

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES EM POPULAÇÕES  
DE MILHO (*Zea mays* L.), TEOSINTO (*Zea mexicana* L.)  
E EM HÍBRIDOS ENTRE AS DUAS ESPÉCIES**

Tatiana de Freitas Terra  
Bióloga/ PUCRS

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2004

À Adelaide Ondina de Freitas, minha avó.  
Meu exemplo de  
determinação,  
sabedoria e  
fé para acreditar nos sonhos...

“... O segredo é não correr atrás das borboletas.  
É cuidar do jardim para que elas venham até você...”  
(Mário Quintana)

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização desse curso e a CAPES, pelo apoio financeiro.

À Professora e orientadora Maria Jane Cruz de Melo Sereno pela compreensão da necessidade de um amadurecimento pessoal, pelo estímulo nas horas mais difíceis e por sua amizade.

À Professora e Co-orientadora Fernanda Bered pelo constante apoio e pela confiança depositada desde o desenvolvimento da pesquisa de Iniciação Científica.

Ao Professor José Fernandes Barbosa Neto pela paciência nos ensinamentos, auxílio e colaboração nos experimentos.

À Professora Maria Teresa Schifino-Wittmann pelo auxílio prestado e pela agradável convivência no desenvolvimento de parte desse trabalho.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura, pelos conhecimentos adquiridos nesse período e disponibilidade demonstrada.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Alexandra, Jaqueline e Ian pela valiosa colaboração na coleta dos dados a campo e nos laboratórios, bem como, ao colega Cícero.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal pelo companheirismo, preciosa ajuda e incentivo nos momentos de total descrença, especialmente, a Emersom, Tatiana Boff, Danielle, Paulo, Gustavo e Adriane.

Aos amigos e colegas de curso, em especial a Paula e Fernanda pela prazerosa convivência, valioso auxílio e pela paciência nos incansáveis diálogos.

Ao pessoal do Departamento de Genética dessa Universidade, Milena H., Raquel, Sílvia, Janaína, Eliane, pela amizade e, especialmente, a Clarisse pela valiosa ajuda no desenvolvimento das análises citogenéticas.

Aos amigos de antes e de sempre Toni, Joseane, Luana, Caroline, Alden e Fabíola pela constante torcida e companheirismo dos momentos mais difíceis, bem como, a Andréa, mesmo distante.

Ao Victor pela compreensão da ausência e por ter tornando os últimos meses mais tranqüilos pra mim.

Aos colegas da Secretaria Municipal de Preservação Ambiental de Canoas (SEMPA), especialmente, ao Secretário Marcos Aurélio Chedid, Alexandre, Ângela e Oscar, pela compreensão dos momentos difíceis desse trabalho e por sua amizade.

A todos familiares, tios, tias, primos e primas pela torcida e contribuição, em especial, a Geni e Regina Chiesa pelo amor, crédito e apoio incondicionais.

A irmã de sangue Siomara pelo amor, entendimento e respeito da realização de um sonho.

A irmã de escolha Letícia por seu apoio incondicional e por encher os momentos ruins de valorosa ALEGRIA, bem como, aos seus pais Walter e Thaís.

À minha mãe Maria Elena, pelo amor e apoio sem restrições, compreensão e toda retaguarda oferecida.

Ao meu pai Olimar, por ter descoberto a oportunidade de uma convivência feliz, pelo auxílio e pelo orgulho demonstrado.

E, a todos aqueles que, de alguma maneira contribuíram e acreditaram na realização desse trabalho.

# ANÁLISES CITOGENÉTICAS E MOLECULARES EM POPULAÇÕES DE MILHO (*Zea mays* L.), TEOSINTO (*Zea mexicana* L.) E EM HÍBRIDOS ENTRE AS DUAS ESPÉCIES<sup>1</sup>

Autora: Tatiana de Freitas Terra

Orientadora: Maria Jane Cruz de Melo Sereno

## RESUMO

O sucesso de um programa de melhoramento depende da qualidade do germoplasma utilizado para obter combinações de genes importantes. As combinações podem ser oriundas de hibridizações amplas, até mesmo entre espécies ancestrais. Entretanto, para a elevação constante do ganho genético em novas variedades, é fundamental que o trabalho produza continuamente populações com alta frequência de genes de interesse agrônomo. O Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande de Sul iniciou um programa de melhoramento genético de milho comum em 1998 e, posteriormente de milho doce, os quais possuem resultados significativos em diversas áreas do conhecimento científico. Em função das mutações ocorridas, existem diferenças nas propriedades texturais, forma e quantidade de endosperma dos milhos atuais, classificando-os como milho comum, milho pipoca e milho doce. O teosinto por ser uma espécie botânica relacionada ao milho pode ser utilizado como fonte de importantes caracteres agrônômicos em programas de melhoramento desse cereal, com possibilidades de hibridização e introgressão de genes. Os objetivos principais desse trabalho foram analisar citogeneticamente os genótipos de milho comum, milho doce, de teosinto e de híbridos oriundos de cruzamentos artificiais entre as populações originais, bem como, avaliar a variabilidade genética existente nessas populações e o relacionamento entre elas através da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR). De maneira geral, os dados apresentados nesse trabalho indicam que as populações apresentam comportamento meiótico regular. Os híbridos apresentam algumas anormalidades, como por exemplo, presença de univalentes, pontes e fragmentos cromossômicos sem, entretanto, prejudicar a viabilidade dos grãos de pólen. É possível afirmar que a variabilidade genética existente no teosinto é superior a apresentada pelos genótipos de milho, provavelmente, devido a sua origem silvestre. Esses resultados confirmam a semelhança entre as duas espécies e sugerem que é possível utilizar o teosinto como fonte genética de um programa de melhoramento de milho.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (66 p.) Agosto, 2004.

# CYTOGENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS IN MAIZE POPULATIONS (*Zea mays* L.), TEOSINTE (*Zea mexicana* L.) AND HYBRIDS<sup>1</sup>

Autora: Tatiana de Freitas Terra

Orientadora: Maria Jane Cruz de Melo Sereno

## ABSTRACT

The success of a breeding program relies on the quality of the germplasm used as a source for combination of important genes. Such combinations can derive from broad hybridization, even from ancient ancestors. However, for a constant increase in genetic gain in new varieties it is necessary to constantly generate populations with high frequency of agronomic trait genes. The Department of Crop Science of the College of Agronomy at the UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande de Sul) started an ordinary maize-breeding program in 1998 and, latter on, a sweet maize program, which generated significant results at different scientific fields. Due to mutations, there have been found endosperm differences concerning textural properties, shape and amount in the current maize, so that they can be classified as ordinary, popcorn and sweet maize. As teosinte is a species related to maize, it can be used as source for important agronomical traits in this grain-breeding program, allowing hybridization and gene introgression. The objectives of this work were to cytogenetically analyze the genotypes of ordinary maize, popcorn, sweet maize, teosinte and hybrids derived from artificial crossings among original populations, as well as analyze genetic variability among these populations and the relationship within them by the use of microsatellite molecular markers (SSR). Generally, the data presented in this work indicate that the populations show a regular meiotic behavior. The hybrids present some anomalies, for example, presence of univalent, bridge and chromosomal fragments however, with no harm to grain pollen viability. It is possible to assure that the existing genetic variability in teosinte is superior to that found among the maize genotype, probable due to teosinte's wild origin. These results confirm the close relation between the two species and suggest the possibility of using teosinte as source of genetic variability in a maize-breeding program.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (66 p.) August, 2004.

# SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivo Geral.....	4
1.2 Objetivos Específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1 Histórico e Evolução .....	5
2.2 Citogenética de milho comum, milho doce e teosinto .....	11
2.3 Marcadores Moleculares: caracterização de variabilidade genética, mapeamento comparativo e de caracteres de importância agrônômica .....	15
2.4 Melhoramento de populações de milho comum e milho doce: caracterização e eficiência da utilização de genótipos de teosinto.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.1 Descrição Geral.....	24
3.2 Germoplasma utilizado .....	24
3.3 Experimento a campo.....	25
3.4 Desenho experimental.....	26
3.5 Avaliações Citogenéticas .....	26
3.5.1 Coleta, fixação e estocagem do material.....	27
3.5.2 Preparo das lâminas .....	27
3.5.3 Análises do comportamento meiótico.....	28
3.5.4 Estudo das tétrades.....	29
3.5.5 Análises dos grãos de pólen.....	29
3.5.6 Análise estatística dos dados obtidos .....	30
3.6 Análises Moleculares .....	30
3.6.1 Extração do DNA total.....	30
3.6.2 Condições de PCR e Amplificação do DNA .....	31
3.6.3 Eletroforese e identificação genética. ....	32
3.6.4 Análise dos resultados obtidos.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1 Caracterização morfológica do germoplasma.....	34
4.2 Análises Meióticas .....	37
4.2.1 Comportamento Meiótico .....	37
4.2.2 Índice Meiótico .....	44
4.2.3 Análise Conjunta das fases da meiose e implicações evolutivas .....	45
4.3 Análises Moleculares .....	49
4.3.1 Padrão de distribuição dos SSR .....	49
4.3.2 Diversidade genética .....	49
4.3.3 Relacionamento Genético entre as populações.....	52
5. CONCLUSÕES .....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58



## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Cruzamentos efetuados para obtenção dos híbridos .....	26
2. Comportamento cromossômico em diacinese em genótipos de milho, teosinto e na geração F <sub>1</sub> .....	38
3. Comportamento cromossômico em metáfase I em genótipos de milho, teosinto e na geração F <sub>1</sub> .....	39
4. Comportamento cromossômico em anáfase I em genótipos de milho, teosinto e na geração F <sub>1</sub> .....	40
5. Número médio de quiasmas nos diferentes genótipos em genótipos de milho, teosinto e na geração F <sub>1</sub> .....	43
6. Índice meiótico e viabilidade de pólen .....	44
7. Estabilidade citogenética em genótipos de milho, teosinto e na geração F <sub>1</sub> .....	46
8. Descrição dos locos microssatélites e conteúdo de polimorfismo (PIC) .....	51
9. Medidas de variação genética nas populações de milho e de teosinto .....	52
10. Análise da Variância Molecular (Amova) das frequências alélicas de treze locos microssatélites nas populações de milho comum, milho doce e teosinto .....	55

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Caracterização morfológica das hibridações entre milho e teosinto ..... 36
2. Comportamento meiótico em populações de milho e em híbridos entre milho e teosinto... 41
3. Regularidade meiótica em populações de milho e em híbridos entre milho e teosinto..... 48
4. Agrupamento obtido pela matriz de distância genética, baseado no coeficiente de NEI78 (SAHN – NTSYS) ..... 54

## 1. INTRODUÇÃO

O milho comum (*Zea mays* L.) é uma das principais fontes de alimentação humana e animal, sendo consumido de diversas formas, dentre as quais as principais são a forma *in natura* e industrializada dos grãos. No Brasil, a área ocupada com o cultivo deste cereal é de aproximadamente 15 milhões de hectares e a produção é de 35mil toneladas/ano, merecendo o terceiro lugar dentre as espécies produtoras de grãos. Na região Sul, a produção de milho está fortemente voltada para criação de aves e suínos, através do consumo de rações para alimentação desses animais. Sendo assim, a lavoura de milho é de extrema importância dentro do sistema de agroindústria do país, visto que a produção interna desse cereal irá contribuir para diminuir a importação do mesmo.

Em função das mutações ocorridas e de uma forte pressão de seleção exercida pelo homem nos milhos, hoje existem diferenças nas propriedades texturais, forma e quantidade de endosperma, classificando-os como milho comum, milho pipoca e milho doce. O milho comum é mais utilizado para diferentes propósitos. O milho pipoca tem, atualmente, um mercado bastante desenvolvido, devido a sua incorporação na busca de um melhoramento genético da cultura. O milho doce é originado de mutações recessivas no endosperma do milho comum, as quais alteraram a síntese de carboidratos dos grãos, deixando-os mais doces e, conseqüentemente, mais propícios ao consumo humano (Storck & Lovato, 1991). O milho doce vem sendo usado, principalmente, como milho enlatado (após processamento pela indústria) ou como milho verde “*in natura*”. No Brasil o

consumo de milho doce ainda é bastante reduzido, devido a diversos fatores, dentre os quais está à indisponibilidade de genótipos superiores e bem adaptados às condições de cultivo do país. A superação dessas barreiras só será conseguida com programas de melhoramento genético dessa cultura. Devido ao seu enorme potencial e rentabilidade para produtores de hortigranjeiros, sua divulgação e a caracterização da variabilidade genética disponível para os programas de melhoramento de milho doce, inclusive através do uso de marcadores moleculares, é de extrema importância.

