa Milho e Sorgo pela possibilidade de realização deste trabalho de tese.

Ao Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e suporte financeiro para a realização do curso.

Aos alunos de iniciação científica, que colaboraram na execução de trabalhos, em especial à Magali.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Propriedade intelectual de cultivares	3
2.2 Marcadores moleculares para obtenção de <i>fingerprintings</i>	5
2.2.1 Marcadores SSR	6
2.2.2 Marcadores AFLP	10
2.3 Estudo da diversidade genética por meio de marcadores moleculares ...	12
2.4 Semi-automatização de técnicas moleculares	14
2.5 Análise e interpretação de dados moleculares	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material vegetal e extração do DNA	19
3.2 Marcadores SSR	21
3.2.1 Avaliação dos <i>primers</i> em agarose	21
3.2.2 Otimização da técnica de SSR fluorescente em poliacrilamida	22
3.3 Marcadores AFLP	23
3.4 Análise dos dados obtidos pelas técnicas de SSR e AFLP	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Marcadores SSR em gel de agarose	28
4.2 Marcadores SSR semi-automatizados	28
4.3 Utilização de marcadores SSR para diferenciação de linhagens	32
4.4 Marcadores AFLP	39
4.5 Comparação entre marcadores AFLP e SSR	41
4.6 Número ótimo de marcadores e correlações entre AFLP e SSR	46
4.7 Diversidade genética entre linhagens elites de milho	51
5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

I - Probabilidade de Identidade

IM - Índice de Marca

LPC - Lei de Proteção de Cultivares

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PIC - *Polymorphism Information Content*

Q - Probabilidade de Exclusão

RAPD - *Random Amplified Polymorphism DNA*

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SSR - *Simple Sequence Repeat*

UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*

QPM - *Quality Protein Maize*

RESUMO

PADILHA, L. Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. 2002. 85 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.*

Dentre as várias aplicações atribuídas aos marcadores moleculares, pode ser destacado o seu uso na caracterização de cultivares e nos estudos da diversidade genética. No presente estudo, avaliou-se marcadores moleculares semi-automatizados para a caracterização e determinação da diversidade genética entre 35 linhagens elite de milho tropical, englobando materiais com endosperma dos tipos duro e dentado e de alta qualidade protéica. Um total de 25 *primers* SSR e 11 combinações de *primers* AFLP foram utilizados na obtenção dos perfis genéticos, sendo que, em ambas as técnicas, os *primers* se encontravam marcados com fluorescência. As características de multi-alelismo e co-dominância dos SSR contribuem para que esses marcadores sejam mais informativos que os AFLP, que, por sua vez, foram mais eficientes na geração de dados ao amostrarem um grande número de locos por reação de PCR. Tais características refletem no conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e no índice de marca obtidos para cada uma das técnicas, sendo ambos os valores de 0,76 para os SSRs e de 0,39 e 0,59 para o AFLP. A simplicidade, rapidez e precisão da técnica semi-automatizada de SSR tornam esses marcadores mais indicados para a caracterização das linhagens. A utilização de apenas dois locos SSR (dup24 e bnlgl006) foi suficiente para discriminar todas as linhagens envolvidas nesse estudo com uma probabilidade de identidade (I) na ordem de 10^{-6} e uma probabilidade de exclusão (Q) de 0,94. As diferenças na amplitude alélica entre os locos permitiram a combinação de seis *primers* em única linha do gel, aumentando a capacidade de discriminação entre os materiais, obtendo-se o I na ordem de 10^{-14} e o Q de 0,9973 para a população considerada. Na análise de diversidade genética, os marcadores SSR e AFLP apresentaram uma correlação de 0,82, sendo que, ambos foram eficientes em agrupar as linhagens em função das suas características do endosperma e da qualidade protéica dos grãos. As técnicas de agrupamento e de componentes principais foram complementares na avaliação da diversidade genética entre as linhagens, permitindo uma interpretação precisa e completa dos dados moleculares.

*Comitê Orientador: Dra. Maria das Graças G. C. Vieira – UFLA (Orientadora), Dra. Claudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo, Dr. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo, Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza – Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

PADILHA, L. **Semi-automated molecular markers in the characterization and determination of genetic diversity among tropical maize inbred lines.** 2002. 85 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) *

Among the several applications attributed to molecular markers, it can be highlighted the use in characterization of cultivars and in genetic diversity studies. The objective of the present study was to evaluate semi-automated molecular markers for characterization and determination of genetic diversity among 35 tropical maize elite inbred lines. The selected lines included materials with endosperm flint, dent and with high protein quality. A total of 25 SSR primers and 11 AFLP primers combinations was used to generate the genetic profiles and, in both techniques, the primers were labeled with fluorescence. The multi-allelic and co-dominance characteristics of SSR, contributed to its highest informatively when compared with the AFLP. In other hand, AFLP was more efficient in data generation once it detected high number of *loci* in each PCR reaction. Such characteristics were reflected in the polymorphism information content (PIC) and in the mark index obtained for each marker, in which both indexes were 0,76 for the SSR, and for the AFLP the indexes were 0,39 and 0,59. Semi-automated SSR technique showed to be simple, fast and precise, indicating that these markers were more suitable in the characterization of genetic materials. Only two SSR loci (dup24 and bnlgl006) were enough to discriminate all maize inbred line involved in this study with an identity probability (I) of 10^{-6} and a probability of exclusion (Q) of 0,94. The differences in the range of the allelic sizes allowed a combination of six primers in one line of the gel, improving the discrimination ability of the system among the population evaluated (I of 10^{-14} and Q of 0,9973). In the genetic diversity study, SSR and AFLP markers showed a correlation of 0,82, and both were efficient in grouping the lines according to the endosperm and quality protein maize. Grouping and principal components analyses were complementary in the genetic diversity evaluation among inbred lines, showing a precise and complete interpretation of the molecular data.

*Guidance Committee: Dr. Maria das Graças G. C. Vieira – UFLA (Major Professor), Dr. Claudia Teixeira Guimarães – Embrapa Milho e Sorgo, Dr. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo, Dr. Isabel Regina Prazeres de Souza – Embrapa Milho e Sorgo.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho e, para manter uma produção anual superior a 30 milhões de toneladas, tecnologias são disponibilizadas aos produtores para a garantia de maior produtividade e competitividade. A utilização de genótipos com elevado potencial produtivo e adaptados a regiões específicas são fatores essenciais ao sucesso das lavouras. Esses materiais são obtidos em programas de melhoramento genético que têm nas sementes o veículo de transferência da tecnologia ao produtor. A semente é um dos principais produtos de uma empresa de pesquisa pública ou privada e tanto a proteção intelectual, quanto o conhecimento da diversidade entre materiais genéticos maximizam a eficiência dos processos de melhoramento e, conseqüentemente, a produção de cultivares superiores.

No Brasil a Lei de Proteção de Cultivares (LPC) está regulamentada desde 1997, onde são exigidos descritores bem definidos para a proteção intelectual do material genético. A utilização de técnicas moleculares na obtenção de *fingerprintings* para a caracterização de cultivares é um processo atual, mas ainda não reconhecido como metodologia oficial para a determinação de descritores. Tais técnicas são muito precisas, pois acessam a variabilidade diretamente ao nível do DNA e permitem a geração de grande número de descritores estáveis, que não são influenciados pelo ambiente nem pelo estágio de desenvolvimento da planta. As técnicas moleculares vêm sendo fortalecidas em função dos vários exemplos práticos de processos jurídicos solucionados por meio de *fingerprintings* moleculares. A implementação de tais metodologias constitui uma ferramenta efetiva para assegurar os direitos de propriedade intelectual sobre os genótipos elite de milho tropical, representando um forte

incentivo a novos investimentos e novas oportunidades tecnológicas devido às possibilidades de aumento de retorno dos investimentos aplicados.

O conhecimento da diversidade genética entre os genótipos utilizados em programas de melhoramento permite a organização da variabilidade desses materiais auxiliando a seleção de progenitores e potencializando os ganhos genéticos obtidos. Os *fingerprintings*, de maneira rápida e precisa, também podem ser utilizados na definição de relações genéticas, o que normalmente é feito a partir de informações de pedigree, comparações fenotípicas ou análises da capacidade combinatória.

Marcadores como os SSR e AFLP são muito utilizados em análises moleculares. Os SSR são marcadores multialélicos e co-dominantes, apresentando um elevado conteúdo de informação genética por loco. Tal técnica é caracterizada pela simplicidade, rapidez e precisão na geração dos perfis genéticos, o que a torna útil para a caracterização de cultivares. Por outro lado, os marcadores AFLP exploram polimorfismos de restrição e de amplificação, permitindo avaliar rapidamente um grande número de locos. Além das características citadas acima, ambas as técnicas possuem a vantagem de poderem ser automatizadas, propiciando com isso, ganhos em precisão e possibilitando a análise dos dados em larga escala.

Técnicas moleculares têm sido muito utilizadas na obtenção de *fingerprintings* em milho, embora ainda exista uma carência de informações quanto a utilização dessas metodologias em genótipos tropicais. Dessa forma, com o presente trabalho, objetivou-se a otimização de uma metodologia semi-automatizada para marcadores SSR e AFLP e a aplicação desses marcadores na caracterização e avaliação da diversidade genética entre linhagens elite do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Foram ainda avaliadas diferentes formas para análise e interpretação dos resultados obtidos por meio desses marcadores.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Propriedade intelectual de cultivares

A cultura do milho ocupa lugar de destaque devido ao seu grande valor econômico. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo superado pelos Estados Unidos e China, e sua produção foi estimada em cerca de 34 milhões de toneladas no ano de 2000 (Agrianual, 2000). Essa cultura também se destaca pelo grande progresso em termos de conhecimentos científicos acumulados (Paterniani & Campos, 1999).

A importância da cultura do milho é refletida por um setor de sementes competitivo, onde grandes investimentos e desenvolvimento tecnológico são transferidos ao produtor via sementes de alta pureza genética. A cultura do milho beneficia-se do fato de que a maioria dos materiais comercializados é híbrida, o que caracteriza uma barreira natural à utilização das sementes em plantios subsequentes. Tal característica tem justificado os investimentos no setor de sementes, por permitir que as empresas tenham o retorno dos investimentos aplicados no desenvolvimento de genótipos com ampla adaptação e estabilidade, mesmo quando ainda não existia uma política de proteção de cultivares.

A aprovação da Lei nº 9.456 em 1997 (Brasil, 1997), que instituiu a Lei de Proteção de Cultivares (LPC), foi um marco para o setor de sementes. Diante de um mercado crescente de sementes e com o lançamento de novas cultivares a cada safra, tem sido demandada a disponibilização de técnicas rápidas precisas e a custos viáveis para a identificação dos materiais genéticos desenvolvidos pelos programas de melhoramento. Pela LPC, para que uma nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada seja submetida ao processo de proteção, ela deve passar

pelos testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE), cujos descritores sejam conhecidos, homogêneos quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estáveis ao longo de sucessivas gerações (Brasil, 1997). A distinção de genótipos é oficialmente realizada por meio de características morfológicas que podem ser auxiliadas por marcadores bioquímicos ou de DNA. Para o milho, alguns dos descritores considerados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares são: forma da ponta da primeira folha; ângulo entre a lâmina foliar e o caule medido logo acima da espiga superior; comportamento da lâmina foliar acima da espiga superior; comprimento da haste principal do pendão; ângulo entre a haste principal do pendão e a ramificação lateral, no terço inferior do pendão; coloração do estigma pela antocianina e tipo de grão (Ministério da Agricultura e do Abastecimento, disponibilizado no endereço <http://www.agricultura.gov.br>), MAA (2002).

Os marcadores morfológicos apresentam algumas desvantagens como a necessidade de um grande número de descritores que serão identificados, em sua maioria, na planta inteira ou adulta. Além do tempo gasto e da necessidade de espaço físico para a avaliação do material, alguns marcadores morfológicos podem ser influenciados pelo ambiente no qual estão inseridos. Os marcadores bioquímicos, por sua vez, apresentam um nível de polimorfismo, embora limitado, superior aos morfológicos e são menos influenciados pelo ambiente. Os avanços nas técnicas moleculares tem possibilitado o acesso à variabilidade genética ao nível de DNA, aumentando significativamente a precisão na obtenção dos *fingerprintings*. Os marcadores moleculares são abundantes, apresentam herança mendeliana, não são influenciados pelo ambiente e podem ser detectados em qualquer tipo de tecido e fase de desenvolvimento da planta (Cheng et al., 1997), podendo ser utilizados no monitoramento da pureza genética e varietal das sementes, além da proteção intelectual de cultivares.

Os programas de melhoramento têm desenvolvido um grande número de cultivares com o intuito de fornecer materiais que sejam mais produtivos e adaptados a regiões específicas. Em função da redução das bases genéticas se torna cada vez mais difícil a diferenciação desses materiais, utilizando simplesmente características morfológicas. Como a identificação de cultivares é um ponto essencial para garantir o direito de propriedade intelectual, a utilização de técnicas moleculares contribuirá de maneira expressiva para o aumento da precisão das informações relacionadas aos genótipos de interesse.

2.2 Marcadores moleculares para obtenção de *fingerprintings*

Desde a descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA por Watson e Crick em 1953, as informações sobre tal molécula e as técnicas para a sua manipulação progrediram e continuam a progredir a uma velocidade sem precedentes. A rapidez e o dinamismo com que as novas descobertas são divulgadas, garantem o acúmulo de informações em um período de tempo muito curto, permitindo que metodologias que utilizam o DNA estejam em contínuo aperfeiçoamento.

Um grande impulso na área de biologia molecular foi dado em meados da década de 80, quando Karl Mullis divulgou a técnica denominada *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Essa técnica envolve a síntese *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da DNA polimerase. A reação baseia-se no anelamento e na extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA alvo da amplificação. Os *primers* são pequenas moléculas de DNA de fita simples sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A partir daí várias foram as técnicas de

marcadores moleculares derivadas da PCR, permitindo avanços significativos das pesquisas nas áreas de genética e de biologia molecular. Dentre essas técnicas, pode ser destacada a de SSR (*Simple Sequence Repeat* ou microssatélite) e de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) que, segundo McGregor et al. (2000), são caracterizadas pela confiabilidade, precisão, reprodutibilidade e por prover um perfil genético detalhado além de apresentarem a possibilidade de automação.

2.2.1 Marcadores SSR

Os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas. Os microssatélites são seqüências curtas com um a seis nucleotídeos repetidos de 10 a 60 vezes em tandem ao longo da molécula de DNA (Rafalski et al., 1996). As regiões que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre diferentes espécies de um mesmo gênero permitindo a transferência de locos microssatélites entre espécies. Di Gaspero et al. (2000) demonstraram que *primers* SSR isolados de *Vitis vinifera* amplificaram em outras 15 espécies do gênero *Vitis*, o mesmo ocorrendo entre espécies do gênero *Eucalyptus* (Glaubitz et al., 2001; Kirst, 1999) e do gênero *Pelargonium*, que engloba espécies comerciais do gerânio (Becher et al., 2000).

A identificação dos SSR é um processo trabalhoso e de elevado custo, envolvendo a construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones contendo os microssatélites, o seqüenciamento em larga escala desse clones, desenho dos *primers* específicos e sua confirmação por PCR (Rafalski et al., 1996). Para o milho, um grande número de seqüências de *primers* SSR encontram-se publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>), estando bem caracterizados e mapeados ao longo de todo o genoma.

Cada microssatélite constitui um loco genético altamente variável, multialélico e com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998), mostrando estabilidade ao longo de várias gerações (Russel et al., 1997). Em milho, Smith et al. (1997) ao avaliarem 131 locos SSR em 13 conjuntos de parentais e seus respectivos híbridos observaram a incidência de 2,2% desses locos com herança não mendeliana, ou seja, ausência de uma banda parental ou presença de uma banda não parental no híbrido. SSR são úteis também na detecção da heterozigosidade de um loco específico, o que é importante para o acompanhamento da pureza genética e do nível de endogamia dos materiais elites utilizados no melhoramento genético (Prasad et al., 2000; Senior et al., 1998; Smith et al., 1997).

Repetições contendo núcleos di-nucleotídeos são abundantes em genomas de plantas, favorecendo a produção de um grande número de marcadores polimórficos úteis para estudos genéticos (Condit & Hubbel, 1991, Morgante & Olivieri, 1993). O maior grau de polimorfismo associado aos microssatélites di-nucleotídeos tem sido relatado para milho (Chin et al., 1996; Smith et al., 1997), soja (Rongwen et al., 1995) e pessegueiro (Testolin et al., 2000). Apesar de ser mais polimórfica, essa classe de microssatélites apresenta uma maior frequência de bandas fantasmas, o que pode comprometer a precisão na identificação dos alelos em processos de genotipagem. Testolin et al. (2000) citam que o aparecimento de bandas fantasmas se deve possivelmente ao escorregamento da DNA polimerase, implicando em um pareamento sem a exata coincidência das fitas molde e nascente do DNA que estão sendo amplificadas na reação de PCR. Glaubitz et al. (2001) confirmam as dificuldades na identificação do tamanho correto dos alelos quando o loco SSR apresenta núcleo di-nucleotídeo. No entanto, esses autores conseguiram aumentar a precisão na avaliação dos tamanhos dos fragmentos utilizando padrões internos de referência com alelos de tamanho conhecido.

Em humanos, os microssatélites são utilizados para a genotipagem de indivíduos com o objetivo de realização de testes de identidade (<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>). Os SSR têm sido, preferencialmente, utilizados em laboratórios forenses devido ao nível reduzido de exigência da técnica em termos de quantidade e qualidade de DNA tendo contribuído para o sucesso dessa técnica (Ruitberg et al., 2001). Revendo a dinâmica evolucionária de microssatélites em humanos, Schlötterer (2000) comenta que a taxa de mutação nos SSR pode variar de 10^{-6} até 10^{-2} , sendo que o escorregamento da DNA polimerase é considerado o mecanismo de mutação predominante na geração de variabilidade dos SSR. Durante a replicação do DNA, a fita molde e a fita nascente não são perfeitamente alinhadas e, se a síntese do DNA continua nessa molécula, o número de repetições dos microssatélites é alterado. A taxa de mutação *in vivo* observada para os SSR depende também da eficiência do sistema de reparo do DNA.

Em plantas, segundo Diwan & Cregan (1997), a mutação não deve ser considerada um obstáculo ao uso de marcadores SSR para identificação de genótipos, uma vez que os sistemas de genotipagem utilizam DNA de um conjunto de indivíduos e não de um indivíduo isoladamente. Nesse caso, as mutações em um indivíduo não alterarão a constituição alélica de SSR de uma cultivar. Gethi et al. (2002) avaliaram 44 locos SSR de seis linhagens de milho temperadas, obtidas de 14 programas de melhoramentos distintos e verificaram a existência de pequena, mas significativa variabilidade entre a mesma linhagem cujas sementes foram obtidas de diferentes fontes. Tais autores, no entanto, não encontraram evidências para altas taxas de mutação, sugerindo que tais diferenças devem ter sido causadas pelos diferentes sistemas de manutenção do materiais genéticos.

Os SSR têm sido utilizados para a genotipagem de várias espécies vegetais, a exemplo do milho (Senior et al., 1998; Smith et al., 1997), soja

(Diwan & Cregan, 1997; Rongwen et al., 1995), trigo (Harker et al., 2001; Prasad et al., 2000; Bohn et al., 1999), arroz (Davierwala et al., 2000), aveia (Li et al., 2000), cevada (Pillen et al., 2000; Russel et al., 1997), tomate (Bredemeijer et al., 1998), batata (McGregor et al., 2000), eucalipto (Glaubitz et al., 2001; Kirst, 1999), *Pinus* (Elsik et al., 2000), alface (Wiel et al., 1998), macieira (Guilford et al., 1997), coqueiro (Teulat et al., 2000), pessegueiro (Testolin, 2000) e gerânio (Becher et al., 2000).

Variações nas regiões SSR resultam nos diferentes números de alelos detectados por loco genético, que podem ser amplificados por PCR e resolvidos em géis de poliacrilamida ou de agarose (Echt & May-Marquardt, 1997; Schneider & Douches, 1997; Smulders et al., 1997). Os SSR apresentam elevado poder discriminatório e, normalmente poucos locos garantem a completa diferenciação dos genótipos de interesse. Essa característica é um fator importante, considerando a necessidade de discriminação de cultivares muito próximas ou essencialmente derivadas. Em milho, para a definição de *fingerprintings* únicos para cada uma das 94 linhagens de milho avaliadas por Senior et al. (1998), apenas cinco locos de SSR foram necessários. Em cevada, Russel et al. (1997) verificaram que de 11 locos SSR avaliados puderam ser obtidas três combinações distintas de quatro locos SSR que distinguiram 24 genótipos com uma probabilidade de identidade de 1 em 1000. Rongwen et al. (1995) trabalhando com um conjunto de sete locos SSR, obtiveram *fingerprintings* únicos para 94 dos 96 genótipos de soja estudados. Diwan & Cregan (1997) utilizaram 20 locos para diferenciar 35 genótipos de soja, incluindo cultivares que eram idênticas para características morfológicas e de pigmentação, além de sete genótipos que não haviam sido diferenciados com 17 sondas de RFLP. Em gerânio, 41 entre 44 acessos examinados foram distintos por três locos SSR (Becher et al., 2000). Em macieira, Guildford et al. (1997) identificou três marcadores SSR que discriminaram as 21 cultivares estudadas e,

em tomate, cuja base genética é considerada estreita, apenas quatro locos SSR foram suficientes para a completa diferenciação de 16 cultivares (Bredemeijer et al., 1998).

Em milho tem sido uma preocupação gerar informações que viabilizem a criação de um sistema de caracterização dos materiais genéticos, tanto os utilizados nos programas de melhoramento, quanto aqueles comerciais, de forma a permitir a utilização desse sistema no processo de proteção intelectual. A importância dessa tecnologia pode ser exemplificada pela disponibilização comercial de um sistema para a caracterização de cultivares de milho, por uma das maiores empresas de biotecnologia, a Celera. Embora existam trabalhos envolvendo a caracterização de cultivares de milho, existe ainda a necessidade do desenvolvimento de sistemas multilocos para genótipos tropicais de milho e do conhecimento da variabilidade alélica desses materiais.

2.2.2 Marcadores AFLP

O AFLP é uma técnica que utiliza a amplificação seletiva de fragmentos de restrição, permitindo a análise simultânea de um grande número de locos, além de fornecer padrões confiáveis e reprodutíveis de fragmentos amplificados. Esse método é capaz de gerar complexos padrões de bandas, os quais são úteis para o estudo de diversidade genética, identificação varietal e mapeamento genético. O AFLP tem sido utilizado para estudos genéticos em milho (Vuylsteke et al., 1999; Castiglioni et al., 1999), arroz (Zhu et al., 1998), trigo (Schwarz et al., 2000; Shan et al., 1999; Donini et al., 1997), cevada (Schwarz et al., 2000; Shan et al., 1999), cana (Lima et al., 2002), capim bermuda (Zhang et al., 1999), videira (Fossati et al., 2001; Cervera et al., 1998), alface (Hill et al., 1996), beterraba (Kraft et al., 2000) e girassol (Quagliaro et al., 2001).