O teosinto foi determinado como o ancestral mais próximo do milho, possui espécies diplóides ( $2n = 20$ ) e tetraplóides ( $2n = 40$ ). A espécie botânica (teosinto) compreende um complexo formado pelas espécies *Zea mexicana*, *Zea parviglumis* e *Zea perennis* (Eubanks, 1999). A existência de possibilidade de hibridização do milho comum com espécies do gênero *Zea* - entre elas, o teosinto – facilita o manuseio dessa cultura, tornando possível alcançar o potencial máximo de ganho genético através de seleção para o desenvolvimento de novas variedades (Paterniani & Campos, 1999).

Tendo em vista a importância econômica e a grande diversidade dos germoplasmas de milho comum, milho doce e de teosinto, análises citogenéticas e moleculares têm um papel fundamental para o desenvolvimento de genótipos superiores em programas de melhoramento desses materiais.

Existem programas de melhoramento de milho com objetivos diferenciados em diversas regiões do Brasil, porém na região Sul os resultados são escassos. Dessa forma, o desenvolvimento de populações e de novas variedades tem sido efetuado por instituições de pesquisa como a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias) e hibridizações têm sido desenvolvidas por companhias privadas de sementes.

O Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande de Sul iniciou um programa de melhoramento

genético de milho comum a partir de 1998 e, posteriormente de milho doce, os quais possuem resultados significativos em diversas áreas do conhecimento científico. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende, entre outros aspectos, da realização inicial de estudos básicos dos recursos genéticos disponíveis. A qualidade do germoplasma utilizado para obter combinações de genes importantes, oriundos de amplas hibridizações, até mesmo através de espécies ancestrais, é essencial para o desenvolvimento de um programa de melhoramento, bem como, para a taxonomia e para genética do organismo a ser estudado (Netto *et al.*, 2002).

Em relação à genética e citogenética do milho comum, do milho doce e do teosinto, ocorre uma deficiência de informações nos genótipos cultivados no estado. Assim, os relacionamentos entre o milho comum, o milho doce e o teosinto oferecem inúmeras possibilidades de estudo, visto que essas informações servirão de base para seleção das linhas com características genéticas desejáveis (como por exemplo, a resistência a moléstias do teosinto) e citologicamente estáveis. Dentre as inúmeras informações geradas pelos estudos citogenéticos, as mais relevantes para as fases iniciais de um programa de melhoramento de plantas são: o número cromossômico, o comportamento meiótico e a viabilidade dos gametas masculinos e femininos, devido à necessidade de caracterização do germoplasma e da viabilidade dos cruzamentos efetuados, além de fornecer importantes informações sobre a evolução dos mesmos.

O emprego de marcadores moleculares vem acrescentar importantes contribuições sobre as populações envolvidas nesse trabalho, pois a variabilidade genética assume papel fundamental no progresso genético, visto que a ausência da mesma implica na inviabilidade desse componente e, como conseqüência, restringe a utilização da seleção e do ajuste das constituições genéticas aos diferentes ambientes disponíveis em um programa de melhoramento.

## **1.1 OBJETIVO GERAL**

Contribuir para os estudos citogenéticos e moleculares do milho comum, milho doce e do teosinto e avaliar o comportamento dos híbridos entre as espécies.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o comportamento meiótico e a viabilidade dos grãos de pólen das populações de milho comum, milho doce e de teosinto, bem como, de seus híbridos.

Caracterizar a variabilidade genética existente nas populações de milho comum, milho doce e teosinto.

Determinar o relacionamento genético entre essas populações através de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Histórico e Evolução**

Em 1492 foram feitas as primeiras descrições da presença do milho na costa norte de Cuba. Aparentemente, foi Cristóvão Colombo quem levou grãos de milho ao regressar à Espanha, em 1493, embora sejam prováveis contatos anteriores de europeus com o Novo Mundo (Goodman, 1987). Com a descoberta da América, provavelmente, o homem europeu teve o seu primeiro contato com esta espécie. As evidências indicam que os povos indígenas americanos iniciaram o cultivo e, conseqüentemente, a domesticação e a seleção do milho – o qual foi domesticado entre 8.000 e 10.000 anos atrás – tendo sido a principal cultura de importantes civilizações como, por exemplo, os astecas, os maias e os incas (Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999). Atualmente, além das três Américas, o milho é cultivado praticamente em todas as regiões do mundo (Goodman, 1987).

Os primeiros escritores e exploradores apresentaram descrições variadas de tipos de milho cultivados em várias partes do Novo Mundo. As primeiras descrições sugeriram que o milho era colorido e farináceo, com endosperma branco, porém essas foram seguidas de muitas outras, desde amarelos, alaranjados, até de endosperma duro e com variações de preto, vermelho ou roxo. Atualmente, o milho varia de duro a dentado e o amarelo é a coloração mais comum (Goodman, 1987).

O milho é uma espécie de fecundação cruzada, encontrada nos mais diversos ambientes, o que levou a espécie a uma grande especialização e adaptação. É uma gramínea anual, pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. Taxonomicamente é identificado como *Zea mays* L. ssp. *mays* (Machado & Paterniani, 1998; Paterniani & Campos, 1999), sendo de grande importância econômica mundial.

Durante muitos anos o milho foi considerado uma espécie diplóide que evoluiu por meio de seleção e recombinações e que possuía número cromossômico básico de dez (Mangelsdorf, 1974; Galinat, 1977; Goodman, 1978). Entretanto, existem evidências de que o milho possui uma origem alotetraplóide e que o número básico de seus cromossomos é de  $x = 5$  (Molina *et al.*, 1991; Poggio *et al.*, 1997 e Doebley *et al.*, 1997). Atualmente, a teoria mais aceita é de que um evento de poliploidização – há cerca de 11 milhões de anos – resultou na duplicação do genoma do milho e que esse evento ocorreu após a divergência entre sorgo e milho, com posterior rearranjo genômico e diploidização (Gaut *et al.*, 2000).

O possível local (ou locais) do qual o milho domesticado tenha se originado tem sido amplamente discutido, entretanto, com base nas evidências atuais, é mais provável que tenha se originado no México (Paterniani & Viégas, 1987).

Em função das mutações ocorridas, existem diferenças nas propriedades texturais, forma e quantidade de endosperma dos milhos atuais, classificando-os como milho comum, milho pipoca e milho doce. O milho comum é amplamente utilizado para diversos propósitos. O milho doce é um tipo de milho que sofreu mutações recessivas em seu endosperma, as quais aumentaram o nível de açúcares do grão (Storck & Lovato, 1991). Este caráter está condicionado por diferentes tipos de mutações no endosperma do milho comum que influenciam o metabolismo de carboidrato do grão (Tosello, 1987). Boyer & Shannon (1984) publicaram estudos que dividiram os mutantes envolvidos na



síntese de amido do milho em duas classes. A classe 1 inclui os mutantes *shrunk 2* ( $sh_2$ ), *brittle 1* ( $bt_1$ ) e *brittle 2* ( $bt_2$ ), os quais atuam nas fases iniciais da síntese e provocam grande redução na quantidade de amido presente no grão e aumento na quantidade de açúcares no endosperma. A classe 2 inclui, entre outros, os mutantes *sugary 1* ( $su_1$ ), *amilose extender 1* ( $ae_1$ ), *dull 1* ( $dl_1$ ), *sugary enhancer 1* ( $se_1$ ) e *waxy 1* ( $wx_1$ ), que atuam mais tarde na rota de síntese de amido e alteram o tipo e as proporções dos polissacarídeos armazenados no endosperma. Segundo Tracy (1997) os genes *sugary 1* e *sucrose enhancer 1* ainda não tiveram identificado o seu ponto de atuação dentro da rota metabólica de síntese de amido em grãos de milho. O caráter “doce” do milho é monogênico, ou seja, é controlado por um desses genes, os quais manifestarão as características na forma homozigota recessiva (Bandel, 1987). Na fase de grãos leitosos (milho verde), os grãos são tenros e apresentam maiores quantidades de sacarose, dextrinas e vitaminas do que o milho verde comum e, por esse motivo, ele é mais agradável ao paladar humano.

Existem diversas teorias quanto à origem do milho, porém a mais aceita, é que tenha se originado diretamente do seu ancestral teosinto (Paabo, 1999; Paterniani & Campos, 1999; Wang *et al.*, 1999). Os autores que concordam com a hipótese do milho ser descendente do teosinto, interpretam as diferenças entre o milho e o teosinto como de origens agrônomicas, sendo que, a maior diferença entre eles está na arquitetura de sua inflorescência. Existem evidências genéticas e citológicas de que o milho e o teosinto são extremamente aparentados. Ambos possuem 20 cromossomos, os quais são homólogos, e cruzam facilmente, resultando em indivíduos férteis (Paabo, 1999; Paterniani & Campos, 1999; Wang *et al.*, 1999).

Análises da composição dos knobs (estruturas celulares presentes no núcleo das células de milho, com função ainda muito discutida) foram amplamente discutidas, objetivando a resolução do problema da origem do milho (Aguiar-Perecin, 1987). A

primeira teoria que considerou os knobs importantes foi desenvolvida por Reeves & Mangelsdorf (1942), na qual o milho selvagem original era desprovido dessas estruturas e ao ser hibridizado como tripsacum (que possui vários knobs terminais), resultou em um híbrido, que retrocruzou-se com o milho e deu origem a novas variedades de milho. Portanto, os knobs que o milho e o teosinto possuem seriam originários do tripsacum. Entretanto, uma série de autores discordou desta teoria, principalmente, porque no milho e no teosinto a maioria dos knobs é intercalar e no tripsacum são terminais (Aguiar-Perecin, 1987). Com a tendência em aceitar que os knobs do milho moderno são originários do teosinto, é importante destacar que a análise dessas estruturas tem contribuído muito para resolução do problema de evolução, bem como, para correlacionar e caracterizar raças de milho (Aguiar-Perecin, 1987).

A constituição dos knobs de teosinto foi analisada na década de 70 e dados mais detalhados foram obtidos. Esses estudos em teosintos mexicanos, entre outros, permitiram importantes correlações entre milho e teosinto, onde as características em comum na constituição cromossômica e as semelhanças de constituição dos knobs, acompanhando suas distribuições geográficas, estabeleceram informações importantes (Aguiar-Perecin, 1987). Nesse contexto, Sachan & Nath (1994) analisaram a elasticidade e resistência das espigas de sete raças de milho, relacionando com diferentes números de knobs. Os resultados indicaram que espigas macias e flexíveis estavam associadas com um baixo número de knobs, refletindo um baixo nível de introgressão de teosinto.

Avaliações genéticas efetuadas no teosinto têm mostrado que os locos *tb1* do milho são os responsáveis pelas maiores diferenças morfológicas entre milho e teosinto, visto que, no processo evolutivo do milho, essas mudanças ocorreram através de pequenas alterações nesses locos.

A segregação de caracteres que diferenciam milho e teosinto foi analisada em

populações oriundas de três gerações  $F_2$  e de três retrocruzamentos entre milho e teosinto (Szabo & Burr, 1996). As análises de RFLP indicaram que o milho se diferenciou de teosinto através de mudanças em apenas cinco genes com grande efeito no fenótipo.

Diferentes hibridações foram realizadas entre raças e populações de milho e teosinto perene (*Z. diploperennis*), três espécies de teosinto anual (*Z. parviglumis*, *Z. mexicana*, *Z. luxurians*) e *Tripsacum*. Análises de RFLP indicaram que 21 locos possuem alelos comuns entre milho e *Tripsacum* que não estão presentes em teosinto, sugerindo uma evolução reticulada, com progênies oriundas de cruzamentos entre as duas primeiras espécies (Eubanks, 1999). Entretanto, inúmeras evidências mostram a participação do teosinto (*Zea mays* ssp.) na evolução do milho. Basicamente, há três hipóteses para explicar as origens do milho e do teosinto, embora para cada uma delas existam várias interpretações (Paterniani & Viégas, 1987).