Na técnica do AFLP, o DNA genômico é clivado com duas enzimas de restrição e são ligados adaptadores específicos às extremidades dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Tais fragmentos são amplificados seletivamente via PCR utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores, sendo então visualizados em géis de alta resolução (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Vos et al., 1985).

Os AFLP apresentam um grande poder de detecção da variabilidade genética por explorarem simultaneamente os polimorfismos de restrição e de amplificação. Com isso, obtém-se um elevado nível de polimorfismo sem a necessidade de informação prévia das seqüências do DNA. A técnica AFLP é altamente reproduzível devido ao maior rigor nas condições de anelamento do *primer* durante as reações PCR, sendo menos sensível às variações nas concentrações iniciais de DNA. A restrição de 200 ou 400 ng de DNA em cana por exemplo, não interferiu no perfil ou na intensidade das bandas AFLP (Lima et al., 2002). Quanto a capacidade dos marcadores AFLP em cobrir uniformemente o genoma em milho, foi observado que, as combinações *PstI/MseI* encontram-se distribuídas mais ao acaso nos cromossomos, enquanto que as combinações *EcoRI/MseI* tendem a se concentrar principalmente nas regiões centroméricas (Castiglioni et al., 1999; Vuylsteke et al., 1999).

O custo da técnica de AFLP é elevado, uma vez que requer várias etapas e reagentes, além da detecção dos polimorfismos ser realizada por marcação radioativa ou fluorescente. Por outro lado, sistemas de coloração de géis com prata podem reduzir o custo da técnica que, quando comparada ao desenvolvimento inicial dos *primers* microssatélites, não apresenta custo tão elevado. Considerando o elevado número de polimorfismo por combinação de *primers* AFLP, o custo por marca torna-se relativamente reduzido para a análise de genomas completos (Zhu et al., 1998).

Embora Castiglioni et al. (1999) tenham avaliado os marcadores AFLP como co-dominantes, quantificando a heterozigosidade em função da variação na intensidade das bandas em indivíduos de famílias F_3 , os marcadores AFLP são considerados essencialmente dominantes. Marcadores dominantes não permitem distinguir indivíduos homocigotos dominantes de heterocigotos, assim os fenótipos (AA) e (Aa) serão colocados na mesma classe fenotípica (presença de banda), enquanto (aa) será identificado pela ausência da banda (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.3 Estudo da diversidade genética por meio de marcadores moleculares

A eficiência na utilização do germoplasma envolve o conhecimento da diversidade genética entre os materiais do programa de melhoramento de milho, bem como a alocação desses em grupos heteróticos. Grupos heteróticos se referem ao germoplasma que, quando avaliado em combinações híbridas exibem superioridade consistente, geralmente resultante da heterose. Esses grupos heteróticos em milho são mais claramente determinados no germoplasma temperado, do que no tropical. De acordo com Parentoni et al. (2001), no Brasil, um dos padrões heteróticos mais explorados em programas de melhoramento de milho tem sido o cruzamento entre materiais de endospermas dentados, BR 106 (Tuxpeño), com materiais de endosperma do tipo duro, BR 105 (Suwan).

Trabalhos foram realizados no sentido de avaliar a diversidade genética e caracterizar as linhagens ou variedades de milho de origem temperada com relação ao grupo heterótico correspondente (Ajmone-Marsan et al., 1992; Beck et al., 1991; Burstin et al., 1994; Dubreuil et al., 1996; Hahan et al., 1995; Livini et al., 1992; Messmer et al., 1992a; Messmer et al., 1992b; Mumm & Dudley, 1994), sendo também avaliados genótipos subtropicais (Mickelson et al., 2001) e tropicais (Lanza, 1996; Parentoni et al., 2001). Dados de pedigree, fenotípicos,

avaliação da capacidade combinatória em cruzamentos dialélicos e dados moleculares de RFLP, RAPD, AFLP e SSR têm sido utilizados para essa finalidade.

Os SSR apresentam propriedades valiosas, quando comparados ao RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), tanto para caracterização de genótipos quanto para a alocação de linhagens em grupos heteróticos (Senior et al., 1998), sendo utilizados para a identificação e validação de pedigrees em genótipos de milho. Utilizando 70 locos SSR, Senior et al. (1998) alocaram 94 linhagens elite de milho, representando a diversidade genética do *Corn belt dent* e do *Southern Dent*, em nove grupos correspondentes aos principais grupos heteróticos. Smith et al. (1997) encontraram resultados similares para SSR e RFLP na avaliação da diversidade genética e validação de dados de pedigree para 58 linhagens e 4 híbridos de milho com 80 sondas RFLP e 131 locos SSR. Esses autores também ressaltaram as vantagens de simplicidade, reprodutibilidade, poder de discriminação de genótipos e custo efetivo dos SSR comparados aos RFLP.

Análises comparativas da similaridade genética entre 33 linhagens de milho detectada por marcadores RFLP, RAPD, SSR e AFLP mostraram que, com exceção do RAPD, o agrupamento obtido para as linhagens foi semelhante entre os marcadores e concordaram com as informações de pedigree (Pejic et al., 1998). Os autores sugerem que os marcadores SSR e AFLP devem ser utilizados na obtenção de *fingerprintings* e análises de similaridade genética em função da precisão dessas técnicas e também a possibilidade de automação.

Segundo Fossati et al. (2001), tanto SSR quanto AFLP são igualmente efetivos para definição das relações genéticas entre cultivares de videira e a aplicação de ambas as metodologias pode ser recomendada para definir a identidade e a diversidade de diferentes acessos. No entanto, a técnica de AFLP apresentou melhor resolução quando comparada aos microssatélites, para análise

de diversidade genética em populações de coqueiro ao longo de uma faixa geográfica (Teulat et al., 2000). Por outro lado, os SSR revelaram informações adicionais sobre diferenças nas combinações alélicas entre e dentro de populações, ressaltando regiões onde composições alélicas eram mais raras ou mais diversas. Em soja, 20 marcadores SSR não foram suficientes para revelar relações genéticas entre materiais de soja tais como características relacionadas aos grupos de maturidade fisiológica ou origem geográfica (Diwan & Cregan, 1997).

Lima et al. (2002) afirmaram que a estimativa de similaridade genética obtida a partir de marcadores AFLP pode ser mais informativa do que os dados obtidos pela análise de pedigree. Tais autores observaram que 21 combinações de *primers* AFLP geraram um número de marcas satisfatório para avaliar a variabilidade genética entre 83 genótipos de cana-de-açúcar, caracterizados pela complexidade da natureza poliplóide do genoma e pela base genética relativamente estreita entre as cultivares. Para garantir um coeficiente de variação em torno de 5%, os autores estimaram a necessidade de serem avaliadas em torno de 800 bandas polimórficas.

2.4 Semi-automatização de técnicas moleculares

Tecnologias que permitam alta resolução genética associada à elevada capacidade para processamento de dados a custos efetivos encontrarão pronta aplicação para conservação de fontes genéticas, análise de pedigree e proteção dos direitos intelectuais (Mitchell et al., 1997). Geralmente, o aperfeiçoamento dessas tecnologias busca o aumento da precisão, amostragem mais ampla do genoma, reprodutibilidade e menor demanda de tempo na obtenção e processamento dos dados. Para Smith & Register III (1998), os caminhos para a redução dos custos das técnicas de SSR envolvem: *i*) miniaturização, reduzindo

as quantidades de reagentes e de amostras; *ii*) automatização, desde a extração do DNA até a análise dos resultados; *iii*) processamento paralelo ou simultâneo de muitas amostras, para viabilizar a sua utilização de forma rotineira no laboratório.

A semi-automatização das técnicas de AFLP e SSR se refere, principalmente, a extração e análise automática dos dados por programas computacionais durante a eletroforese, reduzindo com isso a chance de erros provocados pela manipulação humana dos resultados. Tais sistemas, utilizam *primers* marcados com fluorescências diferentes, que podem ser combinados para o processo simultâneo das amostras, aumentando a eficiência do mesmo. A captura das informações é realizada pela leitura dos fragmentos fluorescentes por um sistema a laser no seqüenciador automático de DNA. Um padrão de peso molecular marcado com uma quarta fluorescência é avaliado juntamente com cada uma das amostras, garantindo a quantificação precisa do tamanho dos fragmentos. No sistema semi-automatizado, é possível visualizar e analisar até três produtos amplificados numa mesma faixa de tamanho para os fragmentos e, no caso dos microssatélites, podem ainda ser combinados locos com diferentes amplitudes de tamanho, aumentando assim o número de marcas que podem ser analisadas em um gel. Outra característica favorável diz respeito à resolução do sistema, possuindo a precisão de um nucleotídeo em uma faixa de tamanho entre 50 e 500 bases.

Têm sido realizados trabalhos no sentido de otimizar reações de PCR, onde são feitas combinações de *primers* marcados com diferentes fluorescências e que amplificam fragmentos com diferentes amplitudes alélicas (reações *multiplex*) em uma única reação. Em eucalipto, Kirst (1999) otimizou três sistemas *multiplex*, onde em cada reação de PCR eram amplificados três locos SSR, simultaneamente. Em brássica, Mitchell et al. (1997) também otimizaram

reações *multiplex* e puderam detectar variações mínimas, em torno de 0,46 pb, quando comparados com a amplificação de cada loco separadamente.

2.5 Análise e interpretação de dados moleculares

A informação obtida nos géis é extraída a partir da quantificação dos tamanhos dos alelos amplificados. Isso permite a identificação dos polimorfismos entre os indivíduos, e conseqüentemente a obtenção de matrizes que serão utilizadas nas análises genéticas futuras.

A probabilidade de identidade (I) reflete a probabilidade medida em cada loco, de serem encontrados genótipos idênticos, e tem sido usada para indicar o poder de discriminação de sistemas de genotipagem baseados em microssatélites para *Eucalyptus* (Kirst, 1999) e cevada (Russel et al., 1997). A probabilidade de identidade tem sido calculada pela seguinte fórmula:

$$I = 1 - \sum p_i^4 - \sum_{i=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2 \text{ onde,}$$

p_i e p_j são as freqüências do i-ésimo e j-ésimo alelo em uma dada população.

Kirst (1999) avaliou o poder de discriminação de três sistemas de genotipagem multilocos em *Eucalyptus*, calculando a probabilidade de identidade combinada a partir do produto das probabilidades de identidade dos locos que compunham os três locos de cada um desses sistemas, encontrando valores que variaram de 10^{-5} a 10^{-3} . Segundo o autor, o grande número de alelos observados e o relativo equilíbrio na distribuição das freqüências alélicas resultantes da variabilidade genética no grupo de indivíduos analisados refletiram na precisão dessa avaliação. Em cevada, Russel et al. (1997)

afirmaram ser possível discriminar 24 cultivares elite de cevada utilizando quatro locos microssatélites com uma probabilidade inferior a 1 em 1000 de se encontrar genótipos idênticos.

Outra maneira de avaliar um sistema de marcadores é por meio do cálculo da probabilidade de exclusão (Q). Uma probabilidade de exclusão pode ser definida como a capacidade média de um sistema de marcadores excluir uma dada relação de parentesco (Gerber et al., 2000). O poder de exclusão leva em consideração relações de parentesco conhecidas, frequência alélica dos locos e o número de locos testados. Para os marcadores co-dominantes, o poder de exclusão de um loco pode ser expresso em termos de força da frequência alélica, indicando a probabilidade do loco em detectar a não existência de relação de parentesco dos indivíduos considerados dentro da população estudada. Para um loco com n alelos diferentes, cada i -ésimo alelo com uma frequência p_i na população e sendo k a força da frequência alélica, pode-se calcular a_k (Gerber et al., 2000):

$$a_k = \sum_{i=1}^n p_i^k \quad \text{calculando-se então:} \quad Q = 1 - 4a_2 + 2a_2^2 + 4a_3 - 3a_4$$

Probabilidades de exclusão (Q) são aumentadas com o uso de vários locos e, de acordo com Weir (1996), o valor combinado para Q_c avaliados para diferentes locos (l) pode ser calculada se Q_l forem independentes:

$$Q_c = 1 - \prod_l (1 - Q_l)$$

A habilidade dos marcadores moleculares em revelar associações que reflitam relações genéticas entre linhagens ou variedades são dependentes do número de locos polimórficos, do grau de amostragem do genoma e o número de alelos por loco que podem ser identificados (Smith & Helentjaris, 1996). A

diversidade genética do loco ou PIC (*Polymorphism Information Content*) é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A maior informatividade de uma classe de marcadores define sua maior eficiência em detectar polimorfismos entre dois indivíduos (Rafalski et al., 1996). O cálculo do PIC considera não somente o número de alelos para um determinado loco mas também a frequência desses alelos (p_i). De acordo com Weir (1996), o PIC pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \text{ onde } p_i^2 \text{ é a frequência do } i\text{-ésimo alelo na população}$$

Os valores de PIC devem ser analisados com cautela entre diferentes experimentos, uma vez que a diversidade do material estudado influencia os resultados. Bohn et al. (1999) avaliando 11 variedades de trigo com um conjunto de 21 *primers* SSR, encontrou PIC médio em torno de 0,30; enquanto Prasad et al. (2000) observaram valores de PIC médios de 0,71 para um conjunto de 20 SSR utilizados em 55 genótipos elites. A resolução da técnica empregada é também determinante na detecção de um maior ou menor número de alelos. Segundo Senior et al. (1998), géis de agarose por apresentarem menor resolução comparada aos géis de poliacrilamida, podem resultar na detecção de um menor número de alelos por loco e, conseqüentemente, em menor valor de PIC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e extração do DNA

Foram utilizadas 35 linhagens elites englobando materiais de endosperma do tipo duro, dentado e de alta qualidade protéica, do programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biologia Aplicada.

O DNA foi extraído de plântulas, sendo amostrados dez indivíduos de cada linhagem. A extração do DNA foi realizada segundo o método descrito por Saghai-Marooft et al. (1984), onde um volume de 5 mL de tampão CTAB (CTAB 2%; 0,2 M Tris-HCl; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2% β -Mercaptoetanol) foi adicionado à aproximadamente 5 mg do material vegetal anteriormente moído em N₂ líquido até a obtenção de um pó fino. A mistura foi mantida a 65°C durante uma hora, com homogeneizações a cada 15 minutos. Após esse período, foi feita uma lavagem com igual volume de clorofórmio-octanol (24:1), com homogeneizações constantes por 10 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, onde foi realizada nova lavagem com clorofórmio. Após a centrifugação, o DNA foi precipitado com isopropanol, em seguida, ressuspenso em 3 mL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) e tratado com 20 μ L RNase (10 mg/mL) durante 1 hora a 37°C. O DNA foi novamente precipitado com etanol 95%, lavado com etanol 70% e ressuspenso em TE.

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%, utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese realizada a 100 v durante 1 hora, o gel foi tratado com brometo de etídeo (1 mg/mL) e visualizado sob luz ultra-violeta (UV) no Eagle Eye II (Stratagene).

TABELA 1. Informações relativas ao pedigree, tipo de endosperma e qualidade protéica dos grãos de 35 linhagens tropicais de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo (comunicação pessoal ^a). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Linagem	Pedigree/População de origem	Tipo de Endosperma
L1	BR105	duro
L2	BR105	duro
L3	CMS14	duro
L4	Sintético - BR106	dentado
L5	BR106	dentado
L6	Sintético - BR106	dentado
L7	CMS28	dentado
L8	CMS28	dentado
L9	CMS 455 (Pool 25 QPM ^b)	duro/ QPM
L10	BR105	duro
L11	CMS14	duro
L12	CMS14	duro
L13	BR106	dentado
L14	BR106	dentado
L15	Sintético 14	duro
L16	CMS 455 (Pool 25 QPM)	duro/ QPM
L17	BR106	dentado
L18	CMS 456 (Pool 26 QPM)	dentado/ QPM
L19	CMS 456 (Pool 26 QPM)	dentado/ QPM
L20	BR105	duro
L21	CMS14	duro
L22	CMS12	duro
L23	CMS 453 (Pop 65 YFQPM)	duro/ QPM
L24	CMS03	duro
L25	BR106	dentado
L26	BR105	duro
L27	CMS50	duro
L28	CMS50 x CMS14	duro
L29	BR105	duro
L30	Híbrido comercial	dentado
L31	CMS 455 (Pool 25 QPM)	duro/ QPM
L32	CMS03 x BR105	duro
L33	CMS 453 (Pop 65 YFQPM)	duro/ QPM
L34	BR106	dentado
L35	CMS28	dentado

^a Informações gentilmente cedidas pelos pesquisadores do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

^b QPM (*Quality Protein Maize*): endosperma com alta qualidade protéica.

O DNA estoque foi mantido a -20°C e o DNA diluído, na concentração de trabalho de $10\text{ ng}/\mu\text{L}$, foi armazenado a 4°C .

3.2 Marcadores SSR

3.2.1 Avaliação dos *primers* em agarose

Um total de 213 *primers* SSR foram avaliados nas linhagens L2, L3, L5, L7, L8, L19, L23, L24, L25 e L26, com o objetivo de identificar aqueles mais informativos e com melhor padrão de amplificação.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems), em um volume final de $10\ \mu\text{L}$, contendo 30 ng de DNA, 1,0 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,01% gelatina, 2,0 mM MgCl_2 , 125 μM de cada um dos dNTPs, 0,6 μM de cada um dos *primers* e 1 U da enzima Taq polimerase. Os ciclos da reação de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, nove ciclos de 94°C por 20 s, 68°C por 20 s com a redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 s; seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20 s, 60°C por 20 s e 72°C por 20 s. Finalmente, a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em géis de agarose 4% sob eletroforese a 110 v por 2,5 horas. O gel foi tratado com brometo de etideo (1 mg/mL) e a imagem capturada pelo Eagle-Eye II, sob luz UV. Os géis foram avaliados considerando-se o grau de polimorfismo dos alelos amplificados, a qualidade de amplificação dos fragmentos e a cobertura do genoma do milho.

3.2.2 Otimização da técnica de SSR fluorescente em poliacrilamida

Após a seleção prévia, 25 *primers* foram marcados com fluorescência sendo que os *primers forwards* foram marcados, na extremidade 5', com uma das três diferentes fluorescências: azul (6-FAM), verde (HEX) e amarelo (NED). Apesar de não existirem grandes diferenças nos tamanhos dos alelos amplificados, entre os *primers* SSR, foram escolhidas marcações com fluorescências semelhantes para *primers* que amplificavam fragmentos com diferentes amplitude de tamanhos.

As reações de amplificação foram realizadas isoladamente para cada fluorescência. A primeira tentativa foi para redução das bandas *stutter*, onde foram avaliadas três concentrações de Mg^{++} (1,0 mM; 1,2 mM e 1,5 mM), três temperaturas de anelamento do *primer* na reação de PCR (30 ciclos a 67°C; 9 ciclos a 68°C com redução de 1°C a cada ciclo seguidos de 25 ciclos a 60°C e 30 ciclos a 70°C). Devido a marcação dos *primers* com fluorescência aumentar a sensibilidade e a precisão na detecção dos fragmentos amplificados para os diferentes locos (Schwarz et al., 2000; Mitchell et al., 1997), foram testadas três concentrações de *primers* (0,1 μ M; 0,2 μ M e 0,3 μ M). Os demais parâmetros da reação de amplificação se mantiveram conforme descritos no item 3.2.1, inclusive os ciclos de temperatura e tempo para as etapas de desnaturação e extensão na reação de PCR.

Os produtos finais da reação de PCR, de cada uma das três fluorescências, foram misturados e diluídos separadamente, devido às diferenças nas intensidades das mesmas. As proporções utilizadas foram de 1:50, 1:20 e 1:15 para 6-FAM, HEX e NED, respectivamente. Um volume de 3 μ L da diluição foi misturado com 1,0 μ L de formamida, 0,4 μ L do corante *blue dextran* e 0,1 μ L do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems). As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 3 minutos e mantidas no gelo até sua

aplicação no gel desnaturante de poliacrilamida 5%. Foram aplicados 1,5 µL da amostra desnaturada e os produtos amplificados foram separados por eletroforese a 2000 v durante 3 horas no seqüenciador ABI Prism 377.

As características observadas para a determinação das melhores condições de amplificação e diluição dos produtos da reação de PCR foram o número e a intensidade dos picos detectados nos eletroferogramas pelo programa Genescan 2.1. Para avaliar a repetibilidade do tamanho dos alelos amplificados, após a otimização das condições de amplificação, as reações e as eletroforeses foram repetidas, sendo comparados os tamanhos dos alelos amplificados para os diferentes locos SSR.

Para a obtenção dos *fingerprintings* das 35 linhagens, a reação de amplificação e eletroforese de microssatélites marcados com fluorescência foram realizadas seguindo os protocolos dos melhores resultados obtidos na otimização da técnica.

3.3 Marcadores AFLP

As reações de restrição do DNA com as enzimas *EcoRI* e *MseI* bem como a ligação dos adaptadores foram realizadas utilizando o AFLP Core Reagent Kit (Invitrogen). O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, em um volume final de 25 µL, contendo 250 ng de DNA, 5,0 µL do tampão 5X e 2,5 U das enzimas *EcoRI/MseI*. A reação foi mantida a 37°C por 2 h, transferida para 65°C por 20 minutos e colocada rapidamente no gelo. A ligação dos adaptadores foi realizada segundo as instruções do fabricante, acrescentando à reação de restrição do DNA, 24 µL da solução de ligação dos adaptadores e 1 U da enzima T₄ DNA ligase. A reação foi colocada a 20°C por 2 horas e mantida a 4°C até a amplificação pré seletiva.

A reação de amplificação pré-seletiva foi realizada com 2,0 µL do produto da reação de restrição e ligação diluído dez vezes em TE, 0,5 µL dos *primers* pré-seletivos *EcoRI/MseI* e 7,5 µL do AFLP *core mix* (Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram realizados com uma etapa de desnaturação a 92°C durante 2 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 20 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 minutos, e uma etapa de extensão final a 60°C por 30 minutos.

Os produtos da amplificação pré-seletiva foram diluídos 20 vezes em TE e submetidos às amplificações seletivas, utilizando os *primers EcoRI* e *MseI* com três nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Os *primers EcoRI* foram marcados com os fluorocromos 6-FAM, JOE ou NED e 11 combinações de *primers* foram utilizadas: *EcoRI-ACT/MseI-CAA*, *EcoRI-AGG/MseI-CAA*, *EcoRI-AGC/MseI-CAA*, *EcoRI-ACA/MseI-CTC*, *EcoRI-AGG/MseI-CTC*, *EcoRI-AAC/MseI-CTC*, *EcoRI-ACA/MseI-CTA*, *EcoRI-AAC/MseI-CTA*, *EcoRI-ACA/MseI-CAC*, *EcoRI-AAC/MseI-CAC* e *EcoRI-ACA/MseI-CAT*.