A hipótese mais simples é da “origem comum” ou “evolução divergente” (Weatherwax, 1954, 1955 e Randolph, 1955, 1959, 1976), a qual sugere que o milho, o teosinto e o *Tripsacum* se originaram de um ancestral comum. A segunda hipótese sugere que o milho originou-se diretamente do teosinto, por ação da seleção humana. Essa hipótese tem sido mais aceita por diversos trabalhos que envolvem a identificação da provável raça do teosinto (Galinat, 1971, 1973, 1977, 1983, 1985 e Doebley, 1983b). A terceira hipótese é de que o teosinto pode ter se originado do milho, ou seja, “o milho como antepassado do teosinto”, a qual foi apresentada e aperfeiçoada por Mangelsdorf, em 1974 e 1983.

Embora existam certas divergências de opiniões a respeito da origem do milho, do teosinto e do *Tripsacum*, ambas as hipóteses concordam que o *Tripsacum* divergiu primeiro e que o milho e o teosinto se diferenciaram bem mais tarde. Atuais evidências botânicas, arqueológicas e trabalhos de melhoramento de plantas, demonstram que milho e

teosinto continuaram a evoluir desde aquela época. No caso do milho, a evolução foi divergente, mas muito teosinto do México sofreu introgressão do milho, de forma que alguns genótipos não podem mais ser apresentados com segurança como teosinto nos trabalhos taxonômicos e de genética (Randolph, 1976). Além disso, muitas raças de milho parecem ter sofrido introgressão com o teosinto (Wellhausen *et al.*, 1952). De qualquer forma, existem evidências genéticas e citológicas bastante contundentes de que o teosinto e o milho são muito próximos e que um entrou na rota evolutiva do outro (Doebley *et al.*, 1997).

O milho é, provavelmente, uma das espécies cultivadas com maior diversidade genética. Esta variabilidade genética está relacionada a fatores de adaptação ambiental para muitos caracteres. Isso se deve ao fato de o milho ser cultivado em distintas condições ambientais, desde o extremo norte ao extremo sul, de baixas altitudes até altitudes superiores a 2.500 m (Teixeira *et al.*, 2002). Apesar da grande diversidade apresentada pelo milho cultivado, espécies relacionadas como o teosinto, são amplamente utilizadas em hibridações artificiais, objetivando a introgressão de características agronômicas desejáveis. O teosinto possui genes de tolerância ao encharcamento, resistência a moléstias, entre outras características de interesse para o milho cultivado. Para que a condução de um programa de melhoramento genético seja coerente, é necessário conhecer os diversos tipos de germoplasma (Paterniani & Campos, 1999). A coleção de germoplasma de milho do Brasil é uma das maiores do mundo, sendo conservada em Bancos da Embrapa e do CIMMYT (Andrade *et al.*, 2002).

Atualmente, existem diversas técnicas capazes de aprimorar o processo de melhoramento genético, incluindo práticas antigas e outras mais modernas. Dentre as antigas, estão às análises morfológicas, realizadas a campo. Dentre as mais modernas,

estão as biotecnológicas, capazes de auxiliar o melhoramento genético das culturas, onde se destacam as análises citogenéticas e moleculares.

## **2.2 Citogenética de milho comum, milho doce e teosinto**

A literatura clássica sobre a junção dos conhecimentos das áreas da genética com a citologia, denominada citogenética, é definida como a correlação da genética e as características cromossômicas. Outras descrições definem a citogenética como a disciplina que diz respeito às implicações genéticas da estrutura dos cromossomos e o seu comportamento (Gill & Friebe, 1998). Essa ciência tem contribuído para a resolução de muitos problemas de evolução e dos programas de melhoramento de plantas cultivadas (Aguar-Perecin, 1987). A citogenética contribui como ciência que estuda qualquer comportamento relativo aos cromossomos, bem como, suas variações e evolução durante a transmissão (meiose). Mesmo com o advento das técnicas moleculares atuando no mapeamento e seqüenciamento dos genomas, o uso de análises citogenéticas se mantém relevante e de suma importância por diversas razões. Em primeiro lugar, devido a citogenética ser parte integrante de projetos que envolvem mapeamento. Em segundo, nas fases de mitose e meiose, os cromossomos indicam anomalias, viabilidade dos grãos de pólen, proximidade taxonômica entre espécies, entre outras informações que fazem parte de muitos estudos. Por fim, a engenharia cromossômica é uma ferramenta fundamental para qualquer programa de melhoramento de plantas, os quais continuam promovendo impactos significantes na produção agrícola (Gill & Friebe, 1998). Através dessa análise, é possível determinar o número e o comportamento dos cromossomos, os níveis de ploidia, a fertilidade dos grãos de pólen, entre outros, auxiliando na identificação e escolha de materiais para serem utilizados em cruzamentos dirigidos (Sybenga, 1993, 1998). Sendo assim, a viabilidade dos cruzamentos interespecíficos pode ser eficientemente verificada

com o uso dessa técnica, através de análises da meiose nas células-mãe de pólen, as quais fornecem informações importantes sobre a estabilidade desses cruzamentos, determinando possíveis anomalias na formação dos gametas masculinos e femininos que irão originar novas plantas.

A meiose é um evento de alta estabilidade evolutiva e em plantas alógamas, como o milho - que apresentam uma heterozigosidade natural - uma meiose normal é garantida. Se esta heterose for quebrada pela endogamia, algumas anormalidades podem ocorrer com frequência. Muitas dessas são causadas por mutações em genes ou grupos de genes que controlam cada fase da meiose. Dessa forma, a importância da análise da divisão meiótica está no fato de envolver uma série de fenômenos mecânicos e bioquímicos de considerável complexidade que se associam em relação à redução do número cromossômico. O controle meiótico foi estudado por Golubovskya (1979), que descreveu mutantes meióticos (*mei*) naturais e induzidos, os quais afetam muitas fases da meiose. Os mutantes *mei* podem induzir a esterilidade parcial ou completa dos grãos de pólen e ou do óvulo. As mutações desse tipo, não influenciam o desenvolvimento vegetativo das plantas e não alteram seus fenótipos (Golubovskya, 1989).