A reação de amplificação seletiva foi realizada utilizando 2,0 µL do produto de PCR da pré-seletiva diluído 1:20, 1,0 µL do tampão PCR 10X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 U Taq polimerase, 0,5 µM do *primer MseI*, 0,05 µM de cada um dos três *primers EcoRI* marcados com as diferentes fluorescências. O perfil de amplificação foi realizado com 10 ciclos a 94°C por 20 s, 66°C por 30 s com redução de 1°C a cada ciclo, 72°C por 2 minutos, seguidos de 20 ciclos a 94°C por 20 s, 56°C por 30 s, 72°C por 2 minutos e uma etapa de extensão final de 60°C por 30 minutos. A 3 µL do produto da amplificação seletiva foram acrescentados 1,5 µL da mistura contendo formamida, *blue dextran* e 0,25 µL do peso molecular GS-500 ROX (Applied Biosystems), procedendo-se a desnaturação a 95°C por 3 minutos. No gel de poliacrilamida 5% desnaturante foram carregados 1,5 µL da amostra

desnaturada e os fragmentos de AFLP foram resolvidos no seqüenciador ABI Prism 377 sob eletroforese a 1680 v por 7 h.

3.4 Análise dos dados obtidos pelas técnicas de SSR e AFLP

Os polimorfismos foram avaliados manualmente para os géis de agarose, e com auxílio dos programas Genescan 2.1 e Genotyper 2.0, para a identificação dos alelos amplificados com *primers* fluorescentes. A partir dos dados tabulados foi possível calcular a freqüência (p_i) de cada alelo (i) para cada um dos locos, sendo a ausência da banda, identificada por 0 e a sua presença, por 1. As freqüências alélicas foram utilizadas para avaliar o conteúdo de informação do loco (Weir, 1996), calculando-se o índice de diversidade genética ou PIC (*Polymorphic Information Content*), probabilidade de identidade e poder de exclusão, segundo as fórmulas:

$$PIC = 1 - \sum (p_i)^2$$

$$\text{Probabilidade de Identidade (I)} = 1 - \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

O valor da probabilidade de identidade combinado foi obtido pela multiplicação dos valores de I encontrados para cada loco.

$$\text{Probabilidade de Exclusão (Q)} = 1 - 4a_2 + 2a_2^2 + 4a_3 - 3a_4 \quad , \text{ onde:}$$

$$a_k = \sum_{i=1}^n p_i^k$$

p_i e p_j são as freqüências do i -ésimo e j -ésimo alelo para as 35 linhagens.

A probabilidade de exclusão combinada (Q_c) para l locos, foi calculada da seguinte forma:

$$Q_c = 1 - \prod_i (1 - Q_i)$$

Para a comparação dos dados obtidos pelos marcadores SSR e AFLP foram calculados os valores de PIC e o índice de marca (IM), de acordo com Powell et al. (1996) citados por Bohn et al. (1999) e Prasad et al. (2000), onde $IM = (PIC \times \text{proporção de bandas polimórficas} \times \text{número de locos observados por combinação de primer})$. Para o AFLP, cada fragmento de DNA foi considerado como um loco independente no genoma do milho.

Para verificar a correlação entre os dados do AFLP e do SSR, o programa Statistica versão 4.3 foi utilizado, onde se determinou o coeficiente de correlação de Pearson (r). Esse foi obtido para as matrizes de dissimilaridades do AFLP e do SSR, bem como para a combinação dos valores médios das matrizes de dissimilaridades obtidas para as duas classes de marcadores.

Simulações realizadas pelo programa GQMol (Universidade Federal de Viçosa) permitiram verificar se o número de marcadores testados foi suficiente para caracterizar as relações genéticas entre as linhagens. Nesse procedimento, a simulação foi feita analisando a correlação entre 10 matrizes de dissimilaridade geradas a partir dos dados moleculares, utilizando inicialmente 20 marcadores aleatórios, com um incremento gradual de 20 marcadores até se atingir o total de marcas obtidas em cada uma das técnicas.

A análise de marcadores SSR foi realizada por meio da construção das matrizes considerando os dados como i) binários, onde o valor 1 (um) foi atribuído para a presença do alelo e o valor 0 (zero) para a sua ausência; ii) co-dominantes, obtendo-se uma matriz de 0 (ausência do alelo), 1 (loco em heterozigose) e 2 (loco em homozigose). Para os marcadores AFLP, foi construída uma matriz binária a partir da presença e ausência dos fragmentos polimórficos.

A partir das matrizes binárias dos dados moleculares foi calculado o coeficiente de similaridade entre as 35 linhagens utilizando os coeficientes de Nei e Li e de Jaccard, para os marcadores AFLP e SSR (Dias, 1998), seguindo as fórmulas:

$$\text{Jaccard: } S_{ij} = \frac{a}{a+b+c} \quad \text{e} \quad \text{Nei e Li: } S_{ij} = \frac{2a}{2a+b+c}, \text{ onde}$$

a = presença da banda nos indivíduos *i e j*;

b = presença da banda no indivíduo *i* e ausência no indivíduo *j*;

c = ausência da banda no indivíduo *i* e presença no indivíduo *j*.

O índice de similaridade considerando os marcadores SSR como co-dominantes, foi calculado da seguinte maneira:

$$S_{ij} = \frac{\text{proporção dos alelos compartilhados somada para todos os locos}}{2 \times n^{\circ} \text{ locos avaliados}}$$

O agrupamento das linhagens, utilizando o complemento dos índices de similaridade (1 - índice de similaridade) foi realizado pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*), utilizando o programa Statistica versão 4.3. As análises de componentes principais e de correlação entre as matrizes de dissimilaridades genéticas, geradas pelos diferentes tipos de marcadores também foram realizadas utilizando o programa Statistica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Marcadores SSR em gel de agarose

Por meio dos 213 *primers* analisados em gel de agarose foi amostrado de maneira ampla o genoma do milho, gerando um total de 869 alelos para as dez linhagens consideradas. Desses, 31 *primers* não amplificaram alelos para um ou mais indivíduos e 16 deles não apresentaram polimorfismo entre as linhagens. O valor médio do PIC, que reflete o conteúdo de informação do loco em função das características de co-dominância e de multialelismo, foi de 0,62 variando entre 0,11 e 0,88. Esses valores se assemelharam àqueles observados para 90 linhagens temperadas de milho avaliadas com 70 *primers* SSR, onde o PIC médio foi de 0,59, variando numa faixa de 0,17 a 0,92 (Senior et al., 1998).

4.2 Marcadores SSR semi-automatizados

Dos 213 *primers* analisados em gel de agarose, 25 foram selecionados em função do seu conteúdo informativo, da resolução dos fragmentos e da distribuição dos marcadores ao longo dos 10 cromossomos do milho. Os *primers* selecionados, suas respectivas posições no genoma, amplitude alélica e temperatura de anelamento na reação de PCR estão apresentados na Tabela 2, sendo que as seqüências dos *primers* estão publicamente disponíveis (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>).

Os alelos amplificados apresentaram tamanho entre 72 e 424 pares de base, sendo que apenas dois *primers* tiveram alelos maiores que 300 pares de base. A sobreposição da faixa de amplificação dos alelos, limitou a combinação

TABELA 2. Locos SSR utilizados para caracterização de 35 linhagens de milho e suas respectivas localizações, fluorescências, amplitudes alélicas e condições ótimas de temperatura de anelamento. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

<i>Primer</i>	Bin	Marcação	Amplitude alélica (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
bnlg182	1.03	6-FAM	86-400	68 ^a
bnlg1811	1.04	HEX	171-262	68 ^a
umc2025	1.05	6-FAM	123-138	67
mmc041	1.08	HEX	158-189	68 ^a
bnlg125	2.02	HEX	312-424	68 ^a
bnlg1045 ⁿ	2.07	6-FAM	114-193	68 ^a
dup24	2.08	NED	103-168	68 ^a
phi053	3.05	NED	176-194	67
bnlg2241	3.06	6-FAM	192-242	68 ^a
phi026	4.05	NED	78-135	68 ^a
bnlg589	4.11	6-FAM	151-252	67
bnlg1006	5.00	HEX	168-255	67
bnlg105	5.02	NED	72-104	68 ^a
bnlg1208	5.03	6-FAM	97-120	67
bnlg161	6.00	HEX	122-183	68 ^a
umc1653	6.07	HEX	93-221	67
umc1016	7.02	6-FAM	92-161	68 ^a
phi116	7.06	6-FAM	151-173	67
bnlg1863 ⁿ	8.04	HEX	117-192	68 ^a
bnlg1724	9.00	NED	97-143	68 ^a
phi028	9.01	HEX	72-78	67
umc1366 ⁿ	9.06	6-FAM	100-122	67
phi041 ⁿ	10.00	HEX	197-205	67
phi063 ⁿ	10.02	NED	156-216	67
bnlg594 ⁿ	10.06	NED	171-265	68 ^a

^a Temperatura de anelamento do *primer* a 68°C com redução de 1°C por ciclo durante 9 ciclos e 25 ciclos a 60°C.

ⁿ Loco com alelo nulo.

dos *primers* em reações *multiplex*, reduzindo as possibilidades para análise de vários locos simultaneamente nos géis.

Com relação à otimização da temperatura de anelamento dos *primers*, não foi possível adaptar uma única condição para todos os *primers* marcados, de forma que, 11 deles foram amplificados a 67°C por 20 s e 14 deles apresentaram melhor amplificação a 68°C por 20 s com redução de 1°C/ ciclo durante 9 ciclos, seguidos por 25 ciclos a 60°C por 20 s (Tabela 2). A concentração final de MgCl₂ utilizada na reação com *primers* fluorescentes foi de 1,5 mM, semelhante às utilizadas por Kirst (1999), Diwan & Cregan (1997) e Mitchell et al. (1997). Concentrações mais baixas de magnésio foram testadas objetivando uma redução no número de bandas *stutter*, o que não foi conseguido. Por outro lado, na concentração de 1,0 mM de MgCl₂ os alelos apresentaram uma inconsistência de amplificação refletida pela menor intensidade das bandas.

Em relação às concentrações dos *primers*, não houve interferência no tamanho dos alelos amplificados, embora os perfis dos fragmentos tenham sido mais consistentes nas concentrações de 0,2 µM e 0,3 µM (Figura 1). Assim, optou-se por utilizar o *primer* na concentração de 0,2 µM nas reações de PCR. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos em que as concentrações variaram de 0,12 a 0,4 µM, dependendo da fluorescência do *primer* (Kirst, 1999; Diwan & Cregan, 1997).

Variações médias para o tamanho dos alelos avaliadas em dois géis para os locos bnlg2241, bnlg105, mmc041, bnlg1006, bnlg589 e bnlg161, ficaram entre 0,07 e 0,18 (Tabela 3), sendo o valor máximo inferior a 0,5 nucleotídeo. Esses valores estão dentro dos limites de precisão fornecidos para o marcador de peso molecular GS-500 ROX. Mitchell et al. (1997) também consideraram como uma avaliação inequívoca dos tamanhos de alelos para análises de genotipagem, valores iguais ou inferiores a 0,5 nucleotídeo para o mesmo

fragmento avaliado em diferentes géis. Para a genotipagem de *Brassica* spp., os autores encontraram diferença máxima de 0,46 nucleotídeos entre géis.

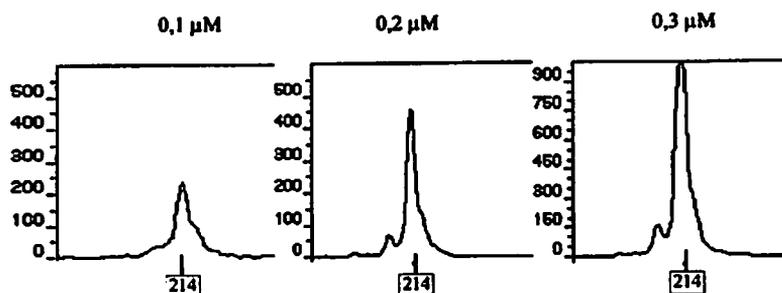


FIGURA 1. Eletroferograma do padrão de amplificação de um alelo de 214 pares de base, em três concentrações do *primer* bnlg381 (0,1, 0,2 e 0,3 μ M). O eixo vertical indica a intensidade de fluorescência e o eixo horizontal o tamanho do alelo, em pares de base, analisadas pelo programa GeneScan. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

TABELA 3. Diferenças entre duas repetições dos géis para seis locos SSR avaliados em 35 linhagens de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	Diferença Máxima (nucleotídeo)	Diferença Média (nucleotídeo)	Desvio Padrão
bnlg2241	0,49	0,18	0,15
bnlg105	0,42	0,10	0,10
mmc041	0,33	0,08	0,08
bnlg1006	0,30	0,08	0,08
bnlg589	0,33	0,07	0,07
bnlg161	0,50	0,08	0,02

4.3 Utilização de marcadores SSR para a diferenciação de linhagens

Para o loco phi041 não foi observada heterozigose nos materiais genéticos e, apenas as L3 e L16 não apresentaram locos em heterozigose (Tabela 4). A heterozigosidade residual foi elevada nas linhagens L22, L32 e L34 que, dos 25 locos avaliados, dez, oito e sete locos encontravam-se em heterozigose, respectivamente. A L22 é uma linhagem antiga, envolvida no programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, que foi multiplicada por ciclos de autofecundação em *bulks*, onde eram utilizadas sementes advindas de uma mistura de indivíduos com características semelhantes ao padrão da linhagem, intercalada com SIB, onde eram feitos cruzamentos planta a planta (S.N. Parentoni, comunicação pessoal). A heterozigosidade residual sugere que, havendo interesse do programa, tais linhagens podem ser submetidas a um avanço na geração de autofecundação a partir de indivíduos únicos que apresentem níveis elevados de homozigose nos locos SSR avaliados, garantindo uma maior endogamia das linhagens. Senior et al. (1998), comentam que contaminação ou amplificação de seqüências similares em duas regiões genômicas distintas, também podem levar à amplificação de mais de um loco por *primer*.

TABELA 4. Locos SSR em heterozigose observados em 35 linhagens elite de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Linhagens	Locos em heterozigose
L1	bnlg161, bnlg1724
L2	umc1653
L3	-
L4	phi116
L5	phi026, umc1653, bnlg105
L6	umc2025, bnl1863, phi053
L7	bnlg161, bnlg1724, bnlg1208
L8	phi116, umc1366, bnlg125, bnlg1863
L9	phi026, bnlg105
L10	umc2025, bnlg1045, bnlg105
L11	phi1116, dup24, umc1366, umc1016, bnlg1724
L12	umc1366
L13	bnlg589
L14	umc1016
L15	phi116, bnlg589, bnlg105, bnlg1724
L16	-
L17	bnlg161, bnlg1045, bnlg125, bnlg1863
L18	phi116, bnlg1811, bnlg1006, bnlg125
L19	bnlg125
L20	bnlg1006, bnlg105
L21	phi026
L22	phi026, bnlg1811, bnlg182, bnlg589, umc1366, bnlg161, bnlg125, bnlg2241, mmc041, phi053
L23	phi026, umc1366
L24	phi116, umc2025, mmc041, bnlg1863
L25	bnlg1045, bnlg1863
L26	phi028, bnlg105, bnlg1863
L27	phi026
L28	bnlg182, umc1366
L29	umc1016
L30	phi063, umc1653, bnlg105
L31	phi026, bnlg182, bnlg105, umc1366
L32	phi116, umc1016, bnlg1045, bnlg125, bnlg2241, mmc041, bnlg105, bnlg1724
L33	phi116, bnlg589, bnlg125, bnlg1863
L34	phi026, umc1653, umc2025, bnlg1811, bnlg182, bnlg589, bnlg594, bnlg125
L35	phi026, bnlg1811, bnlg182, bnlg1006, phi028, bnlg1208, phi053

Para os 25 locos avaliados nas 35 linhagens, foram obtidos 293 alelos, variando de três (umc1366 e phi028) a 25 (bnlg125), com uma média de 12 alelos amplificados por loco, sendo que seis locos apresentaram alelos nulos (Tabela 5). O índice de diversidade para cada loco variou de 0,28 a 0,93 com média igual a 0,76. Esses valores foram superiores aos obtidos por Smith et al. (1997) que utilizaram 131 *primers* marcados com fluorescência em 58 linhagens e quatro híbridos de milho e encontraram valor médio de PIC igual a 0,62, com uma variação de 0,06 a 0,91. É possível que exista uma maior diversidade genética entre as linhagens elite tropicais quando comparadas com os materiais genéticos de origem temperada avaliados por Smith et al. (1997), que embora tenha sido avaliado um menor número de materiais genéticos, os mesmos apresentaram diferentes pedigrees, tipos de endosperma e características de qualidade protéica das sementes. Adicionalmente, uma elevada proporção dos alelos foram considerados raros na população de 35 linhagens, onde 75% apresentaram frequência alélica inferior a 0,10 e 46% de todos os alelos tiveram frequência igual a 0,03 (Figura 2). A abundância de alelos com baixa frequência contribui para aumentar os valores da diversidade dos locos (Elsik et al., 2000). Para materiais temperados, Senior et al. (1998) observaram que, de 365 alelos detectados para os SSR em gel de agarose, 70,4% ocorreram à uma frequência inferior a 0,25. O fato de terem sido selecionados rigorosamente os *primers* mais informativos também pode ter contribuído para o elevado valor médio de PIC.

TABELA 5. Características dos 25 locos SSR em 35 linhagens de milho com relação ao número de nucleotídeos repetidos, número de alelos amplificados por loco, diversidade genética (PIC), probabilidade de identidade (I) e probabilidade de exclusão (Q). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

<i>Primer</i>	Repetição	Nº de alelos	PIC	I	Q
dup24	(GA) ₁₆	19	0,9314	0,0016	0,7550
bnlg1006	(AG) ₂₀	23	0,9184	0,0019	0,7600
bnlg125	?	25	0,9110	0,0023	0,6926
bnlg1045 ⁿ	(AG) ₂₃	15	0,8882	0,0037	0,6302
bnlg1863 ⁿ	(AG) ₁₅	17	0,8857	0,0046	0,6178
bnlg1811	(AG) ₁₆	15	0,8816	0,0055	0,6111
umc1016	(CT) ₂₅	19	0,8767	0,0058	0,6112
phi026	(CT)	16	0,8498	0,0092	0,5304
bnlg182	?	16	0,8400	0,0116	0,5263
bnlg161	?	12	0,8212	0,0147	0,4760
bnlg2241	(AG) ₂₆	9	0,8180	0,0221	0,4610
umc1653	(GAAA) ₂₄	10	0,7959	0,0267	0,4211
bnlg594 ⁿ	?	12	0,7780	0,0326	0,4219
mmc041	(CA) ₁₂	12	0,7665	0,0237	0,3832
bnlg105	?	13	0,7518	0,0247	0,3405
bnlg589	?	12	0,7306	0,0381	0,3297
phi063 ⁿ	(TATC)	5	0,7241	0,0330	0,3088
phi053	(ATAC)	7	0,7061	0,0407	0,2816
phi041 ⁿ	(AGCC)	5	0,7102	0,0520	0,2949
bnlg1208	(AG) ₁₀	9	0,6294	0,1184	0,2440
phi116	(ACTG/ACG)	7	0,6645	0,1246	0,2081
umc1366 ⁿ	(TCC) ₄	3	0,5853	0,1709	0,1223
phi028	(GAA)	3	0,6008	0,2096	0,1605
bnlg1724	(AG) ₃₁	7	0,4759	0,1973	0,1047
umc2025	(AGCT) ₄	4	0,4392	0,4694	0,0995
Valores médios		12	0,7592	0,0655	0,4157

ⁿ Loco com alelos nulos.

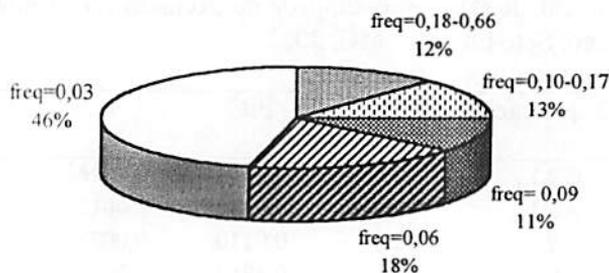


FIGURA 2. Distribuição da frequência alélica observada para os 293 alelos amplificados pelos 25 *primers* SSR em 35 linhagens de milho tropical do programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Para Rongwen et al. (1995), microssatélites com repetições de três nucleotídeos são preferíveis àqueles com dois nucleotídeos, uma vez que produzem menor número de bandas fantasmas, conferindo uma maior precisão na identificação dos alelos. Chin et al. (1996), Smith et al. (1998) e Testolin (2000) também afirmaram que as bandas fantasmas são mais frequentes nos microssatélites di-nucleotídeos, afetando a precisão do processo de genotipagem, embora tais locos SSR apresentem maiores conteúdos de informação genética. De forma semelhante, os microssatélites com dois nucleotídeos, avaliados no presente trabalho, apresentaram uma média de 15 alelos amplificados por loco, com PIC médio de 0,81, superando os valores médios de quando foram considerados todos os locos. As bandas fantasmas foram mais frequentes nos microssatélites di-nucleotídeos, principalmente pelo fato do sistema semi-automatizado ser mais sensível do que o de agarose, detectando mais frequentemente tais características nos fragmentos amplificados. Para os *primers* com esse padrão de amplificação, as bandas fantasmas dificultaram a extração

automática dos dados, mas a inspeção visual dos géis e dos eletroferogramas possibilitou a confirmação do tamanho exato dos alelos. No eletroferograma da Figura 3, pode-se observar a diferença do padrão dos alelos do loco phi063, com repetição de quatro nucleotídeos (TATC), e do loco phi026, em heterozigose e com repetição di-nucleotídeo (CT), amplificados na linhagem L5. Apesar das bandas fantasmas, representadas na Figura 3 pelo maior número de picos do loco phi026, o alelo de interesse é identificado como o pico de maior intensidade, facilitando sua caracterização em relação aos picos das bandas *stutter*.



FIGURA 3. Padrão de amplificação dos locos phi026 (di-nucleotídeo) e phi063 (tetra-nucleotídeo). Os picos preenchidos referem-se aos alelos de interesse. O eixo vertical representa a intensidade de fluorescência. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Assim como houve uma grande variação para os valores de PIC entre os locos, a probabilidade de identidade também foi variável, refletindo a ampla faixa de frequências alélicas. Os valores de probabilidade de identidade variaram de 0,0016 a 0,469, com valor médio de 0,0655 (Tabela 5). O poder de exclusão, expresso em termos de força da frequência alélica para os locos dup24, bnlgl006, bnlgl125, bnlgl1045, bnlgl1863, bnlgl1811 e umc1016 foi superior a 60%.

O elevado nível de polimorfismo dos marcadores SSR permitiu a completa diferenciação das 35 linhagens utilizando-se apenas dois *primers* (dup24 e bnlgl006), com uma probabilidade de identidade (I) combinada na ordem de 10^{-6} . Isso significa que, para a população envolvida nesse estudo, existe uma probabilidade inferior a 10^{-6} de serem encontrados dois indivíduos com os genótipos idênticos utilizando os dois locos. De maneira complementar, a probabilidade combinada de exclusão (Q) dos dois locos considerados é de 0,94, indicando 94% de probabilidade desses locos em detectar a não existência de uma relação de parentesco entre os 35 genótipos estudados. A força discriminatória dos locos dup24 e bnlgl006 foi maior quando comparada, por exemplo, a quatro locos utilizados para a discriminação de 24 cultivares elites de cevada que puderam ser diferenciadas com uma probabilidade de identidade de 1 em 100 (Russel et al., 1997). Em *Eucalyptus*, Kirst (1999) observou em dois conjuntos com três locos SSR avaliados em sistema *multiplex*, os valores de probabilidade de identidade e poder de exclusão de 10^{-6} e 0,99. Em 94 linhagens de milho avaliadas por Senior et al. (1998), cinco locos SSR foram suficientes para a definição de *fingerprintings* únicos para as mesmas.

Considerando-se os valores de PIC, I e Q, a amplitude alélica e as marcações dos *primers* estudados, definiu-se uma combinação de seis *primers* passíveis de serem avaliados em um único gel (Tabela 6). Tal combinação apresentou valor de PIC igual a 0,86, com um poder de exclusão combinado de 0,9973 e uma probabilidade de identidade combinada de 10^{-14} para a diferenciação das 35 linhagens de milho. Assim, existe uma probabilidade de 10^{-14} de se ter um mesmo genótipo em cada dois indivíduos dentro da população considerada.

TABELA 6. Combinação de seis locos SSR marcados com fluorescência com diferentes amplitudes alélicas que podem ser utilizados em uma única linha do gel. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Loco	Nº de alelos	Amplitude alélica (pb)	Marcação	PIC	I ^a	Q ^b
umc1016	19	92-161	6-FAM	0,8763	0,0058	0,6112
bnlg2241	9	192-242	6-FAM	0,8109	0,0221	0,4610
bnlg1006	23	168-255	HEX	0,9320	0,0011	0,7600
bnlg125	25	312-424	HEX	0,9104	0,0023	0,6926
dup24	19	103-168	NED	0,9309	0,0016	0,7550
phi053	7	176-194	NED	0,7025	0,0407	0,2816
PIC médio				0,8605		
Probabilidade de Identidade combinada					10 ⁻¹⁴	
Poder de Exclusão combinado						0,9973

^aProbabilidade de identidade

^bProbabilidade de exclusão

4.4 Marcadores AFLP

A combinação de 11 *primers EcoRI/MseI* gerou um total de 260 fragmentos, sendo 158 polimórficos, com uma média de 14 bandas polimórficas por combinação de *primer*. Os *primers EcoRI-AGG* e *EcoRI-ACA* combinados ao *MseI-CTC* apresentaram o maior número de bandas polimórficas, 23 e 21 (Tabela 7). Apesar de combinações de *primers EcoRI/MseI* apresentarem menor grau de polimorfismo e menor número de fragmentos resolvidos em um gel quando comparadas a combinações *PstI/MseI* (Vuylsteke et al., 1999), o nível de polimorfismo encontrado no presente trabalho foi elevado, em média 60%. Essa característica associada à variabilidade entre os materiais genéticos utilizados e o grande número de locos avaliados pela técnica AFLP, permitiram que as combinações dos *primers EcoRI-AGG* e *EcoRI-ACA* com o *MseI-CTC* fossem suficientes para diferenciar todas as linhagens. Resultados demonstrando o poder

discriminatório do AFLP também foram observados para 27 genótipos de grama (*Cynodon* spp.) que, apesar de serem semelhantes morfológicamente, foram diferenciadas com um único par de *primers* AFLP (Zhang et al., 1999).

Tabela 7. Combinação de *primers* seletivos *EcoRI*/*MseI* e seus produtos de amplificação totais e polimórficos. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Nucleotídeos seletivos		Amplitude dos fragmentos (pb)	Bandas totais	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>				
ACT	CAA	88-387	25	14	56,0
AGG	CAA	77-431	20	10	50,0
AGC	CAA	134-485	20	11	55,0
ACA	CTC	80-485	31	21	67,7
AGG	CTC	67-493	29	23	79,3
AAC	CTC	96-382	23	11	47,8
ACA	CTA	97-456	28	15	53,6
AAC	CTA	98-321	20	12	60,0
ACA	CAC	71-232	22	12	54,5
AAC	CAC	93-277	16	11	68,7
ACA	CAT	95-226	26	18	68,2
Média			24	14	60,0
Total			260	158	

As combinações de *primers* *EcoRI*-ACA/*MseI*-CAC, *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAC e *EcoRI*-ACA/*MseI*-CAT permitiram a amplificação de fragmentos numa faixa inferior a 300 pares de base, o que poderia indicar uma baixa eficiência dessas combinações para a amplificação de fragmentos em reações *multiplex* (Tabela 7). No entanto, por meio de testes preliminares realizados para três combinações de *primers* *EcoRI*-ACA, *EcoRI*-ACG e *EcoRI*-AAC com *MseI*-CAT, não foi detectado nenhum comprometimento da eficiência de amplificação utilizando simultaneamente os três *primers* em uma única reação de PCR. Tal fato também não foi observado por Scharwz et al. (2000) quando avaliaram para

30 combinações de *primers* em reações *multiplex*, em cevada. Características inerentes aos *primers* utilizados podem justificar a menor amplitude de tamanho dos fragmentos para as combinações acima, já que cada combinação de *primer* apresenta um perfil de amplificação variável.

4.5 Comparação entre marcadores AFLP e SSR

A técnica de AFLP utilizando diferentes *primers* fluorescentes em uma mesma reação permitiu a obtenção de fragmentos com alta resolução nos géis, além de reduzir o tempo e o gasto com reagentes (Figura 4). Como também observado por Schwarz et al. (2000), não foi possível balancear as diferenças de intensidades das cores utilizadas na marcação dos *primers*, o que normalmente pode ser realizado quando as amplificações são feitas separadamente. A extração automática para os dados de AFLP não foi possível e a obtenção da matriz binária foi feita manualmente, o que demandou muito tempo para a avaliação dos dados. Assim, as características de geração de dados em alta escala e de elevada sensibilidade de detecção dos fragmentos marcados com fluorescência pela técnica de AFLP foram prejudicadas pela ausência de um sistema eficiente para análise automática dos dados. Para os marcadores SSR, não foi otimizada reação *multiplex* mas a velocidade na obtenção dos dados pôde ser aumentada combinando *primers* que amplificaram alelos com diferentes faixas de tamanho (Figura 5).

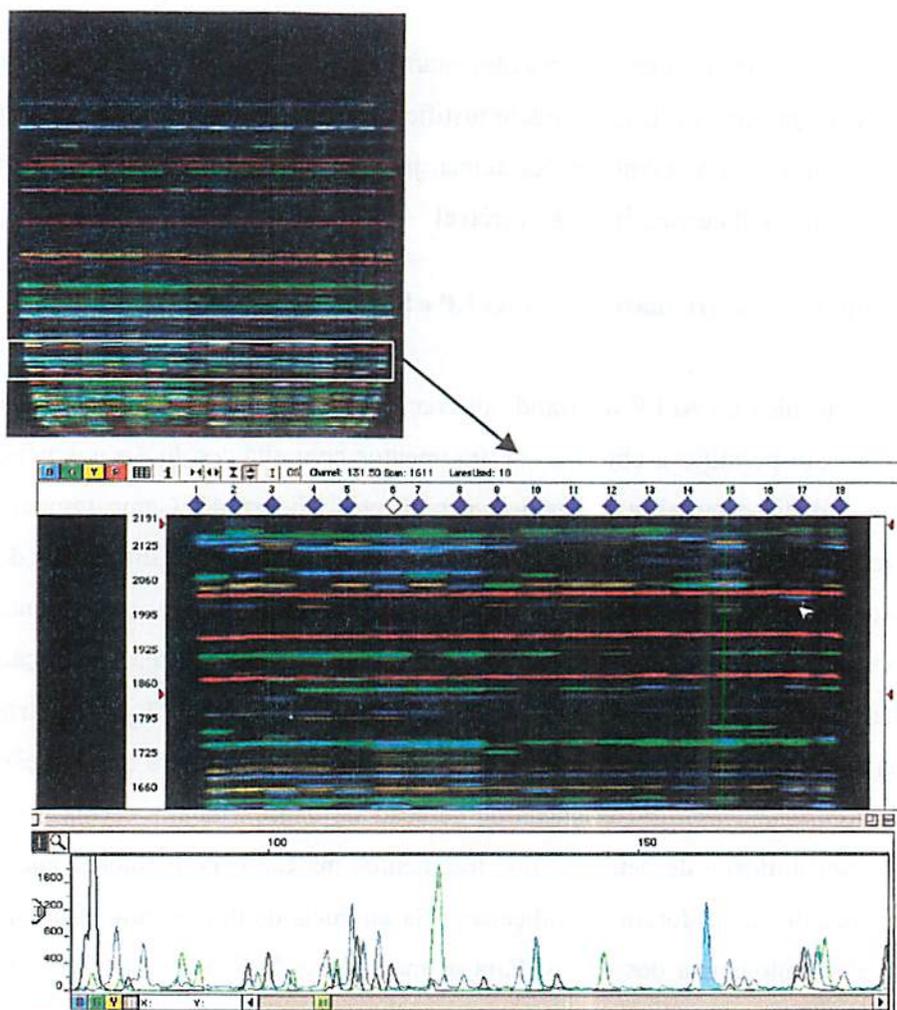


FIGURA 4. Padrão de bandas AFLP obtido para a reação *multiplex* utilizando as combinações de *primers* *EcoRI*-ACA/ *MseI*-CTC (azul), *EcoRI*-AGG/ *MseI*-CTC (verde) e *EcoRI*-AAC/ *MseI*-CTC (amarelo), juntamente com o eletroferograma de uma linhagem. A banda indicada pela seta no gel está representada no eletroferograma pelo pico preenchido em azul. Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas, MG, 2002.

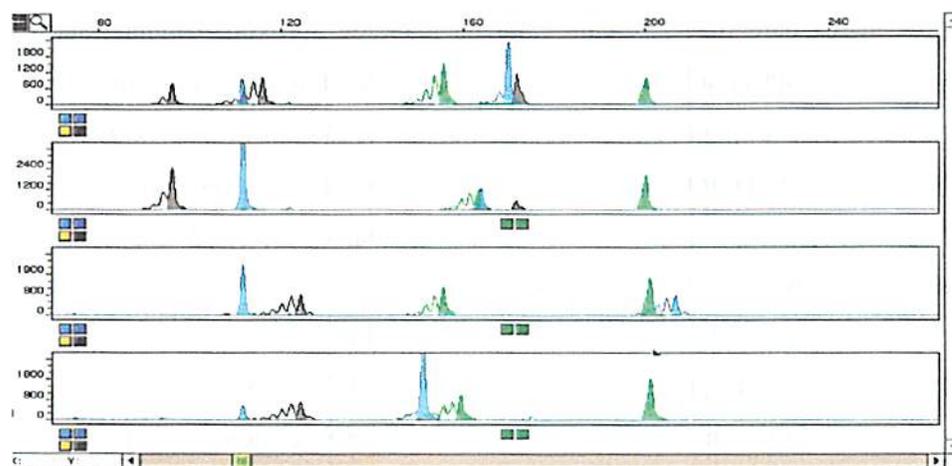
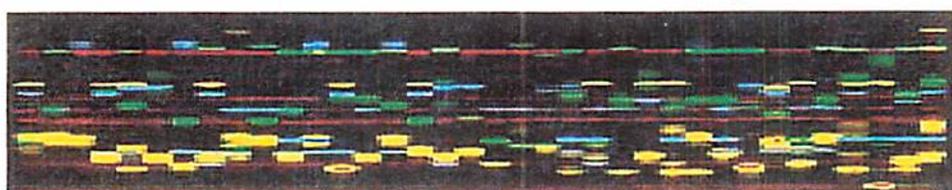
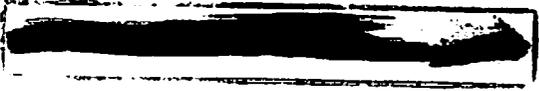


FIGURA 5. Padrão dos alelos SSRs obtidos para os locos umc1366 (azul, 100-122 pb), bnl863 (verde, 117-192 pb), phi041 (verde, 197-205 pb) e phi063 (amarelo, 156-216 pb), combinados em uma mesma canaleta do gel e amplificados para 35 linhagens de milho. Os eletroferogramas mostram os perfis dos alelos em quatro linhagens com seus tamanhos, em pb, apresentados no eixo superior horizontal do primeiro eletroferograma. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, 2002.



Como pode ser verificado na Tabela 8, em termos de rendimento de amplificação dos fragmentos por unidade de teste, pela técnica de AFLP observou-se o dobro do número de bandas por combinação de *primer* (23,6) quando comparado aos SSR (11,7). A maior eficiência dos marcadores AFLP se deve à detecção simultânea de várias bandas polimórficas em uma única reação de amplificação (Pejic et al., 1998). Esse maior rendimento refletiu num maior índice de marca para o AFLP, cujo valor de 5,59 foi, aproximadamente, sete vezes superior ao observado para os SSR (0,76). Outro fator que contribuiu para os valores observados no índice de marca, foi o fato do AFLP explorar simultaneamente os polimorfismos de restrição e de amplificação, onde cada combinação de *primer* amplifica vários locos, enquanto cada *primer* SSR amplifica os vários alelos de um único loco.

Por outro lado, o conteúdo informativo de polimorfismo dos locos (PIC) foi superior para o SSR quando comparado com o AFLP, sendo de 0,76 e 0,39. O valor de PIC leva em consideração, tanto o número de alelos quanto suas frequências (Weir, 1996). Como já mostrado no item 4.3, 75% de todos os alelos amplificados para os locos SSR apresentaram frequência inferior a 0,10, o que contribuiu para os valores de PIC observados. Os dados do presente estudo concordam com os resultados de Pejic et al. (1998), uma vez que estes obtiveram valores de PIC para SSR de 0,72 e de 0,34 para marcadores AFLP em milho. Já para o trigo, Bohn et al. (1999) obtiveram valores de PIC para marcadores SSR e AFLP praticamente semelhantes, 0,32 e 0,30.

Assim, pode-se dizer que, pelos valores de PIC os marcadores SSR foram mais informativos ao detectar diferentes alelos por loco e, pelo índice de marca, os marcadores AFLP foram mais eficientes em termos de rendimento de dados por combinação de *primers*. No entanto, o rendimento dos SSR pode ser incrementado com a utilização de reações *multiplex* como estudado em *Brassicac*s spp. (Mitchel et al., 1997) e em *Eucalyptus* spp. (Kirst, 1999) ou pela

combinação, em uma única linha do gel, de *primers* com amplitudes alélicas e marcações de fluorescência diferentes. Essa possibilidade de incremento da rapidez na geração de dados associada às características de maior conteúdo de informação de polimorfismo dos SSR faz com que esses marcadores sejam mais apropriados que os AFLP para a caracterização de cultivares em um processo de proteção intelectual.

TABELA 8. Comparações entre marcadores AFLP e SSR obtidas a partir do padrão de amplificação dos fragmentos para 35 linhagens elite de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	<i>Primers</i>	Nº total de bandas	Nº de bandas/ <i>primer</i>	Proporção de bandas polimórficas	Nº de bandas polimórficas/ <i>primer</i>	Nº de locos/ <i>primer</i> ^a	PIC ^b	IM ^c
AFLP	11	260	23,6	0,60	14,4	23,6	0,39	5,59
SSR	25	293	11,7	1,00	11,7	1	0,76	0,76

^aCada banda AFLP detectada foi considerada um loco amostrado no genoma do milho

^bPIC = Conteúdo informação de polimorfismo

^cIM = Índice de Marca (Proporção de bandas polimórficas x número locos por *primer* x PIC)

Aspectos técnicos devem também ser considerados ao comparar os marcadores AFLP e SSR. A técnica SSR é caracterizada pela simplicidade e, após a etapa de extração do DNA é necessária apenas a realização da PCR e eletroforese dos fragmentos. Além dessas etapas, o AFLP ainda engloba a restrição do DNA, ligação dos adaptadores e amplificação pré-seletiva. A maior complexidade da técnica de AFLP está também associada ao maior custo por análise. Para as 35 linhagens, considerando as etapas envolvidas na amplificação e eletroforese dos fragmentos obtidos com três combinações de *primers* para o

AFLP e seis para o SSR, o custo aproximado para uma análise de AFLP seria R\$ 4,59 e R\$ 0,13 para o SSR. Ao levarmos em conta o índice de marca de 5,59 para o AFLP e 0,76 para os SSR, o custo por marca para o AFLP fica em torno de 0,82 e o do SSR em torno de 0,17. Mesmo com um maior rendimento, a banda obtida pela técnica AFLP é quase cinco vezes mais cara que a banda SSR, além de ser menos informativa devido à característica dominante do marcador obtido. Dessa forma, também com relação aos aspectos técnicos e de custo, os marcadores SSR podem ser considerados mais vantajosos comparados aos AFLP.

4.6 Número ótimo de marcas e correlações entre AFLP e SSR

Na literatura, vários índices têm sido utilizados para o cálculo das distâncias genéticas, considerando os dados obtidos pelos marcadores SSR como binários (Pejic et al., 1998; Smith et al., 1997; Bohn et al., 1999) ou co-dominantes (Diwan & Cregan, 1997). No presente trabalho, foi observada alta correlação, $r = 0,99$, entre as duas maneiras de cálculo dos coeficientes, quando os dados de SSR foram avaliados como binários utilizando o coeficiente de Nei e Li ou, quando os dados foram interpretados como co-dominantes e a dissimilaridade genética foi calculada com o algoritmo proposto pelo programa GQMol (Figura 6). Para o agrupamento das linhagens (Figuras 10 e 1B no Anexo), também não foram observadas diferenças significativas para as duas formas de cálculo dos coeficientes de dissimilaridade, indicando que ambas foram coerentes na avaliação da divergência genética entre os materiais estudados. Os valores mínimo, médio e máximo para a distância genética entre duas linhagens foram aproximadamente os mesmos para ambos os coeficientes. A análise conjunta dos dados de AFLP e SSR foi realizada considerando ambos os marcadores como binários. Vale ressaltar que os dados binários, tanto para o

AFLP quanto para os SSR, foram analisados com os índices de Jaccard e de Nei e Li, não havendo alterações na formação dos grupos quando a análise foi realizada utilizando-se qualquer um dos índices. No entanto, a ordem na disposição dos grupos no dendograma ficou melhor visualizada com o índice de Jaccard para o AFLP e com o índice Nei e Li para o SSR, optando-se por apresentar esses resultados. Os resultados estão de acordo com Meyer (2002) que concluiu que índices como o de Jaccard e Nei e Li, por desconsiderarem a ausência conjunta de bandas, permitem a obtenção de resultados semelhantes para o agrupamento de linhagens de milho analisadas por marcadores dominantes como o AFLP e RAPD.

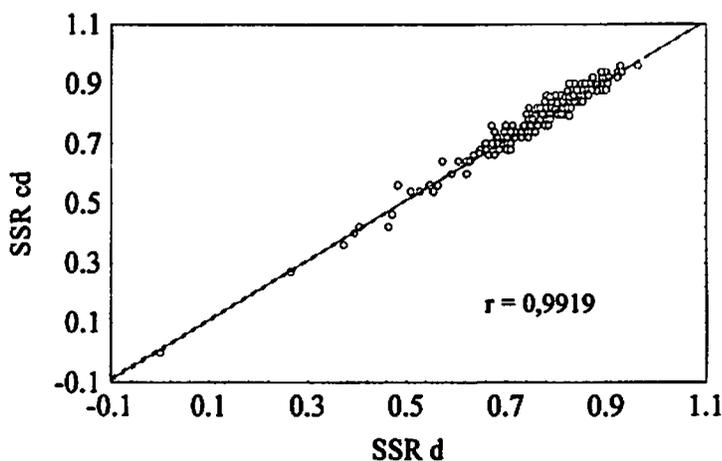


FIGURA 6. Correlação de Pearson (r) a 95% de confiança para os índices de dissimilaridade genética entre 35 linhagens de milho, considerando os marcadores SSR como dados binários (SSRd) e co-dominantes (SSRcd). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

O número de polimorfismos utilizados nos estudos de diversidade genética é um fator importante na determinação da estabilidade e confiabilidade dos agrupamentos produzidos (Lanza, 1996). Procedimentos envolvendo simulações têm sido utilizados para verificar se o número de bandas foi suficiente para definir, com precisão, a divergência genética entre os indivíduos (Lima et al. 2002; Pejic et al. 1998). Da mesma forma, foram realizadas simulações utilizando matrizes calculadas pelo índice de Jaccard e de Nei e Li com base em um número crescente de cada um dos marcadores moleculares, verificando-se uma diminuição no desvio padrão e um aumento na correlação entre as matrizes de distâncias genéticas em ambos os casos (Figura 7). A partir

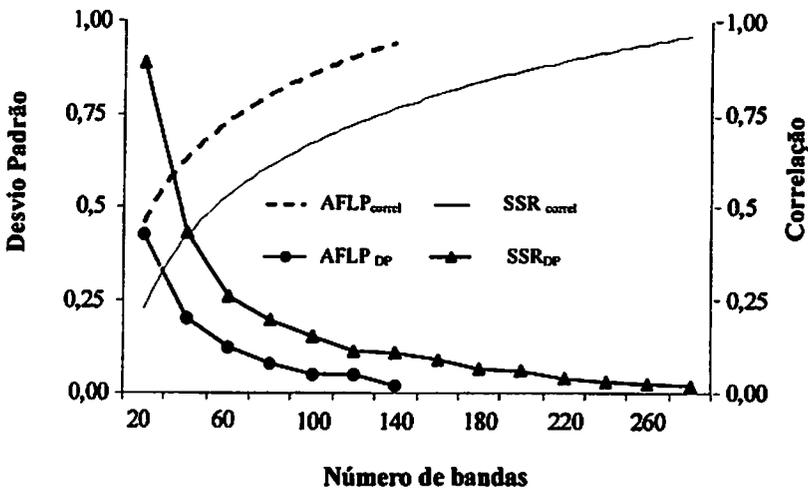


FIGURA 7. Desvio padrão e correlação entre matrizes de distâncias genéticas simuladas com o incremento do número de bandas de AFLP e de SSR utilizando os índices de Jaccard e Nei Li. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

de 120 polimorfismos de AFLP e de 220 de SSR, o desvio padrão foi inferior a 0,05 e a correlação superior a 0,90. Tais valores corresponderiam à utilização de 8 combinações de *primers* mais polimórficos para o AFLP ou de 14 *primers* SSR, indicando que o número de marcas avaliadas foi suficiente para definir, com confiabilidade, a distância genética entre as linhagens avaliadas. Os resultados apresentados concordam com Pejic et al. (1998), uma vez que eles verificaram uma redução no ganho da precisão nas análises de divergência genética com a inclusão de polimorfismos de RFLP, RAPD, SSR e AFLP, acima de 150 bandas polimórficas, para todos os tipos de marcadores em milho.