Muitos aspectos da genética e citogenética do milho comum puderam ser entendidos com o conhecimento do desenvolvimento do gametófito. Desvios na transmissão, segregação e ligação são muito afetados pelo desenvolvimento dessa estrutura. Sendo assim, a microsporogênese do milho foi detalhadamente descrita por Chang & Neuffer (1989), correlacionando as conseqüências dos diferentes estádios do desenvolvimento e os diferentes agentes mutagênicos com o desenvolvimento do pendão. Esses estudos resultaram na relação das mudanças morfológicas no comprimento do pendão, florete e antera com seis estádios citologicamente definidos da microsporogênese:

pré-meiose, meiose, estágio uninucleado, 1º mitose do pólen, 2º mitose do pólen e estágio de pólen maduro.

Vários trabalhos descrevem as divisões, mitótica e meiótica em milho comum, abrangendo diferentes objetivos. Dentre eles, Defani-Scoarize *et al.* (1996) publicaram um trabalho sobre a produção de híbridos em programas de melhoramento de milho e demonstraram o valor da estabilidade meiótica em linhagens para o processo de produção dos híbridos e que a mesma depende das características e do comportamento das combinações utilizadas. Em uma análise citológica realizada em coleções de *Coix* spp., *Zea mays* e teosinto (*Zea* spp), Katiyar & Sachan (1992) obtiveram cromossomos de teosinto com similares morfologias aos do milho, excluindo características cariomorfológicas comuns entre os genomas de *Coix* e *Zea*.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos envolvendo avaliações de citoplasma em híbridos de milho-teosinto, demonstrando a influência de um sob o outro, em diversas características. Ramesha & Sachan (1993) hibridizaram genótipos de *Zea diploperennis*, *Z. luxurians*, *Z. mays* subsp. *parviglumis* e algumas raças primitivas de milho com milho moderno cultivado. Os autores concluíram que a divergência citoplasmática é maior entre milho e *Zea diploperennis*, seguido de *Zea luxurians* e *Zea mays* subsp. *parviglumis*.

Poggio *et al.* (1994) analisaram genótipos que possuem o núcleo de milho e o citoplasma do teosinto, no estágio de células mãe de pólen (CMP). Os resultados apoiaram a hipótese de que cada grupo de cinco bivalentes corresponde a diferentes genomas e a viabilidade dos grãos de pólen foi estimada de 0-48% nessas linhas.

Edwards *et al.* (1996) estudaram os efeitos de diversos citoplasmas de teosinto em caracteres quantitativos de duas linhagens de milho, indicando que os genomas citoplasmáticos de teosinto interagem com genomas nucleares de milho. Entretanto, os efeitos citoplasmáticos se mostraram menores e desfavoráveis no contexto de um programa

de melhoramento de milho. Os mesmos autores transferiram citoplasmas de teosinto para linhas melhoradas com núcleos de milho comum, durante seis gerações de retrocruzamento, resultando em redução de 2,2% da produção de grãos. Entretanto, não foi observado um grande benefício na substituição do citoplasma do teosinto para o milho comum, devido aos efeitos desejáveis serem pequenos e de difícil análise nas diferentes combinações de citoplasma-núcleo.

Poggio *et al.* (1997) publicaram um trabalho igualmente importante, analisando o comportamento meiótico e o conteúdo de DNA em linhas aloplásmicas de milho. Evidenciando que, ao combinar genótipos de milho com citoplasma do teosinto (*Zea mexicana* ou *Zea mays* sbsp. *mexicana*), vários caracteres herdáveis são afetados, modificando a estrutura e a função genômica de alguns genótipos de milho.

Em um trabalho recente, Almeida (2003) encontrou uma alta estabilidade meiótica em populações de milho comum, milho doce e teosinto. Demonstrando que os híbridos entre as duas espécies apresentam algumas anormalidades, como por exemplo, presença de univalente, aderência cromossômica, dessinápse em metáfase I e pontes em anáfase I sem, entretanto, reduzir a formação de tétrades e grãos de pólen viáveis.

Almeida (2003) demonstrou que populações de milho doce podem ser uma importante opção para cruzamentos artificiais realizados com teosinto em um programa de melhoramento genético de milho. Uma vez que na utilização do teosinto como fonte de genes de interesse agrônômico para os milhos (comum e doce), é fundamental uma alta frequência de recombinação. Sendo assim, genótipos mais similares ao teosinto proporcionam maior recombinação e estabilidade meiótica nas gerações de retrocruzamento.

O melhor entendimento da conexão evolutiva de milho com teosinto e da seleção de genótipos mais estáveis ao nível citológico, abre maiores possibilidades de



utilização do germoplasma relacionado em hibridizações com o milho cultivado. Sendo de fundamental importância uma análise das diferentes populações que serão introduzidas no programa de melhoramento de milho comum e doce, uma vez que as mesmas serão parte de blocos de cruzamentos com o objetivo de aumentar o rendimento e/ ou a qualidade dos produtos a serem lançados no mercado.

### **2.3 Marcadores moleculares: caracterização de variabilidade genética, mapeamento comparativo e de caracteres de importância agrônômica**

A variabilidade genética existente na cultura do milho é bastante ampla e está organizada em grupos raciais (Brown & Goodman, 1977). Uma raça de milho foi definida como sendo um conjunto de indivíduos que apresentam certas características em comum, as quais permitem seu reconhecimento como um grupo. Em termos genéticos, é caracterizada por apresentar um significativo número de genes em comum (Anderson & Cutler, 1942).

Em milho, muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de detectar variabilidade genética entre diferentes materiais (Smith & Smith, 1988; Smith *et al.*, 1990). O entendimento dessa variabilidade encontrada nas inúmeras raças de milho que têm sido descritas é de fundamental importância para minimizar o problema de vulnerabilidade genética, bem como, para reduzir a quantidade de cruzamentos que devem ser realizados nos programas de melhoramento dessa cultura (Brown & Goodman, 1977).

Os pesquisadores têm utilizado diversas técnicas para caracterizar a variabilidade genética existente nas diferentes espécies. O emprego de marcadores moleculares, por exemplo, permite a obtenção de um número ilimitado de marcadores cobrindo todo o genoma do organismo e podem ser utilizados com diversos objetivos. O uso de marcadores moleculares tem contribuído muito na exploração das variações

genéticas para inferir sobre a história evolutiva e auxiliar no planejamento dos programas de melhoramento de milho (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Além dos estudos de caracterização da variabilidade genética, a avaliação de diferentes grupos taxonômicos em nível de DNA tem revelado similaridade entre os genes e o arranjo dos mesmos ao longo dos cromossomos, evidenciando o processo de sintenia entre esses grupos, principalmente dentre os cereais. Existem evidências da grande conservação na ordem dos genes (sintenia) envolvendo grupos taxonômicos em análises comparativas entre genomas. Muitas plantas e também animais, apresentam grande parte de seus genomas constituídos de DNA repetitivo. As seqüências de DNA repetitivo são importantes para estudos aplicados de genética, processos evolutivos e taxonômicos (Keller & Feuillet, 2000).