Para a estimativa da diversidade genética, deve ser levado em consideração o fato de que os dados obtidos pelas técnicas de AFLP e SSR são originados de diferentes regiões amostradas ao longo do genoma. Os 25 locos SSR escolhidos abrangeram todos os 10 cromossomos do milho e as 11 combinações de *primers* AFLP amostraram 158 regiões aleatórias do genoma. As matrizes de dissimilaridade entre as 35 linhagens de milho geradas pelos dois tipos de marcadores moleculares, apresentaram uma correlação de $r = 0,82$ (Figura 8), valor superior aos observados por Pejic et al. (1998) que encontraram uma correlação de 0,67. Em videira, Fossati et al. (2001) comparando os dados de AFLP e SSR, verificaram uma correlação de 0,80. No presente trabalho, o complemento dos índices de similaridade obtidos para o AFLP e SSR foram combinados em uma matriz de médias desses valores. A matriz resultante da combinação dos dados moleculares apresentou uma elevada correlação com as matrizes de dissimilaridade geradas com os marcadores separadamente, sendo de 0,94 para o AFLP e 0,97 para o SSR (Figura 8). Tais comparações foram realizadas com o intuito de explorar, de uma maneira mais completa, as informações dos AFLP e SSR.

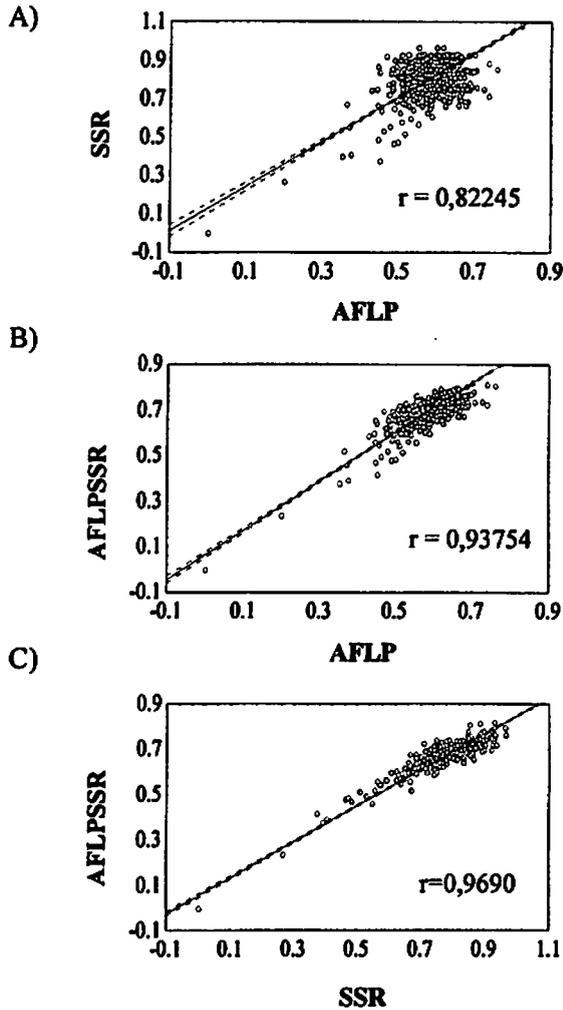


FIGURA 8. Correlação de Pearson (r) entre matrizes de dissimilaridade genética obtidas para 35 linhagens de milho a partir das análises feitas para: A) AFLP e SSR; B) AFLP e a média dos índices de dissimilaridade obtidos para AFLP e SSR; C) SSR e a média dos índices de dissimilaridade obtidos para AFLP e SSR. A linha pontilhada indica o intervalo de confiança de 95%. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

*AFLP= índice de dissimilaridade obtido pela fórmula de Jaccard

**SSR = índice de dissimilaridade obtido pela fórmula de Nei e Li

4.7 Diversidade genética entre linhagens elites de milho

Embora a população envolvida nesse estudo tenha englobado um número reduzido de linhagens, as frequências alélicas dos locos SSR foram bem distribuídas entre as linhagens de endosperma dos tipos duro e dentado, mesmo utilizando-se um maior número de materiais tipo duro (21) em relação ao dentado (14). Dos 293 alelos amplificados, 94 estavam presentes em ambas as classes de endospermas, 111 foram exclusivos das linhagens de endosperma tipo duro e 88 dos materiais tipo dentado.

Os marcadores AFLP apresentaram valores médios de IDG inferiores quando comparados aos SSR (0,79 e 0,57) (Tabela 9). Quando os marcadores foram combinados, observou-se valores médios de IDG de 0,66. As linhagens L2 e L29 com endosperma do tipo duro, apresentaram uma menor divergência genética, independente da técnica utilizada. Isso pode ser explicado pelo fato da linhagem L2 ser progenitora da população, a partir da qual, a L29 foi extraída. Entre os materiais dentados, L25 e L6 foram as mais similares geneticamente, utilizando-se tanto marcadores SSR quanto em combinações destes com o AFLP. No entanto, quando apenas os dados de AFLP foram utilizados, as linhagens L34 e L35 foram as mais próximas.

Em média, as distâncias genéticas dentro do grupo duro e do dentado foram próximas, embora os materiais com endosperma duro, com maior amplitude para os IDG, tenham apresentado valores médios um pouco inferiores para esses índices quando comparados às linhagens de endosperma dentado (Tabela 9), principalmente quando os IDG foram obtidos a partir dos dados de SSR.

TABELA 9. Valores máximo, mínimo e médio dos índices de dissimilaridade genética (IDG) de Jaccard e Nei e Li calculados a partir de dados de AFLP e SSR, respectivamente, bem como da combinação desses para os dados de ambos os marcadores, analisados em função do tipo de endosperma ou para todas as 35 linhagens. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Tipo de Endosperma	AFLP			SSR			Combinado ^a		
	IDG	Linhagens		IDG	Linhagens		IDG	Linhagens	
Duro	Máx.	0,76	L27 e L31	Máx.	0,96	L3 e L33	Máx.	0,81	L16 e L28
	Mín.	0,20	L2 e L29	Mín.	0,27	L2 e L29	Mín.	0,23	L2 e L29
	Média	0,55		Média	0,75		Média	0,65	
Dentado	Máx.	0,67	L13 e L14	Máx.	0,97	L7 e L35	Máx.	0,78	L18 e L34
	Mín.	0,43	L34 e L35	Mín.	0,53	L6 e L25	Mín.	0,50	L6 e L25
	Média	0,57		Média	0,81		Média	0,64	
35 Linhagens	Máx.	0,76	L27 e L31	Máx.	0,97	L7 e L35	Máx.	0,82	L9 e L18
	Mín.	0,20	L2 e L29	Mín.	0,27	L2 e L29	Mín.	0,23	L2 e L29
	Média	0,58		Média	0,82		Média	0,68	
Média	0,57			0,79			0,66		

^a Combinação das médias de matrizes de dissimilaridade obtidas para o AFLP e SSR.

Os dendogramas obtidos a partir dos coeficientes de dissimilaridade calculados utilizando os dados de AFLP, SSR e da combinação dos marcadores estão apresentados nas Figuras 9, 10 e 11. Um valor de $r = 0,82$ para a correlação entre as matrizes de distâncias genéticas para ambos os marcadores, confirma o fato de que tanto os AFLP quanto os SSR foram eficientes em agrupar as linhagens em função da característica do endosperma e

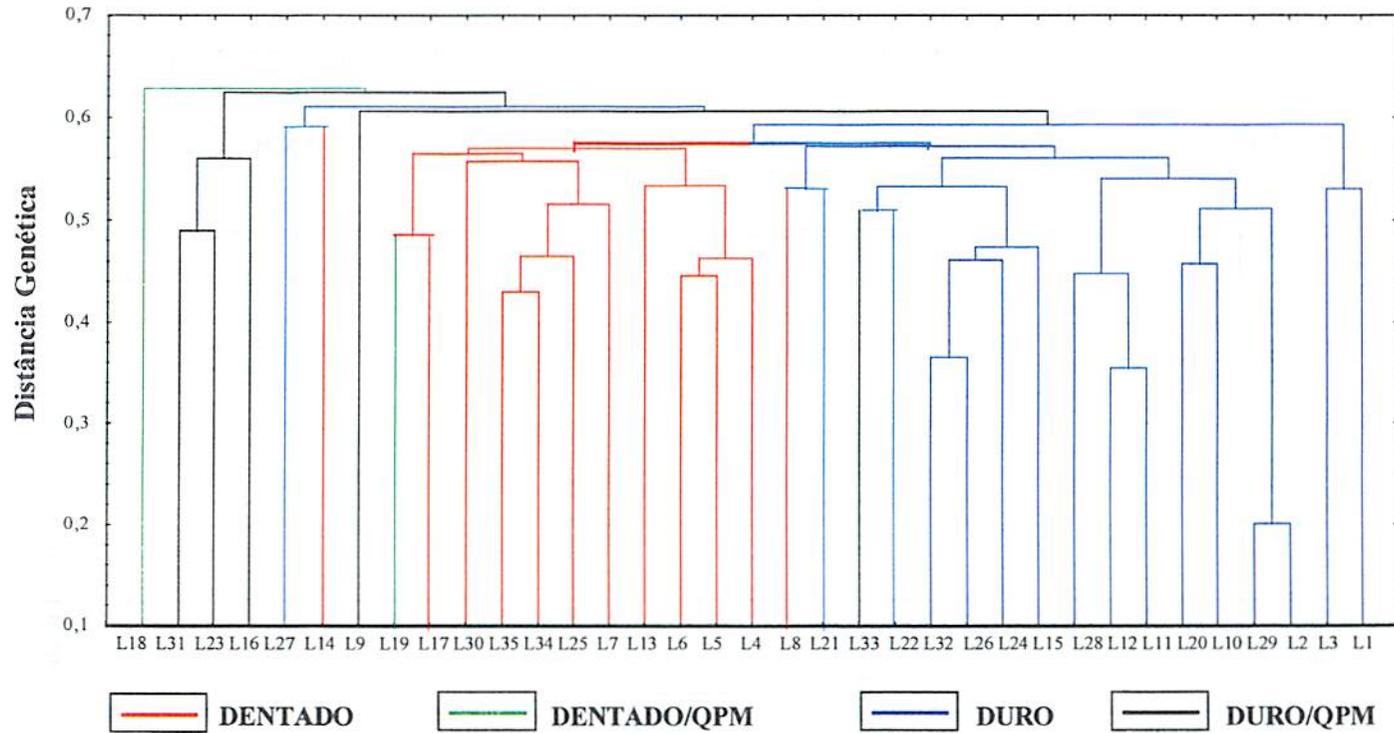


FIGURA 9. Dendrograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA com base no complemento dos índices de similaridade de Jaccard utilizando marcadores AFLP. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

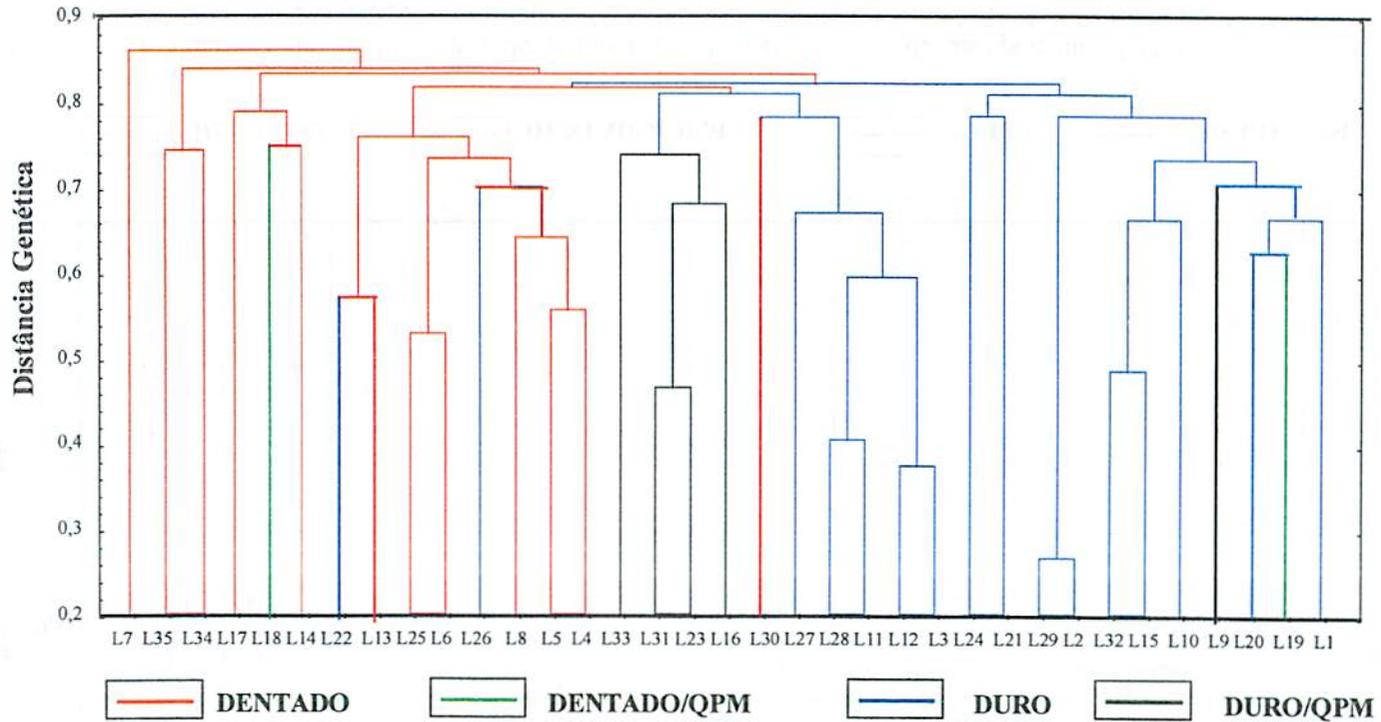


FIGURA 10. Dendrograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA, com base no complemento dos índices de similaridade de Nei e Li utilizando marcadores SSR. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

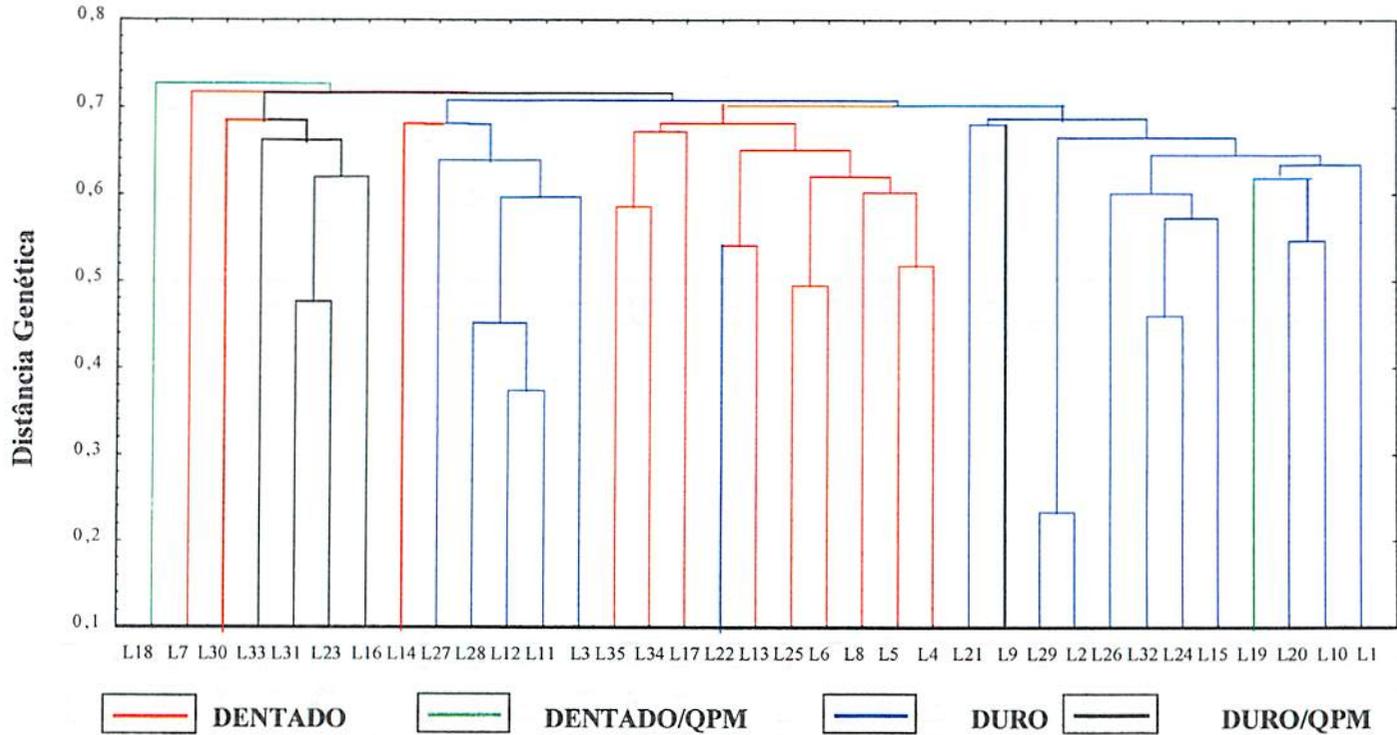


FIGURA 11. Dendrograma de 35 linhagens de milho, obtido para a combinação dos dados de AFLP e SSR, revelado pela análise de agrupamento UPGMA, com base no complemento dos índices de similaridade de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

da qualidade protéica dos grãos. No entanto, algumas discrepâncias foram observadas entre os dois marcadores. No AFLP, a linhagem L8 classificada como dentada foi alocada no grupo dos duros e, as linhagens L27 e L14 se isolaram do agrupamento principal dos materiais duros e dentados. Utilizando os SSR, a L22 e L26, materiais de endosperma duro, foram agrupados juntamente com os dentados.

O dendograma gerado pelo AFLP parece ter definido melhor o relacionamento entre linhagens que apresentaram, em alguma fase do melhoramento, uma maior proximidade, provavelmente por ter amostrado um número maior de regiões no genoma. A linhagem L11 participou como um dos parentais que originou as linhagens L12 e L28, assim como a L24 e a L26 foram os parentais envolvidos na obtenção da L32. Tais associações puderam ser melhores visualizadas nos dendogramas obtidos com o AFLP ou com a combinação de ambos os marcadores, uma vez que foram formados subgrupos entre essas linhagens dentro do grupo principal de materiais com endospermas duros. Segundo Fossati et al. (2001), os marcadores SSR e AFLP são igualmente efetivos para a definição de relações genéticas entre cultivares, embora Teulat et al. (2000) afirmem que o AFLP propicie melhores resoluções das similaridades genéticas e que os marcadores SSR são mais informativos no que diz respeito à revelação de dados adicionais sobre diferenças nas combinações alélicas entre e dentro de populações.

Uma observação interessante pode ser feita para as linhagens L7 e L8, que mesmo sendo originadas de uma mesma população, foram alocadas distantes por ambos os marcadores moleculares. Isso pode ser explicado pela ampla variabilidade genética das populações de polinização aberta, utilizadas para seleção dos materiais. Fato semelhante também foi observado por Dubreuil et al. (1996), utilizando marcadores RFLP para análise de divergência entre linhagens de milho.

Pela análise dos dendogramas observou-se que a seleção das linhagens para alta qualidade protéica dos grãos ou QPMs favoreceu a formação de um grupo isolado e bem definido para os materiais com endosperma duro e QPMs, ficando bem evidenciado para as linhagens L31, L23 e L16, tanto com marcadores AFLP, SSR quanto com a combinação de ambos. Por outro lado, as linhagens L19 e L18, classificadas como dentadas e de alta qualidade protéica, ficaram bem distantes em todos os dendogramas.

A análise de componentes principais deve ser utilizada em conjunto com a análise de agrupamento, para que o máximo de informações possa ser extraído dos dados (Livini et al., 1992). No presente trabalho, foi verificado que algumas relações não detectadas pelo método de agrupamento foram melhores visualizadas nos gráficos obtidos pela análise de componentes principais (Figuras 12 e 13). A decomposição da variância obtida entre as linhagens, em três vetores, explicou 48,8 e 48,4% da variância total para os marcadores AFLP e SSR. Os autovalores acumulados foram de 17,06 para o AFLP e de 16,94 para o SSR. A combinação dos dados de AFLP e SSR na análise de componentes principais (Figura 4B, Anexo) não gerou informações complementares quando comparados aos marcadores isoladamente, portanto as discussões não englobarão a combinação dos dados.

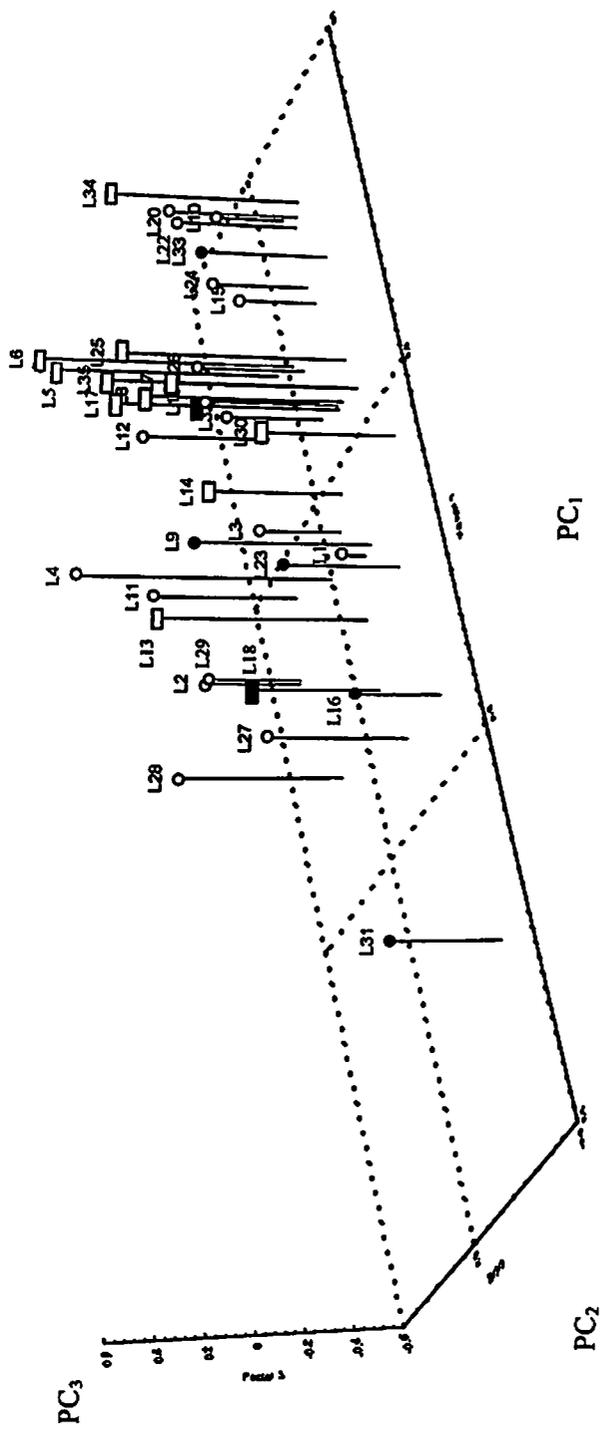


FIGURA 12. Análise de componentes principais obtida a partir da matriz de correlação dos complementos dos índices de similaridade de Jaccard para 35 linhagens elite de milho, avaliadas por marcadores AFLP. (□ = DENTADO, ◻ = DENTADO/QPM, ○ = DURO, ● = DURO/QPM). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

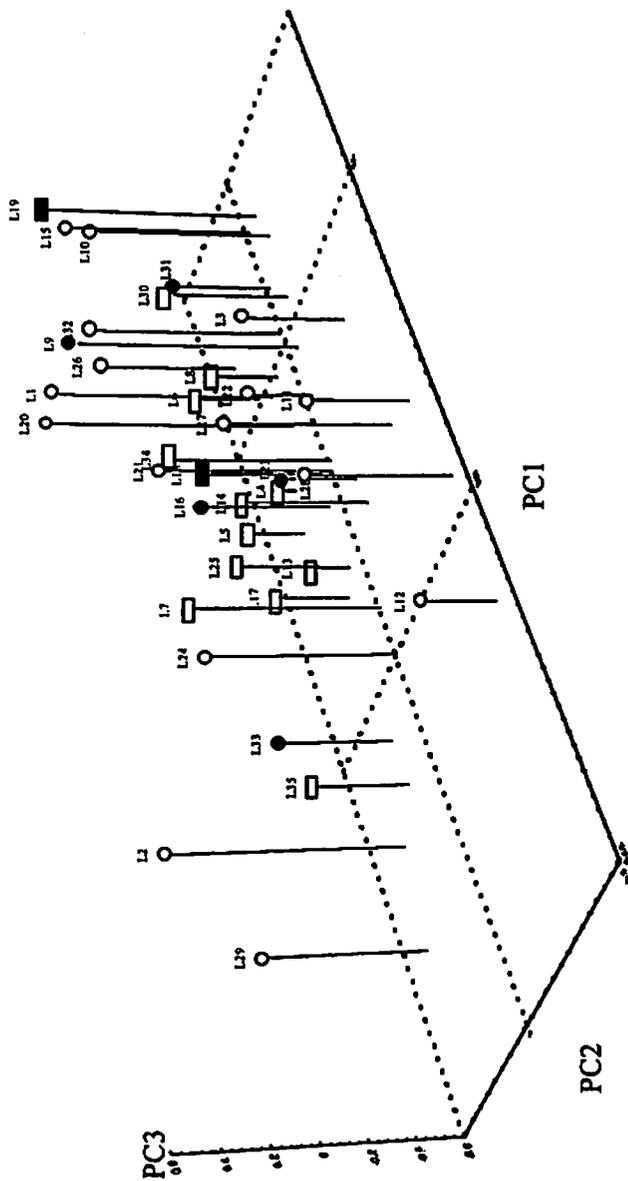


FIGURA 13. Análise de componentes principais obtida a partir da matriz de correlação dos complementos dos índices de similaridade de Nei e Li para 35 linhagens elite de milho, avaliadas por marcadores SSR. (□ = DENTADO, ○ = DURO, ● = DURO/QPM). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

Embora os valores médios dos IDG verificados na tabela 9, não tenham explorado o comportamento da diversidade dentro dos grupos duros e dentados, a disposição das linhagens em três dimensões pela análise de componentes principais mostra, claramente, a maior dispersão das linhagens com endosperma do tipo duro ao longo dos três eixos (Figuras 12 e 13). Por meio dos marcadores AFLP fica ainda mais claro a maior proximidade dos materiais dentados (Figura 12), onde a grande maioria das linhagens dentadas concentrou-se na porção mais distal do eixo 1, que explicou a maior porção da variância entre as linhagens (36,25%), e na parte inferior do eixo 2, sendo as linhagens L13 e L34 as mais dispersas desse conjunto. A variabilidade para as linhagens dentadas foi demonstrada principalmente no eixo 3. Pela análise de componentes principais para os marcadores SSR (Figura 13), observou-se que os materiais com endosperma do tipo dentado foram concentrados ao longo do eixo 1, que explicou 32,52% da variância entre as linhagens. Porém, as linhagens foram posicionadas na porção central do gráfico e de maneira mais dispersa do que a apresentada pelo AFLP, e nesse caso não foi verificada uma variação tão pronunciada para os materiais dentados ao longo do eixo 3 (Figura 13). No presente trabalho, o fator determinante para a maior diversidade genética observada entre as linhagens de endosperma do tipo duro pode ser explicado pelo maior número de populações envolvidas na origem dos materiais genéticos (Tabela 1). Os genótipos do grupo dos duros tiveram as populações de origem BR105, CMS03, CMS12, CMS14, CMS50, CMS453 e CMS455 enquanto que os materiais dentados foram oriundos de 3 populações, BR106, CMS28 e CMS45.

No eixo 2, tanto para os dados de AFLP quanto para os SSR (explicando 6,63 e 8,54% das variâncias, respectivamente) observou-se algumas relações particulares como as das linhagens de alta qualidade protéica L16, L23, L31 e L33, localizadas na parte inferior do gráfico. Foi interessante observar que a

L33, na análise de UPGMA para o AFLP (Figura 9), havia sido agrupada juntamente com os materiais duros, mas separado dos QPMs. No entanto, o acréscimo de mais uma dimensão pela análise de componentes principais permitiu verificar que todas as linhagens QPMs, independente do tipo de endosperma se encontraram dispersas ao longo do eixo 1, concentradas na parte inferior do eixo 2, indicando que as características de qualidade protéica do grão foram melhores representadas nesse eixo (Figura 12). No eixo 2, ainda ficou bem caracterizada a proximidade genética entre L11, L12 e L28, já observados pela análise de agrupamento, assim como o comportamento entre as linhagens L24, L26 e L32 (Figuras 9, 10 e 11).

Pelo que foi discutido anteriormente, verifica-se que os resultados obtidos com as análises de UPGMA para o agrupamento das 35 linhagens foram complementados pelas análises de componentes principais. Ao decompor as variâncias permitiu-se uma melhor visualização das relações entre esses materiais e uma melhor interpretação dos dados moleculares.

Dentro de um programa de melhoramento, o conhecimento da diversidade genética é essencial para a utilização eficiente do germoplasma. No presente trabalho, os marcadores AFLP e SSR foram confirmados como técnicas importantes para o auxílio a esses programas, uma vez que viabilizam a exploração de maneira rápida e precisa da divergência existente entre os materiais genéticos, podendo auxiliar tomadas de decisão relacionadas à escolha dos genótipos que podem ser envolvidos em cruzamentos futuros. A confiabilidade das informações e rapidez da obtenção dos resultados são incrementadas com a semi-automatização dos marcadores moleculares. Deve ser ressaltado que os SSR comparados aos AFLP se destacam pela maior simplicidade da técnica e da análise dos dados, além do maior conteúdo de informação, sendo mais indicados para análises genéticas.

5 CONCLUSÕES

Para a discriminação das 35 linhagens são necessários apenas dois locos SSR (dup24 e bnlg1006). As diferenças na amplitude alélica entre os locos associadas à precisão conferida pelo sistema semi-automatizado, permitem a combinação de seis locos em única linha do gel, garantindo a obtenção de um *fingerprinting* com maior poder de discriminação.

Os microssatélites com núcleo repetitivo contendo dois nucleotídeos apresentam maior grau de polimorfismo, porém a análise semi-automatizada é comprometida em função da amplificação, com maior frequência, de bandas fantasmas.

Devido às características de multialelismo e co-dominância, os SSR são muito informativos e os mais indicados para a obtenção de *fingerprints*, para fins de proteção intelectual de cultivares.

AFLP e SSR são técnicas eficientes para estudos de diversidade genética, porém em função da simplicidade e menor custo da técnica os marcadores SSR são mais indicados para essas análises.

Em função do maior número de populações envolvidas na origem dos genótipos com endosperma do tipo duro, esses apresentaram maior variabilidade quando comparados aos do tipo dentado.

As técnicas de agrupamento e de componentes principais são complementares nas análises de diversidade genética entre as linhagens e permitem uma interpretação mais precisa e completa dos dados moleculares.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL - Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2000. p. 418-438.

AJMONE-MARSAN, P.; LIVINI, C.; MESSMER, M. M.; MELCHINGER, A. E. E; MOTTO, M. Cluster analyses of RFLP data from related maize inbred lines of the BSSS and LSC heterotic groups and comparison with pedigree data. *Euphytica*, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 139-148, Mar. 1992.

BECHER, S. A.; STEINMETZ, K.; WEISING, K.; BOURY, S.; PELTIER, D.; RNOU, J. P.; KAHL, G.; WOLFF, K. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 101, n. 4, p. 643-651, Sept. 2000.

BECK, D. L.; VASAL, S. K.; CROSSA, J. Heterosis and combining among subtropical and temperate intermediate-maturity maize germplasm. *Crop Science*, Madison, v. 31, n. 1, p. 68-73, Jan./Feb. 1991.

BOHN, M.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Science*, Madison, v. 39, n. 1, p. 228-237, Jan./Feb. 1999.

BRASIL. Lei n. 9. 456, 25 abr. 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Brasília, DF: Senado Federal, 1997. p. 15-30.

BREDEMEIJER, G. M. M.; ARENS, P.; WOUTERS, D.; VISSER, D.; VOSMAN, B. The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 97, n. 4, p. 584-590, Sept. 1998.

BURSTIN, J.; VIENNE, D.; DUBREUIL, P.; DAMERVAL, C. Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize. I. Genetic diversity among 21 inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 89, n. 7/8, p. 943-950, Dec. 1994.

CASTIGLIONI, P.; AJMONE-MARSAN, P.; WIJK, R.; MOTTO, M. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage

- group distribution. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 3/4, p. 425-431, Aug. 1999.
- CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; TODA, F. M.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 1/2, p. 51-59, July 1998.
- CHENG, F. S.; BROW, S. K.; WEEDEN, N. F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n. 5, p. 921-922, Aug. 1997.
- CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SHU, H.; SMITH, J. S. C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 5, p. 866-873, Oct. 1996.
- CONDIT, R.; HUBBEL, S. P. Abundance of two-base repeat regions in tropical tree **Genome**, Ottawa, v. 34, n. 1, p. 66-71, Feb. 1991.
- DAVIERWALA A. P.; RAMAKRISHNA, W.; RANJEKAR, P. K. Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 8, p. 1291-1298, Dec. 2000.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: Alfenas, A. C. (Ed.) **Eletofórese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-475.
- DI GASPERO, G.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R.; EDWARDS, K. J.; CIPRIANI, G. Conservation of microsatellite loci within genus *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1/2, p. 301-308, July 2000.
- 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**, Berlin, v. 95, n. 5/6, p. 723-733, Oct. 1997.
- DONINI, P.; ELIAS, M. L.; BOUGOURD, S. M.; KOEBNER, R. M. D. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 521-526, Aug. 1997.

DUBREUIL, P.; DUFOUR, P.; KREJCI, E.; CAUSSE, M.; VIENNE, D.; GALLAIS, A.; CHARCOSSET, A. Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 3, p. 790-799, May/June 1996.

ECHT, C. S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 1, p. 9-17, Feb. 1997.

ELSIK, C. G.; MINIHAN, V. T.; HALL, S. E.; SCARPA, A. M.; WILLIAMS, C. G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 550-555, June 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.

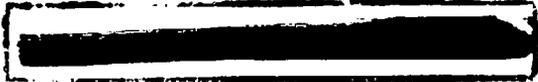
FOSSATI, T.; LABRA, M.; CASTIGLIONE, S.; FAILLA, O.; SCIENZA, A.; SALA, F. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, n. 2/3, p. 200-205, Feb. 2001.

GERBER, S.; MARIETTE, S.; STREIFF, R.; BODÉNÈS, C.; KREMER, A. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1037-1048, Aug. 2000.

GETHI, J. G.; LABATE, J. A.; LAMKEY, K. R.; SMITH, M. E.; KRESOVICH, S. SSR variation in important U. S. maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 4, p. 952-957, July/Aug. 2002.

*GLAUBITZ, J. C.; EMEBIRI, L. C.; MORAN, G. F. Dinucleotide microsatellites from *Eucalyptus sieberi*: inheritance, diversity, and improved scoring of single base differences. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 6, p. 1041-1045, Dec. 2001.

GUILFORD, P.; PRAKASH, S.; ZHU, J. M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSET, H.; FORSTER, R. Microsatellites in *Mallus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, n. 2, p. 249-254, Feb. 1997.



HAHN, V.; BLANKENHORN, K.; SCHWALL, M.; MELCHINGER, A. E. Relationships among early European maize inbreds: III. Genetic diversity revealed with RAPD markers and comparison with RFLP and pedigree data. *Maydica*, Bergamo, v. 40, n. 4, p. 299-310, 1995.

HARKER, N.; RAMPLING, L. R.; SHARIFLUO, M. R.; HAYDEN, M. J.; HOLTON, T. A.; MORELL, M. K.; SHARP, P. J.; HENRY, R. J.; EDWARDS, K. J. Microsatellites as markers for Australian wheat improvement. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, v. 52, n. 11/12, p. 1121-1130, 2001.

HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEAU, M.; VOS, P.; KESSELI, R.; MICHELMORE, R. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a toll for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 93, n. 8, p. 1202-1210, Dec. 1996.

KIRST, M. Desenvolvimento de sistemas de genotipagem multilocos semi-automatizados, baseados em marcadores microssatélites, e sua aplicação em espécies do gênero *Eucalyptus*. 1999. 150 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

KRAFT, T.; HANSEN, M.; NILSSON, N. O. Linkage disequilibrium and fingerprinting in sugar beet. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 101, n. 3, p. 323-326, Aug. 2000.

LANZA, L. L. B. Distância genética entre linhagens endogâmicas de milho (*Zea mays* L.) e predição de híbridos simples através de marcadores do tipo RAPD. 1996. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

LI, C. D.; TOSSNAGEL, B. G.; SCOLES, G. J. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 101, n. 8, p. 1259-1268, Dec. 2000.

LIMA, M. L. A.; GARCIA, A. A. F.; OLIVEIRA, K. M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; SOUZA Jr., C. L.; SOUZA, A. P. Analysis of genetic similarity by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 104, n. 1/2, p. 30-38, Jan. 2002.

LIVINI, C.; AJMONE-MARSAN, P.; MELCHINGER, A. E. E; MESSMER, M. M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred within and among heterotic groups revealed by RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, n. 1/2, p. 17-25, June 1992.

MacGREGOR, C. E.; LAMBERT, C. A.; GREYLING, M. M.; LOUW, J. H.; WARNICH, L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germoplasm. **Euphytica**, Dordrecht, v. 113, n. 2, p. 135-144, 2000.

MESSMER, M. M.; MELCHINGER, A. E.; BOPPENMAIER, J.; BRUNKLAUS-JUNG, E.; HERRMANN, R. G. Relationships among early European maize inbreds: I. Genetic diversity among flint and dent lines revealed by RFLPs. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 6, p. 1301-1309, Nov./Dec. 1992a.

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A. E.; BOPPENMAIER, J.; HERRMANN, R. G.; BRUNKLAUS-JUNG, E. RFLP analyses of early-maturing European maize germplasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 8, p. 1003-1012, Dec. 1992b.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MICKELSON, H. R.; CORDOVA, H.; PIXLEY, K. V.; BJARNASON, S. Heterotic relationships among nine temperate and subtropical maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 41, n. 4, p. 1012-1020, July/Aug. 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo - Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Requisitos Mínimos para Determinação do Valor de Cultivo e Uso de Milho (*Zea mays*) para Inscrição no Registro Nacional de Cultivares – RNC**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em jan. 2002.

MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; JESTER, C. A.; HERNANDEZ, C. J.; SZEWC-McFADDEN. Application of multiplex PCR and fluorescence-base, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 2, p. 617-624, Mar/Apr. 1997.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as marker in plant genetics. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

MUMM, R. H.; DUDLEY, J. W. A classification of 148 U. S. maize inbreds: I. Cluster analyses based on RFLPs. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 4, p. 842-851, July/Aug. 1994.

OLUFOWOTE, J. O.; XU, Y.; CHEN, X.; PARK, W. D.; BEACHELL, H. M.; DILDQY, R. H.; GOTEQ, M.; McCOUCH, R.; Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 370-378, June 1997.

PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, J. V.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X.; ABADIE, T.; GAMA, E. E. G.; GUIMARÃES, P. E. O.; MEIRELLES, W. F.; LOPES, M. A.; VASCONCELOS, M. J. V.; PAIVA, E. Heterotic groups based on yield-specific combining ability data and phylogenetic relationship determined by RAPD markers for 28 tropical maize open pollinated varieties. **Euphytica**, Dordrecht, v. 121, n. 2, p. 197-208, 2001.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 429-485.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLIK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1248-1255, Dec. 1998.

PILLEN, K.; BINDER, A.; KREUZKAM, B.; RAMSAY, L.; WAUGH, R.; FÖRSTER, J.; LÉON, J. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating german barley cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 4, p. 652-660, Sept. 2000.

PRASAD, M.; VARSHNEY, R. K.; ROY, J. K.; BALYA, H. S.; GUPTA, P. K. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 584-592, Feb. 2000.

QUAGLIARO, G.; VISCHI, M.; TYRKA, M.; OLIVIERI, A. M. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. **Journal of Heredity**, New York, v. 92, n. 1, p. 38-42, Jan./Feb. 2001.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York, 1996. p. 75-134.

RONGWEN, J.; AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; LAVI, U.; CREGAN, P. B. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 1, 43-48, Jan. 1995.

RUITBERG, C. M.; REEDER, J.; BUTLER, J. M. STRBase: a short tandem repeat DNA database for human identity testing community. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 29, p. 320-322, 2001.

RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 4, p. 442-450, Aug. 1997.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceeding of National Academic Science of the United States of America Biological Science**, New York, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SHAN, X.; BLAKE, T. K.; TALBERT, L. E. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 6/7, p. 1072-1078, May 1999.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellites DNA. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 109, n. 6, p. 365-371, Dec. 2000.

SCHNEIDER, K.; DOUCHES, D. S. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprinting North American potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v. 74, n. 3, p. 149-160, Mar. 1997.

SCHWARZ, G.; HERZ, M.; HUANG, X. Q.; MICHALEK, W.; JAHOOOR, A.; WENZEL, G.; MOHLER, V. Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 545-551, Feb. 2000.

SENIOR, M. L.; MURPHY, J. P.; GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Science*, Madison, v. 38, n. 4 p. 1088-1098, July/Aug. 1998.

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHEL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 95, n. 1/2, p. 163-173, July 1997.

SMITH, J. S. C.; REGISTER III, J. C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. *Seed Science and Research*, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 285-293, 1998.

SMITH, S.; HELENTJARIS, T. DNA fingerprinting and plant variety protection. In: PATERSON, A. H. *Genome mapping in plants*. Georgetown, 1996. p. 95-110.

SMULDERS, M. J. M.; BREDEMEIJER, G.; RUS-KORTEKAAS, W.; ARENS, A. & VOSMAN, B. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 94, n. 2, p. 264-272, Feb. 1997.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M. T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivar. *Genome*, Ottawa, v. 43, n. 3, p. 512-520, Aug. 2000.

TEULAT, B.; ALDAM, C.; TREHIN, R.; LEBRUN, P.; BARKER, J. H. A.; ARNOLD, G. M.; KARP, A.; BAUDOUIN, L. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocus nucifera*) populations from across the geographic range using sequence tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 100, n. 5, p. 764-771, Mar. 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; MANK, R.; ANTONISE, R.; BASTIAANS, E.; SENIOR, M. L.; STUBER, C. W.; MELCHINGER, A. E.; LÜBBERSTEDT, T.; XIA, X. C.; STAM, P.; ZABEAU, M.; KUIPER, M. Two high-density AFLP maps of *Zea mays* L. : analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 6, p. 921-935, Oct. 1999.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. 2. ed. rev. and exp. Sunderland: SINAUER ASSOCIATES, 1996. 445 p.

WIEL, C. VAN DE; ARENS, P. Z.; VOSMAN, B. Microsatellite fingerprinting in lettuce (*Lactuca sativa* L.) and wild relatives. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, n. 11, p. 837-842, Nov. 1998.

ZHANG, L. H.; OZIAS-AKINS, P.; KOCHERT, G.; KRESOVICH, S.; DEAN, R.; HANNA, W. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, n. 6/7, p. 895-902, May 1999.