A utilização de marcadores moleculares também tem possibilitado o mapeamento de diversos caracteres de importância agrônômica em várias espécies (Beavis *et al.*, 1991; Siripoonwiwat *et al.*, 1996). A grande maioria dos caracteres de importância agrônômica é de herança quantitativa. Neste caso, os diversos locos envolvidos no caráter são denominados *Quantitative Trait Loci* (QTL). Em milho, a maioria das estratégias de mapeamento de QTLs está baseada na utilização de plantas F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> provenientes da autofecundação da F<sub>1</sub> entre linhagens endogâmicas (Stuber *et al.*, 1987; Beavis *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1993; Beavis *et al.*, 1994; Veldboom *et al.*, 1994; Tadmor *et al.*, 1995).

Os microssatélites (SSR – “Simple Sequence Repeats”) são seqüências curtas com um a seis nucleotídeos repetidos em tandem ao longo da molécula de DNA, as quais são flanqueadas por seqüências conservadas. Cada ilha de microssatélites constitui um loco genético altamente variável, multialélico, com um elevado conteúdo informativo de polimorfismo e se apresentando estável ao longo das gerações (Taramino & Tingey, 1995;

Ferreira & Grattapaglia, 1998; Sharopova *et al.*, 2000; Padilha *et al.*, 2002). Em plantas, os sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases, sendo o elemento mais comum o di-nucleotídeo AT. As regiões contendo as seqüências simples repetidas são amplificadas através da reação da polimerase em cadeia ou PCR (*polimerase chain reaction*), utilizando-se um par de *primers* específicos (20 a 30 pares de bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco. A detecção das seqüências SSR via PCR, é feita em gel de eletroforese utilizando-se poliacrilamida ou agarose especial de alta resolução. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente, por coloração com brometo de etídeo ou nitrato de prata ou ainda, através de autoradiografia, utilizando *primers* marcados com radioisótopos na reação de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Analisando a evolução dos microssatélites, Li *et al.* (2002) desenvolveram um esquema para demonstrar as possíveis funções do microssatélites e os seus efeitos, os dividindo em 3 grupos: 1) Organização da cromatina: organização do cromossomo, estrutura do DNA, centrômero e telômero; 2) Regulação do processo metabólico do DNA: replicação do DNA, recombinação, sistema de reparo e ciclo celular e 3) Regulação da atividade genética: transcrição e tradução.

Uma das aplicações da análise da divergência genética é identificar os genitores mais distantes, objetivando maximizar a heterose, após o cruzamento. Na cultura do milho, em geral, pode ser encontrada uma forte associação entre a divergência genética obtida por marcadores moleculares e a obtida por meio de caracteres agrônômicos, sendo que uma não substitui a outra (Melo *et al.*, 2001). Em um estudo realizado com milho doce, no entanto, foi avaliado o grau de associação entre marcadores microssatélites e

caracteres agronômicos, através de um teste de correlação, revelando que os marcadores estavam pouco correlacionados com os mesmos (Amorim, 2002).

Segundo Laborda *et al.* (2001), marcadores microssatélites possuem grande aplicabilidade devido ao multialelismo, à distribuição randômica e uniformidade no genoma, bem como, ao padrão de herança codominante. Esses pesquisadores ressaltaram ainda que, com base em valores de divergência genética, provenientes de dados de marcadores microssatélites, é possível avaliar diversos genótipos e prever os melhores cruzamentos, reduzindo drasticamente esforços e custos em programas de melhoramento genético.

Para Lubberstedt *et al.* (1998), microssatélites são bastante úteis na detecção de variabilidade genética em genótipos proximamente relacionados e não tão adequados para utilização em espécies geneticamente mais distantes, quando comparado ao RFLP, por exemplo. Porém, são amplamente utilizados para os mais diversos estudos em nível de DNA.

Neste contexto, Wang *et al.* (2002) examinaram 10 locos de microssatélites com o objetivo de genotipar mães e pais de milho híbrido, o que pode contribuir muito para a verificação da genealogia em híbridos comerciais e em cruzamentos de programas de melhoramento. Também, Gethi *et al.* (2002) analisaram a diversidade genética entre e dentro de linhagens de milho de diferentes origens usando marcadores moleculares microssatélites.

Em milho doce, Tadmor *et al.* (1995) mapearam o mutante *sugary enhancer 1* utilizando marcador molecular do tipo RFLP. Katzir *et al.* (1999) identificaram regiões cromossômicas que afetam o fenótipo *sugary enhancer* através de marcadores do tipo RAPD. Outras características de qualidade em milho doce, como aquelas associadas a propriedades químicas e sensoriais foram mapeadas por Azanza *et al.* (1996).

Diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados considerando as aplicações já referidas. Dentre eles, os marcadores do tipo microssatélites têm se revelado eficiente na diferenciação e agrupamento de linhagens de milho, na análise de sintenia e mapeamento de caracteres de importância agrônômica (Smith & Smith, 1988; Smith *et al.*, 1990; Beavis *et al.*, 1991; Siripoonwiwat *et al.*, 1996). Quando comparado a outros sistemas que utilizam PCR, como por exemplo, o RAPD, os SSR apresentam algumas vantagens. São marcadores co-dominantes, capazes de identificar heterozigotos, a técnica exibe alta reprodutibilidade, tem a capacidade de distinguir vários alelos para o mesmo loco (multialelismo) e possuem elevados conteúdos de informação de polimorfismo (PIC), fazendo com que esse tipo de marcador seja ideal para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além disso, existem inúmeros *primers* que flanqueiam locos microssatélites de milho que já estão disponíveis na literatura, o que facilita a utilização deste marcador molecular.