ZHU, J.; GALE, M. D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M. T.; BRYAN, G. J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 5, p. 602-611, Apr. 1998.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Distâncias genéticas entre 35 linhagens de milho calculadas pelos do índices de Nei e Li e de co-dominância para o SSR, apresentados nas porções superior e inferior da diagonal, respectivamente. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 74
TABELA 2A	Distâncias genéticas entre 35 linhagens de milho, calculadas para a combinação da média dos índices de Jaccard para o AFLP e de Nei e Li para o SSR ou isoladamente para o AFLP. Os dados combinados estão na porção superior da diagonal e os do AFLP, na porção inferior. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 76
TABELA 3A	Distâncias genéticas entre 35 linhagens de milho medidas pelos índices de Nei e Li para o AFLP e de Jaccard para o SSR. Os dados do AFLP e SSR estão apresentadas na porção superior e inferior da diagonal, respectivamente. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 78
TABELA 4A	Distâncias genéticas entre 21 linhagens de milho com endospermas do tipo duro, calculadas com a combinação das médias dos índices de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 80
TABELA 5A	Distâncias genéticas entre 14 linhagens de milho com endospermas do tipo dentado, calculadas para a combinação da média dos índices de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 81

- FIGURA 1B** Dendograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA, com base no complemento dos índices de co-dominância utilizando marcadores SSR. (dt= endosperma dentado; dt/Q= materiais QPM com endosperma dentado; D= endosperma duro; D/Q = materiais QPM com endosperma duro). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 82
- FIGURA 2B** Dendograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA, com base no complemento dos índices de similaridade de Nei e Li utilizando marcadores AFLP. (dt= endosperma dentado; dt/Q= materiais QPM com endosperma dentado; D= endosperma duro; D/Q = materiais QPM com endosperma duro). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 83
- FIGURA 3B** Dendograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA, com base no complemento dos índices de similaridade de Jaccard utilizando marcadores SSR. (dt= endosperma dentado; dt/Q= materiais QPM com endosperma dentado; D= endosperma duro; D/Q = materiais QPM com endosperma duro). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 84
- FIGURA 4B** Análise de componentes principais realizada para 35 linhagens elite de milho a partir da matriz de correlação dos complementos dos índices de similaridade de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR (□ = DENTADO, ■ = DENTADO/QPM, ○ = DURO, ● = DURO/QPM). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002. 85

TABELA 1A. Distâncias genéticas entre 35 linhagens de milho calculadas pelos índices de Nei e Li e de co-dominância para o SSR, apresentados nas porções superior e inferior da diagonal, respectivamente. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25
L1		0,66	0,81	0,85	0,85	0,78	0,78	0,75	0,67	0,78	0,89	0,92	0,81	0,89	0,75	0,77	0,93	0,86	0,66	0,67	0,74	0,81	0,85	0,89	0,74
L2	0,70		0,80	0,81	0,81	0,78	0,81	0,89	0,70	0,85	0,82	0,92	0,88	0,73	0,78	0,80	0,85	0,78	0,69	0,62	0,85	0,87	0,89	0,78	0,81
L3	0,82	0,80		0,76	0,74	0,77	0,85	0,85	0,81	0,70	0,75	0,37	0,76	0,69	0,74	0,76	0,78	0,81	0,69	0,85	0,84	0,77	0,81	0,81	0,85
L4	0,86	0,82	0,76		0,56	0,67	0,93	0,56	0,92	0,85	0,75	0,77	0,69	0,88	0,78	0,84	0,75	0,82	0,77	0,92	0,81	0,80	0,77	0,93	0,66
L5	0,88	0,82	0,76	0,54		0,75	0,93	0,72	0,82	0,79	0,83	0,81	0,59	0,89	0,65	0,81	0,79	0,82	0,85	0,85	0,81	0,71	0,89	0,93	0,85
L6	0,82	0,82	0,80	0,70	0,74		0,86	0,75	0,82	0,79	0,79	0,81	0,74	0,81	0,82	0,74	0,72	0,68	0,81	0,75	0,81	0,78	0,75	0,86	0,53
L7	0,80	0,84	0,86	0,92	0,92	0,86		0,82	0,82	0,89	0,90	0,89	0,93	0,93	0,86	0,81	0,89	0,86	0,78	0,89	0,81	0,84	0,89	0,89	0,93
L8	0,76	0,88	0,84	0,56	0,72	0,78	0,84		0,89	0,82	0,76	0,82	0,78	0,89	0,76	0,85	0,76	0,79	0,75	0,86	0,71	0,81	0,82	0,90	0,68
L9	0,70	0,74	0,82	0,92	0,84	0,84	0,82	0,90		0,82	0,75	0,85	0,85	0,89	0,68	0,85	0,93	0,93	0,74	0,70	0,77	0,84	0,85	0,79	0,85
L10	0,82	0,86	0,70	0,86	0,80	0,78	0,90	0,82	0,86		0,76	0,78	0,85	0,81	0,68	0,85	0,89	0,72	0,74	0,64	0,78	0,84	0,85	0,89	0,85
L11	0,90	0,80	0,74	0,80	0,88	0,86	0,92	0,80	0,78	0,78		0,39	0,86	0,79	0,76	0,85	0,86	0,80	0,75	0,82	0,79	0,72	0,65	0,86	0,89
L12	0,94	0,92	0,36	0,80	0,84	0,84	0,92	0,84	0,86	0,78	0,40		0,81	0,73	0,78	0,80	0,85	0,85	0,81	0,89	0,85	0,77	0,77	0,93	0,89
L13	0,86	0,88	0,76	0,70	0,60	0,76	0,92	0,80	0,84	0,86	0,88	0,82		0,77	0,82	0,92	0,85	0,85	0,85	0,92	0,92	0,57	0,89	0,85	0,81
L14	0,90	0,72	0,68	0,88	0,90	0,82	0,92	0,88	0,88	0,82	0,76	0,72	0,76		0,82	0,84	0,78	0,75	0,77	0,74	0,92	0,80	0,77	0,82	0,81
L15	0,80	0,82	0,78	0,78	0,68	0,84	0,86	0,76	0,74	0,72	0,78	0,80	0,84	0,82		0,85	0,79	0,90	0,67	0,68	0,85	0,81	0,93	0,86	0,82
L16	0,78	0,80	0,76	0,84	0,82	0,76	0,82	0,84	0,84	0,84	0,86	0,80	0,92	0,84	0,90		0,96	0,81	0,84	0,81	0,84	0,90	0,73	0,89	0,81
L17	0,94	0,86	0,76	0,74	0,80	0,72	0,88	0,76	0,92	0,88	0,88	0,84	0,88	0,78	0,80	0,96		0,79	0,85	0,89	0,89	0,88	0,82	0,83	0,89
L18	0,86	0,78	0,80	0,82	0,84	0,70	0,88	0,80	0,92	0,72	0,80	0,86	0,84	0,74	0,90	0,80	0,78		0,71	0,75	0,85	0,91	0,75	0,86	0,89
L19	0,68	0,70	0,68	0,76	0,84	0,84	0,80	0,72	0,72	0,72	0,72	0,80	0,84	0,76	0,70	0,84	0,86	0,68		0,62	0,69	0,90	0,81	0,82	0,85
L20	0,70	0,64	0,86	0,92	0,88	0,76	0,92	0,86	0,72	0,66	0,82	0,88	0,92	0,72	0,72	0,80	0,90	0,72	0,60		0,81	0,87	0,85	0,89	0,85
L21	0,76	0,84	0,84	0,82	0,82	0,84	0,82	0,70	0,76	0,76	0,80	0,84	0,92	0,92	0,86	0,84	0,88	0,86	0,68	0,80		0,84	0,89	0,78	0,77
L22	0,82	0,90	0,78	0,80	0,76	0,84	0,88	0,82	0,90	0,86	0,74	0,78	0,64	0,82	0,86	0,88	0,92	0,92	0,90	0,88	0,84		0,77	0,84	0,77
L23	0,86	0,88	0,80	0,78	0,88	0,78	0,88	0,84	0,84	0,86	0,66	0,78	0,68	0,88	0,78	0,96	0,72	0,84	0,74	0,80	0,84	0,88	0,80	0,86	0,85
L24	0,92	0,82	0,86	0,94	0,96	0,90	0,92	0,92	0,82	0,90	0,88	0,94	0,90	0,84	0,90	0,90	0,84	0,88	0,84	0,90	0,78	0,88	0,88		0,89
L25	0,74	0,80	0,84	0,66	0,84	0,54	0,92	0,66	0,84	0,84	0,90	0,88	0,80	0,80	0,82	0,80	0,88	0,88	0,84	0,84	0,76	0,80	0,86	0,90	
L26	0,78	0,78	0,86	0,72	0,64	0,72	0,88	0,82	0,80	0,80	0,90	0,94	0,84	0,92	0,76	0,78	0,82	0,88	0,80	0,74	0,90	0,82	0,80	0,88	0,78
L27	0,80	0,82	0,72	0,92	0,92	0,82	0,78	0,82	0,86	0,82	0,74	0,72	0,80	0,76	0,80	0,84	0,90	0,84	0,78	0,84	0,84	0,78	0,88	0,86	0,84
L28	0,82	0,84	0,74	0,86	0,90	0,88	0,90	0,80	0,74	0,80	0,42	0,54	0,82	0,80	0,80	0,88	0,92	0,84	0,80	0,82	0,78	0,80	0,82	0,76	0,88
L29	0,83	0,27	0,79	0,77	0,67	0,83	0,85	0,90	0,88	0,92	0,85	0,94	0,77	0,83	0,88	0,88	0,81	0,85	0,83	0,79	0,92	0,85	0,90	0,85	0,88
L30	0,78	0,90	0,82	0,80	0,88	0,80	0,84	0,78	0,80	0,84	0,82	0,82	0,76	0,92	0,84	0,84	0,88	0,88	0,86	0,92	0,80	0,78	0,78	0,88	0,88
L31	0,80	0,78	0,66	0,70	0,72	0,76	0,80	0,76	0,78	0,84	0,74	0,78	0,86	0,80	0,82	0,64	0,78	0,74	0,74	0,76	0,88	0,82	0,42	0,88	0,84
L32	0,86	0,82	0,84	0,80	0,82	0,88	0,84	0,78	0,84	0,68	0,80	0,86	0,84	0,82	0,56	0,90	0,80	0,84	0,76	0,84	0,82	0,82	0,56	0,86	0,86
L33	0,80	0,86	0,96	0,86	0,86	0,74	0,86	0,86	0,86	0,92	0,90	0,88	0,84	0,90	0,94	0,68	0,94	0,84	0,96	0,74	0,84	0,80	0,72	0,90	0,84
L34	0,79	0,88	0,85	0,88	0,92	0,75	0,79	0,83	0,85	0,83	0,85	0,88	0,83	0,92	0,81	0,83	0,92	0,94	0,73	0,88	0,77	0,79	0,90	0,85	0,79
L35	0,84	0,90	0,92	0,82	0,94	0,86	0,96	0,78	0,88	0,96	0,90	0,88	0,82	0,80	0,86	0,88	0,80	0,86	0,94	0,90	0,92	0,88	0,86	0,84	0,90

... continua...

TABELA 1A, Cont.

	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35
L1	0,75	0,77	0,81	0,80	0,75	0,79	0,80	0,79	0,76	0,83
L2	0,74	0,81	0,85	0,27	0,85	0,78	0,76	0,85	0,82	0,86
L3	0,85	0,73	0,73	0,80	0,81	0,67	0,79	0,86	0,82	0,89
L4	0,70	0,92	0,85	0,76	0,81	0,71	0,76	0,85	0,86	0,79
L5	0,81	0,93	0,89	0,85	0,88	0,88	0,77	0,86	0,86	0,90
L6	0,71	0,81	0,85	0,81	0,79	0,75	0,84	0,72	0,73	0,80
L7	0,66	0,78	0,85	0,85	0,86	0,79	0,84	0,86	0,76	0,97
L8	0,79	0,82	0,79	0,89	0,79	0,76	0,74	0,86	0,83	0,77
L9	0,78	0,85	0,70	0,88	0,78	0,75	0,80	0,86	0,83	0,86
L10	0,75	0,81	0,78	0,92	0,79	0,82	0,64	0,89	0,83	0,93
L11	0,83	0,75	0,40	0,85	0,79	0,73	0,78	0,88	0,80	0,90
L12	0,93	0,73	0,51	0,92	0,81	0,78	0,83	0,85	0,82	0,88
L13	0,85	0,81	0,81	0,76	0,74	0,85	0,83	0,85	0,82	0,79
L14	0,93	0,77	0,81	0,84	0,93	0,82	0,93	0,89	0,89	0,78
L15	0,72	0,78	0,75	0,85	0,79	0,76	0,48	0,93	0,80	0,84
L16	0,77	0,84	0,88	0,88	0,85	0,83	0,90	0,70	0,82	0,86
L17	0,82	0,89	0,93	0,81	0,86	0,79	0,77	0,90	0,90	0,77
L18	0,86	0,85	0,86	0,85	0,89	0,76	0,84	0,83	0,93	0,84
L19	0,78	0,77	0,74	0,84	0,85	0,75	0,73	0,86	0,72	0,83
L20	0,71	0,85	0,81	0,80	0,89	0,71	0,70	0,75	0,86	0,88
L21	0,89	0,85	0,81	0,92	0,81	0,89	0,83	0,82	0,75	0,90
L22	0,75	0,77	0,77	0,80	0,78	0,81	0,78	0,81	0,79	0,85
L23	0,78	0,89	0,74	0,88	0,78	0,46	0,80	0,71	0,86	0,83
L24	0,82	0,78	0,82	0,82	0,86	0,86	0,55	0,90	0,83	0,80
L25	0,78	0,85	0,89	0,88	0,89	0,86	0,87	0,88	0,83	0,86
L26	0,78	0,85	0,88	0,88	0,79	0,68	0,67	0,82	0,86	0,87
L27	0,90	0,46	0,47	0,92	0,74	0,85	0,80	0,89	0,82	0,90
L28	0,94	0,46	0,88	0,75	0,75	0,77	0,77	0,89	0,76	0,90
L29	0,71	0,92	0,80	0,92	0,92	0,85	0,79	0,85	0,81	0,82
L30	0,82	0,72	0,74	0,94	0,72	0,72	0,70	0,79	0,80	0,83
L31	0,72	0,88	0,76	0,83	0,74	0,74	0,74	0,79	0,90	0,83
L32	0,76	0,82	0,78	0,85	0,74	0,80	0,78	0,90	0,78	0,85
L33	0,84	0,88	0,80	0,83	0,76	0,78	0,90	0,82	0,79	0,80
L34	0,88	0,81	0,79	0,85	0,79	0,82	0,79	0,79	0,80	0,80
L35	0,90	0,88	0,80	0,85	0,80	0,88	0,84	0,80	0,75	0,74

TABELA 2A. Distâncias genéticas entre 35 linhagens de milho, calculadas para a combinação da média dos índices de Jaccard para o AFLP e de Nei e Li para o SSR ou isoladamente para o AFLP. Os dados combinados estão na porção superior da diagonal e os do AFLP, na porção inferior. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
L1		0,63	0,67	0,77	0,73	0,74	0,71	0,72	0,69	0,65	0,76	0,78	0,76	0,75	0,67	0,89	0,80	0,76	0,65	0,64	0,66	0,69
L2	0,56		0,67	0,70	0,67	0,66	0,73	0,75	0,89	0,89	0,66	0,71	0,75	0,66	0,69	0,71	0,72	0,67	0,65	0,57	0,70	0,74
L3	0,53	0,55		0,73	0,67	0,69	0,71	0,74	0,73	0,61	0,88	0,41	0,68	0,67	0,70	0,67	0,67	0,71	0,63	0,72	0,72	0,67
L4	0,67	0,58	0,69		0,51	0,57	0,77	0,56	0,78	0,74	0,67	0,70	0,64	0,75	0,67	0,78	0,64	0,73	0,69	0,78	0,69	0,69
L5	0,59	0,53	0,58	0,48		0,59	0,76	0,65	0,73	0,70	0,70	0,68	0,57	0,76	0,63	0,73	0,67	0,72	0,70	0,72	0,70	0,64
L6	0,65	0,51	0,58	0,45	0,45		0,70	0,67	0,72	0,69	0,72	0,68	0,62	0,70	0,72	0,70	0,82	0,67	0,70	0,67	0,71	0,67
L7	0,62	0,61	0,57	0,62	0,60	0,55		0,72	0,70	0,73	0,78	0,76	0,76	0,75	0,74	0,72	0,69	0,76	0,72	0,71	0,72	0,70
L8	0,69	0,61	0,63	0,55	0,57	0,55	0,60		0,76	0,70	0,67	0,71	0,70	0,75	0,64	0,71	0,65	0,71	0,65	0,73	0,62	0,68
L9	0,68	0,64	0,65	0,65	0,62	0,80	0,58	0,62		0,74	0,69	0,73	0,72	0,76	0,66	0,78	0,76	0,81	0,66	0,63	0,67	0,75
L10	0,49	0,51	0,52	0,63	0,59	0,80	0,56	0,57	0,62		0,85	0,65	0,75	0,69	0,61	0,70	0,72	0,65	0,64	0,56	0,65	0,69
L11	0,81	0,52	0,61	0,55	0,53	0,57	0,63	0,54	0,61	0,53		0,38	0,75	0,67	0,67	0,75	0,74	0,71	0,66	0,70	0,67	0,65
L12	0,61	0,51	0,45	0,60	0,51	0,52	0,60	0,58	0,59	0,51	0,35		0,72	0,64	0,70	0,70	0,71	0,74	0,69	0,70	0,68	0,64
L13	0,66	0,61	0,60	0,58	0,53	0,49	0,61	0,61	0,60	0,64	0,62	0,61		0,72	0,72	0,78	0,74	0,74	0,71	0,75	0,78	0,57
L14	0,60	0,59	0,66	0,61	0,63	0,58	0,57	0,62	0,65	0,57	0,58	0,58	0,67		0,71	0,77	0,72	0,70	0,71	0,64	0,74	0,67
L15	0,54	0,56	0,62	0,57	0,58	0,59	0,61	0,52	0,57	0,50	0,58	0,59	0,60	0,61		0,74	0,70	0,75	0,61	0,62	0,69	0,68
L16	0,59	0,62	0,58	0,69	0,64	0,64	0,61	0,59	0,67	0,57	0,65	0,61	0,65	0,70	0,57		0,78	0,73	0,75	0,70	0,73	0,71
L17	0,66	0,57	0,58	0,54	0,55	0,53	0,50	0,53	0,60	0,56	0,61	0,57	0,51	0,67	0,60	0,60		0,72	0,67	0,72	0,75	0,76
L18	0,65	0,56	0,63	0,63	0,60	0,63	0,65	0,62	0,70	0,58	0,63	0,63	0,64	0,65	0,59	0,65	0,65		0,63	0,68	0,76	0,77
L19	0,62	0,59	0,59	0,63	0,55	0,56	0,63	0,57	0,59	0,55	0,60	0,59	0,58	0,66	0,52	0,66	0,49	0,59		0,59	0,65	0,74
L20	0,59	0,50	0,59	0,63	0,58	0,58	0,49	0,61	0,53	0,46	0,58	0,53	0,58	0,57	0,51	0,61	0,55	0,64	0,58		0,67	0,71
L21	0,55	0,57	0,59	0,57	0,57	0,58	0,61	0,53	0,59	0,54	0,54	0,51	0,64	0,55	0,52	0,63	0,62	0,65	0,62	0,53		0,69
L22	0,55	0,58	0,56	0,59	0,52	0,49	0,53	0,55	0,61	0,52	0,55	0,50	0,51	0,52	0,50	0,54	0,60	0,61	0,58	0,53	0,54	
L23	0,60	0,61	0,58	0,66	0,58	0,61	0,59	0,54	0,59	0,60	0,59	0,58	0,65	0,61	0,55	0,58	0,62	0,59	0,58	0,53	0,54	0,63
L24	0,55	0,59	0,55	0,63	0,57	0,55	0,56	0,58	0,61	0,50	0,55	0,53	0,62	0,58	0,50	0,63	0,57	0,64	0,54	0,53	0,62	0,51
L25	0,62	0,64	0,61	0,53	0,56	0,48	0,50	0,55	0,63	0,52	0,57	0,55	0,63	0,56	0,60	0,62	0,58	0,63	0,60	0,56	0,58	0,54
L26	0,55	0,52	0,65	0,55	0,59	0,51	0,59	0,59	0,63	0,51	0,55	0,56	0,66	0,56	0,48	0,60	0,59	0,62	0,52	0,58	0,58	0,54
L27	0,64	0,65	0,65	0,69	0,61	0,63	0,62	0,65	0,70	0,59	0,66	0,63	0,66	0,59	0,61	0,66	0,65	0,62	0,64	0,62	0,68	0,57
L28	0,66	0,56	0,67	0,62	0,55	0,58	0,57	0,64	0,61	0,58	0,38	0,52	0,68	0,63	0,61	0,74	0,66	0,68	0,68	0,60	0,67	0,61
L29	0,57	0,20	0,52	0,62	0,49	0,54	0,63	0,58	0,63	0,50	0,53	0,47	0,59	0,59	0,59	0,63	0,60	0,61	0,58	0,52	0,57	0,57
L30	0,57	0,66	0,58	0,62	0,60	0,58	0,54	0,59	0,59	0,58	0,65	0,62	0,62	0,61	0,55	0,58	0,59	0,64	0,55	0,54	0,59	0,59
L31	0,60	0,69	0,66	0,74	0,68	0,65	0,68	0,61	0,68	0,63	0,63	0,67	0,67	0,66	0,66	0,54	0,69	0,71	0,67	0,66	0,65	0,61
L32	0,52	0,58	0,62	0,53	0,58	0,56	0,55	0,58	0,60	0,54	0,58	0,57	0,66	0,60	0,45	0,65	0,57	0,61	0,52	0,57	0,59	0,55
L33	0,60	0,58	0,62	0,63	0,57	0,54	0,53	0,56	0,60	0,52	0,58	0,58	0,60	0,58	0,52	0,54	0,60	0,62	0,55	0,52	0,57	0,51
L34	0,56	0,57	0,57	0,59	0,49	0,51	0,49	0,56	0,57	0,49	0,58	0,55	0,61	0,59	0,56	0,65	0,55	0,63	0,59	0,52	0,59	0,56
L35	0,65	0,61	0,62	0,57	0,50	0,53	0,55	0,51	0,58	0,50	0,58	0,58	0,62	0,57	0,60	0,62	0,47	0,61	0,60	0,50	0,60	0,57

... continua...

TABELA 2A, Cont.

	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35
L1	0,73	0,74	0,68	0,68	0,72	0,74	0,70	0,68	0,70	0,69	0,70	0,68	0,74
L2	0,75	0,71	0,72	0,65	0,73	0,70	0,24	0,78	0,73	0,70	0,72	0,72	0,76
L3	0,69	0,70	0,72	0,75	0,68	0,70	0,66	0,70	0,66	0,73	0,79	0,71	0,77
L4	0,72	0,78	0,59	0,63	0,80	0,74	0,70	0,71	0,72	0,67	0,75	0,73	0,70
L5	0,73	0,76	0,70	0,61	0,76	0,73	0,58	0,74	0,70	0,70	0,72	0,70	0,72
L6	0,69	0,73	0,50	0,61	0,72	0,73	0,69	0,69	0,70	0,72	0,64	0,63	0,69
L7	0,74	0,74	0,71	0,73	0,65	0,74	0,74	0,69	0,74	0,69	0,69	0,64	0,76
L8	0,69	0,75	0,61	0,71	0,74	0,72	0,74	0,69	0,69	0,68	0,71	0,70	0,64
L9	0,72	0,71	0,73	0,71	0,79	0,67	0,75	0,70	0,73	0,72	0,73	0,71	0,73
L10	0,73	0,70	0,68	0,68	0,71	0,69	0,71	0,71	0,74	0,61	0,72	0,66	0,73
L11	0,62	0,72	0,74	0,72	0,70	0,40	0,69	0,73	0,69	0,68	0,74	0,72	0,74
L12	0,67	0,73	0,71	0,75	0,68	0,53	0,70	0,72	0,72	0,72	0,73	0,71	0,73
L13	0,76	0,76	0,72	0,75	0,73	0,74	0,68	0,69	0,77	0,75	0,72	0,72	0,72
L14	0,70	0,71	0,68	0,74	0,68	0,71	0,71	0,77	0,73	0,71	0,74	0,75	0,69
L15	0,76	0,70	0,71	0,62	0,71	0,70	0,73	0,70	0,74	0,50	0,73	0,69	0,73
L16	0,65	0,77	0,71	0,69	0,75	0,81	0,75	0,71	0,59	0,78	0,81	0,74	0,75
L17	0,73	0,71	0,73	0,71	0,78	0,79	0,71	0,74	0,74	0,68	0,77	0,73	0,64
L18	0,66	0,76	0,75	0,75	0,73	0,75	0,73	0,76	0,72	0,73	0,73	0,78	0,74
L19	0,68	0,69	0,72	0,66	0,71	0,71	0,71	0,70	0,70	0,84	0,76	0,66	0,77
L20	0,68	0,72	0,70	0,66	0,73	0,70	0,66	0,73	0,71	0,67	0,63	0,70	0,70
L21	0,71	0,70	0,67	0,74	0,76	0,75	0,74	0,70	0,77	0,72	0,71	0,68	0,76
L22	0,68	0,69	0,67	0,68	0,67	0,70	0,71	0,68	0,72	0,69	0,65	0,67	0,73
L23		0,75	0,72	0,72	0,76	0,71	0,75	0,69	0,45	0,71	0,66	0,74	0,71
L24	0,61		0,76	0,72	0,72	0,72	0,72	0,70	0,77	0,47	0,72	0,65	0,71
L25	0,57	0,61		0,64	0,74	0,77	0,73	0,72	0,70	0,74	0,70	0,64	0,67
L26	0,63	0,55	0,50		0,77	0,79	0,62	0,71	0,70	0,56	0,69	0,71	0,76
L27	0,63	0,58	0,64	0,64		0,48	0,79	0,65	0,81	0,73	0,72	0,70	0,77
L28	0,65	0,59	0,66	0,63	0,50		0,73	0,69	0,74	0,69	0,76	0,68	0,76
L29	0,61	0,58	0,59	0,54	0,66	0,57		0,79	0,74	0,72	0,71	0,71	0,75
L30	0,61	0,52	0,57	0,59	0,57	0,65	0,64		0,67	0,65	0,65	0,67	0,68
L31	0,49	0,65	0,57	0,68	0,76	0,73	0,65	0,60		0,74	0,70	0,77	0,79
L32	0,61	0,37	0,62	0,37	0,64	0,60	0,58	0,56	0,69		0,73	0,65	0,74
L33	0,60	0,53	0,56	0,54	0,55	0,62	0,59	0,54	0,62	0,57		0,66	0,68
L34	0,59	0,45	0,48	0,55	0,58	0,56	0,57	0,55	0,63	0,51	0,53		0,59
L35	0,57	0,59	0,45	0,62	0,66	0,61	0,64	0,57	0,61	0,63	0,56	0,43	

TABELA 3A. Distâncias genéticas entre 35 linhagens de milho medidas pelos índices de Nei e Li para o AFLP e de Jaccard para o SSR. Os dados do AFLP e SSR estão apresentadas na porção superior e inferior da diagonal, respectivamente. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	
L1	0.39	0.38	0.51	0.42	0.48	0.45	0.53	0.51	0.32	0.44	0.44	0.44	0.49	0.43	0.37	0.42	0.49	0.48	0.45	0.42	0.38	0.38	0.43	0.38	0.45	0.38	
L2	0.79	0.38	0.41	0.36	0.34	0.44	0.44	0.47	0.35	0.35	0.34	0.44	0.42	0.39	0.45	0.40	0.39	0.42	0.40	0.41	0.42	0.40	0.41	0.44	0.42	0.47	0.35
L3	0.89	0.89	0.53	0.40	0.41	0.40	0.46	0.48	0.35	0.44	0.29	0.42	0.50	0.45	0.40	0.41	0.46	0.41	0.41	0.41	0.42	0.39	0.41	0.44	0.38	0.44	0.48
L4	0.92	0.80	0.85	0.32	0.29	0.45	0.38	0.48	0.46	0.38	0.43	0.41	0.44	0.40	0.53	0.37	0.48	0.46	0.48	0.46	0.38	0.42	0.50	0.42	0.50	0.46	0.38
L5	0.92	0.80	0.84	0.72	0.28	0.43	0.40	0.45	0.42	0.38	0.35	0.36	0.46	0.41	0.47	0.38	0.43	0.38	0.38	0.39	0.40	0.35	0.41	0.40	0.38	0.42	0.40
L6	0.88	0.88	0.87	0.80	0.86	0.38	0.38	0.43	0.43	0.40	0.35	0.32	0.41	0.42	0.47	0.36	0.46	0.39	0.41	0.41	0.33	0.44	0.38	0.44	0.38	0.30	0.34
L7	0.88	0.80	0.82	0.88	0.86	0.92	0.43	0.41	0.39	0.46	0.43	0.40	0.43	0.40	0.44	0.44	0.33	0.48	0.46	0.33	0.44	0.36	0.42	0.39	0.34	0.41	0.41
L8	0.88	0.94	0.91	0.72	0.84	0.86	0.91	0.44	0.40	0.37	0.41	0.43	0.45	0.35	0.45	0.40	0.50	0.40	0.44	0.44	0.38	0.38	0.37	0.41	0.38	0.42	0.41
L9	0.80	0.82	0.90	0.90	0.88	0.90	0.90	0.94	0.90	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L10	0.88	0.92	0.82	0.91	0.88	0.88	0.94	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
L11	0.94	0.90	0.85	0.85	0.91	0.88	0.85	0.87	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
L12	0.95	0.96	0.55	0.87	0.90	0.90	0.94	0.90	0.92	0.88	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
L13	0.90	0.94	0.86	0.81	0.74	0.85	0.98	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L14	0.94	0.85	0.82	0.94	0.94	0.90	0.96	0.94	0.94	0.90	0.88	0.85	0.87	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L15	0.85	0.87	0.85	0.87	0.76	0.90	0.93	0.86	0.81	0.81	0.87	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L16	0.87	0.80	0.87	0.85	0.87	0.85	0.89	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
L17	0.96	0.92	0.87	0.85	0.88	0.83	0.94	0.86	0.96	0.94	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
L18	0.93	0.88	0.89	0.89	0.89	0.81	0.83	0.88	0.97	0.84	0.89	0.92	0.91	0.88	0.95	0.90	0.88	0.90	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L19	0.80	0.82	0.82	0.86	0.82	0.80	0.88	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
L20	0.78	0.75	0.82	0.86	0.91	0.85	0.94	0.92	0.80	0.78	0.91	0.84	0.96	0.95	0.77	0.90	0.94	0.88	0.77	0.82	0.89	0.82	0.89	0.82	0.89	0.82	0.89
L21	0.85	0.91	0.82	0.89	0.90	0.90	0.83	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L22	0.89	0.83	0.87	0.80	0.83	0.88	0.91	0.80	0.81	0.91	0.84	0.87	0.73	0.88	0.89	0.95	0.93	0.85	0.85	0.93	0.91	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87
L23	0.92	0.94	0.89	0.87	0.94	0.85	0.94	0.90	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
L24	0.94	0.88	0.91	0.80	0.92	0.89	0.92	0.95	0.95	0.88	0.94	0.93	0.86	0.92	0.90	0.93	0.94	0.90	0.93	0.90	0.94	0.88	0.91	0.82	0.87	0.87	0.87
L25	0.85	0.89	0.91	0.80	0.92	0.89	0.98	0.92	0.95	0.88	0.94	0.93	0.86	0.92	0.90	0.93	0.94	0.90	0.93	0.90	0.94	0.88	0.91	0.82	0.87	0.87	0.87
L26	0.85	0.83	0.81	0.83	0.75	0.83	0.92	0.88	0.87	0.85	0.91	0.88	0.85	0.89	0.87	0.86	0.91	0.94	0.83	0.87	0.82	0.84	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
L27	0.89	0.89	0.85	0.96	0.96	0.90	0.86	0.88	0.92	0.90	0.88	0.85	0.89	0.87	0.86	0.91	0.94	0.88	0.93	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
L28	0.89	0.82	0.85	0.92	0.94	0.92	0.87	0.83	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L29	0.89	0.41	0.86	0.87	0.78	0.89	0.82	0.94	0.94	0.98	0.92	0.98	0.87	0.91	0.90	0.88	0.94	0.88	0.94	0.86	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
L30	0.88	0.82	0.89	0.89	0.92	0.87	0.93	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88
L31	0.88	0.87	0.79	0.82	0.81	0.86	0.89	0.86	0.86	0.89	0.84	0.88	0.82	0.90	0.85	0.77	0.88	0.86	0.85	0.85	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
L32	0.89	0.85	0.86	0.86	0.87	0.91	0.81	0.85	0.89	0.78	0.87	0.90	0.91	0.91	0.85	0.75	0.88	0.82	0.85	0.85	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
L33	0.88	0.92	0.96	0.92	0.93	0.84	0.93	0.93	0.92	0.95	0.93	0.92	0.92	0.94	0.98	0.82	0.95	0.91	0.98	0.88	0.88	0.89	0.70	0.83	0.80	0.84	0.81
L34	0.87	0.90	0.91	0.83	0.85	0.85	0.87	0.81	0.91	0.91	0.90	0.91	0.80	0.95	0.88	0.89	0.85	0.96	0.85	0.92	0.87	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89
L35	0.91	0.92	0.85	0.80	0.94	0.89	0.88	0.88	0.83	0.86	0.85	0.89	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88

... continua...

TABELA 3A, Cont.

	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35
L1	0,47	0,49	0,40	0,40	0,43	0,35	0,43	0,39	0,48
L2	0,48	0,39	0,11	0,49	0,52	0,40	0,41	0,40	0,44
L3	0,48	0,50	0,35	0,41	0,49	0,45	0,45	0,40	0,45
L4	0,52	0,44	0,45	0,45	0,58	0,36	0,46	0,42	0,40
L5	0,44	0,38	0,33	0,43	0,52	0,40	0,40	0,33	0,34
L6	0,45	0,41	0,37	0,41	0,48	0,39	0,37	0,34	0,36
L7	0,35	0,40	0,45	0,37	0,52	0,38	0,38	0,32	0,38
L8	0,49	0,47	0,40	0,42	0,44	0,41	0,39	0,39	0,34
L9	0,54	0,44	0,48	0,42	0,52	0,43	0,43	0,40	0,40
L10	0,42	0,41	0,34	0,40	0,46	0,37	0,35	0,33	0,34
L11	0,49	0,23	0,38	0,48	0,46	0,39	0,41	0,41	0,41
L12	0,46	0,35	0,31	0,45	0,50	0,40	0,41	0,38	0,41
L13	0,49	0,50	0,42	0,45	0,50	0,49	0,43	0,44	0,45
L14	0,42	0,46	0,42	0,44	0,49	0,43	0,41	0,42	0,40
L15	0,44	0,44	0,42	0,38	0,49	0,29	0,35	0,39	0,43
L16	0,49	0,59	0,48	0,40	0,37	0,49	0,37	0,48	0,45
L17	0,49	0,49	0,43	0,42	0,53	0,40	0,43	0,38	0,31
L18	0,45	0,49	0,44	0,47	0,54	0,44	0,45	0,48	0,44
L19	0,48	0,51	0,41	0,38	0,50	0,35	0,38	0,42	0,43
L20	0,44	0,43	0,35	0,37	0,49	0,40	0,35	0,35	0,33
L21	0,51	0,51	0,40	0,42	0,48	0,42	0,40	0,42	0,43
L22	0,40	0,44	0,40	0,42	0,44	0,38	0,34	0,39	0,40
L23	0,46	0,48	0,43	0,44	0,32	0,44	0,43	0,42	0,40
L24	0,41	0,42	0,41	0,35	0,49	0,23	0,36	0,29	0,41
L25	0,47	0,49	0,42	0,40	0,40	0,45	0,39	0,32	0,29
L26	0,47	0,48	0,37	0,42	0,51	0,22	0,37	0,38	0,45
L27		0,33	0,50	0,40	0,61	0,47	0,38	0,41	0,49
L28	0,85		0,40	0,48	0,57	0,43	0,45	0,39	0,44
L29	0,86	0,84		0,47	0,48	0,41	0,41	0,40	0,47
L30	0,85	0,86	0,98		0,43	0,39	0,37	0,39	0,40
L31	0,92	0,86	0,92	0,82		0,52	0,45	0,46	0,44
L32	0,89	0,86	0,88	0,83	0,84		0,39	0,35	0,46
L33	0,94	0,94	0,92	0,88	0,89	0,93		0,36	0,39
L34	0,90	0,87	0,90	0,89	0,95	0,88	0,88		0,27
L35	0,95	0,95	0,90	0,91	0,96	0,92	0,89	0,86	

TABELA 4A. Distâncias genéticas entre 21 linhagens de milho com endospermas do tipo duro, calculadas com a combinação das médias dos índices de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	L1	L2	L3	L9	L10	L11	L12	L15	L16	L20	L21	L22	L23	L24	L26	L27	L28	L29	L31	L32
L2	0,61																			
L3	0,67	0,67																		
L9	0,67	0,67	0,73																	
L10	0,63	0,68	0,61	0,72																
L11	0,75	0,67	0,68	0,68	0,64															
L12	0,77	0,72	0,41	0,72	0,65	0,37														
L15	0,65	0,67	0,68	0,63	0,59	0,66	0,69													
L16	0,68	0,71	0,67	0,76	0,71	0,75	0,71	0,71												
L20	0,63	0,56	0,72	0,62	0,55	0,70	0,71	0,60	0,71											
L21	0,64	0,71	0,72	0,68	0,66	0,66	0,68	0,69	0,74	0,67										
L22	0,68	0,72	0,66	0,72	0,68	0,64	0,64	0,66	0,72	0,70	0,69									
L23	0,73	0,75	0,70	0,72	0,73	0,62	0,67	0,74	0,65	0,69	0,71	0,65								
L24	0,72	0,69	0,68	0,70	0,70	0,71	0,73	0,68	0,76	0,71	0,70	0,68	0,73							
L26	0,65	0,63	0,75	0,71	0,63	0,69	0,74	0,60	0,69	0,65	0,73	0,64	0,71	0,69						
L27	0,71	0,73	0,69	0,78	0,70	0,70	0,68	0,70	0,75	0,73	0,76	0,67	0,76	0,68	0,75					
L28	0,74	0,71	0,70	0,66	0,68	0,39	0,51	0,68	0,81	0,71	0,74	0,69	0,70	0,71	0,76	0,49				
L29	0,69	0,23	0,66	0,75	0,71	0,69	0,70	0,72	0,75	0,66	0,75	0,68	0,74	0,70	0,62	0,79	0,72			
L31	0,69	0,73	0,66	0,72	0,73	0,68	0,73	0,71	0,59	0,69	0,77	0,71	0,48	0,76	0,68	0,81	0,74	0,75		
L32	0,66	0,67	0,71	0,70	0,59	0,67	0,70	0,47	0,78	0,64	0,71	0,67	0,70	0,46	0,52	0,72	0,68	0,68	0,72	
L33	0,69	0,72	0,79	0,73	0,71	0,72	0,72	0,73	0,62	0,64	0,69	0,66	0,66	0,71	0,68	0,72	0,76	0,72	0,71	0,72

TABELA 5A. Distâncias genéticas entre 14 linhagens de milho com endospermas do tipo dentado, calculadas para a combinação da média dos índices de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

	L4	L5	L6	L7	L8	L13	L14	L17	L18	L19	L25	L30	L34
L5	0,52												
L6	0,56	0,60											
L7	0,77	0,76	0,70										
L8	0,56	0,65	0,65	0,71									
L13	0,64	0,56	0,61	0,77	0,69								
L14	0,75	0,76	0,70	0,75	0,76	0,72							
L17	0,64	0,67	0,62	0,70	0,65	0,73	0,73						
L18	0,72	0,71	0,66	0,75	0,71	0,75	0,70	0,72					
L19	0,70	0,70	0,69	0,70	0,66	0,72	0,72	0,67	0,65				
L25	0,59	0,71	0,50	0,72	0,62	0,72	0,69	0,74	0,76	0,72			
L30	0,72	0,73	0,68	0,70	0,69	0,68	0,77	0,73	0,77	0,70	0,73		
L34	0,72	0,69	0,62	0,62	0,70	0,72	0,74	0,72	0,78	0,65	0,65	0,67	
L35	0,68	0,70	0,66	0,76	0,64	0,71	0,67	0,62	0,72	0,76	0,66	0,70	0,59

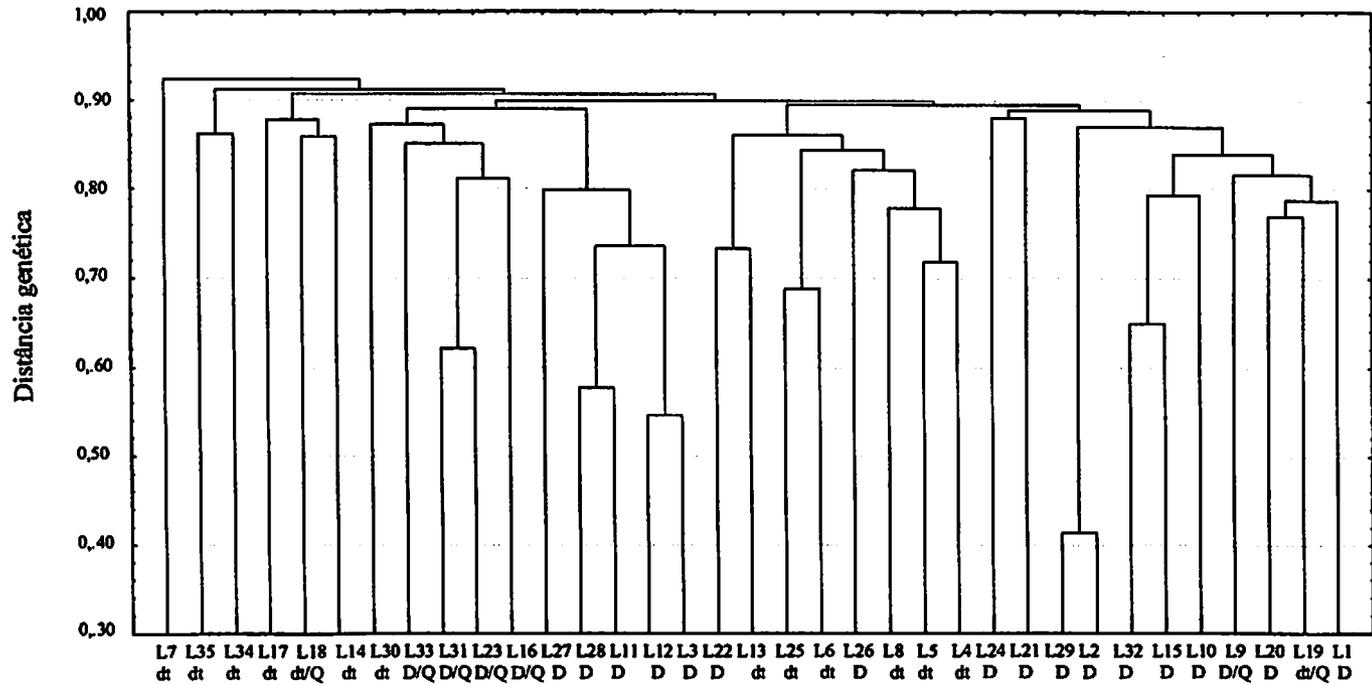


FIGURA 3B. Dendrograma de 35 linhagens de milho revelado pela análise de agrupamento UPGMA, com base no complemento dos índices de similaridade de Jaccard utilizando marcadores SSR. (dt= endosperma dentado; dt/Q= materiais QPM com endosperma dentado; D= endosperma duro; D/Q = materiais QPM com endosperma duro). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

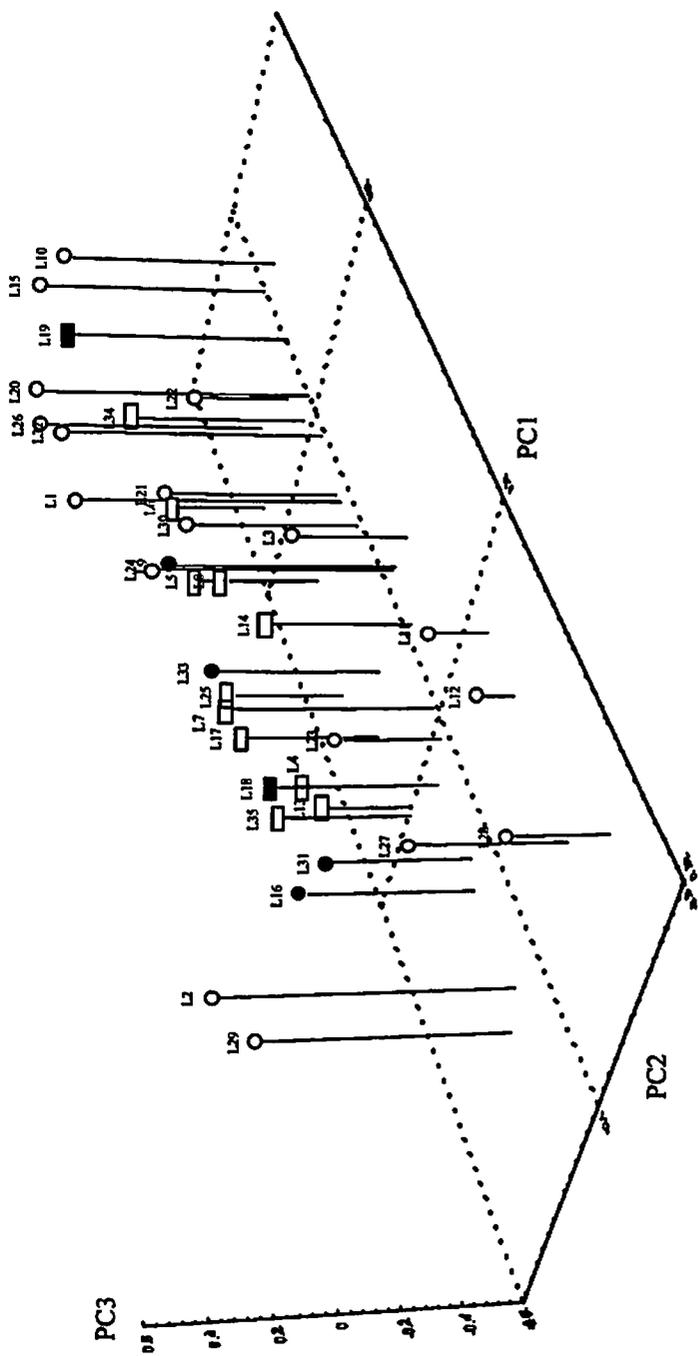


FIGURA 4B. Análise de componentes principais realizada para 35 linhagens elite de milho a partir da matriz de correlação dos complementos dos índices de similaridade de Jaccard para o AFLP e Nei e Li para o SSR. (○ = DENTADO, ■ = DENTADO/QPM, ○ = DURO, ● = DURO/QPM). Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 2002.