#### **2.4 Melhoramento de populações de milho comum e milho doce: caracterização e eficiência da utilização de genótipos de teosinto**

Em um programa de melhoramento, duas etapas são cruciais: a primeira envolve o processo de caracterização de germoplasma, identificando a variabilidade genética disponível, e a segunda está relacionada com o processo de seleção das plantas ou populações que melhor correspondem aos objetivos do melhorista (Netto *et al.*, 2002).

O programa de melhoramento genético de milho comum e de milho doce, ao qual esse projeto está vinculado, está envolvido com as análises das características citogenéticas, moleculares e agrônômicas para a produção de populações com elevado grau de variabilidade genética.

O melhoramento genético tem contribuído decisivamente para o aumento da qualidade e rendimento de grãos na cultura do milho. Entretanto, para a constante elevação do potencial genético em novas variedades, é fundamental que o trabalho produza continuamente populações com alta frequência de genes de interesse agrônomico.

Em programas de melhoramento que buscam a obtenção de híbridos, é necessário um germoplasma que apresente boa capacidade combinatória, que resultará na formação de boas populações, as quais servirão de base para a extração das linhagens. A avaliação da divergência genética pode servir como uma ferramenta adicional na escolha dos genitores, para a obtenção das melhores combinações híbridas e é um método que vêm sendo usado por diversos melhoristas (Melo *et al.*, 2001a; Netto *et al.*, 2002).

A seleção dos indivíduos que apresentam o genótipo desejado em uma população de plantas é uma tarefa que representa um desafio para o melhorista. Segundo Heiser (1988), o processo de seleção vem sendo realizado pelo homem desde os primórdios da humanidade, quando as plantas já eram escolhidas pelo seu sabor, aroma e aspecto (seleção inconsciente). Segundo Netto *et al.* (2002), a caracterização dos acessos em bancos de germoplasma através da avaliação das variáveis morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares é de grande importância para o melhorista no estabelecimento de estratégias de cruzamentos e seleção em programas de melhoramento de plantas.

Diversos métodos de melhoramento de populações têm sido empregados no melhoramento de milho (Paterniani & Miranda Filho, 1987), entretanto, esses métodos variam, principalmente, de acordo com o momento e o tipo de seleção que será realizada. Além de uma série de variáveis interligadas à seleção que podem comprometer o sucesso de um programa. Assim, embora no presente estudo, não tenham sido avaliadas as características agrônomicas apresentadas a campo pelas populações de milho e de teosinto, é fundamental salientar alguns trabalhos relacionados a essas investigações, buscando

evidenciar a importância do teosinto em um programa de melhoramento de milho comum e milho doce.

Tabosa *et al.* (2000), avaliaram peso de espigas com palha (PECP), peso de espigas sem palha (PESP), floração, peso da matéria seca do restolho (PMSR), índice de rendimento e altura de planta. Podol'skaya (1988) analisou o diplóide *Zea diploperennis* em programas de melhoramento de milho, identificando que os híbridos entre milho e teosinto apresentavam número diplóide de cromossomos de  $2n = 20$  e poderiam hibridizar sem barreiras reprodutivas. Pasztor & Borsos (1990) analisaram a herança e composição química de híbridos de milho x teosinto (*Zea mays* sbsp. *mexicana*). Os híbridos F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> foram superiores em estatura em relação aos pais e cerca de 40 a 50 % dos F<sub>1</sub> foram similares ao teosinto, com bastante perfilhamento. Os fenótipos principais foram relacionados como precoces ou muito precoces, com alguma resistência a fusarium (*Fusarium moniliforme*), broca (*Ostrinia nubilalis*) e conteúdo superior de lisina, entre outras características. Estes resultados mostraram a importância de genótipos de teosinto para o melhoramento de milho.

Uma variedade de teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) foi identificada por Sohoo *et al.* (1993), se tornando importante por apresentar genes de resistência a broca de milho e por ser menos suscetível a mancha da folha causada por *Curvularia trifolii* e *Pyricularia* spp. Esta cultivar também produziu 26 % mais de matéria seca e 14,9 % mais grãos.

Gevers & Lake (1994) analisaram o gene GLS1 para resistência a moléstia causada pelo fungo *Cercospora - zae - maydis*, uma doença que está aumentando em importância em países onde o clima é quente e úmido. A resistência foi encontrada em genótipos de linhagens de milho da África do Sul, em duas fontes de teosinto anual (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e em um tipo de milho com espigas terminais, geneticamente

recessivo. Os resultados obtidos indicaram a possibilidade de introgressão deste caráter em germoplasmas cultivados de milho.

Diferentes trabalhos têm mostrado que alguns caracteres agronômicos importantes não foram selecionados pelo homem durante a domesticação (Swarup *et al.*, 1995). Segundo esses autores, genes para alto conteúdo de metionina não foram selecionados de teosinto para o milho moderno e poderiam ser aproveitados para melhoramento genético dessa cultura. Por outro lado, o teosinto e algumas populações de milho mostraram maior sensibilidade ao alumínio quando comparadas com outros genótipos da mesma espécie (Llugany *et al.*, 1994) mostrando assim a importância de testar diferentes introduções desses germoplasmas em programas de melhoramento.

Zhou *et al.* (1997) desenvolveram quatorze linhagens após oito gerações de autofecundação e seleção de um cruzamento entre milho e teosinto. As linhas foram resistentes a moléstias, insetos e a estresses ambientais. Os híbridos com milho, usados como testadores, mostraram forte heterose, indicando a potencialidade de hibridização entre milho e teosinto para ampliar o germoplasma de milho.

Onze linhas de milho Havaiano foram cruzadas com teosinto diplóide perene (*Zea diploperennis*) identificados no México. Os híbridos F<sub>1</sub> apresentaram caracteres de espiga intermediários entre os pais, com fileiras de quatro grãos por espiga. A geração F<sub>2</sub> mostrou uma ampla segregação e houve também uma rápida reversão ao tipo do milho cultivado através de poucos retrocruzamentos. Esse resultado se mostra promissor, uma vez que possibilita a transferência de genes de resistência a moléstias e insetos do teosinto para o milho, com possibilidade de rápida recuperação do tipo domesticado (Srinivasan & Brewbaker, 1999).

De maneira geral, os caracteres de importância agronômica apresentam herança complexa, determinando o uso de métodos trabalhosos de seleção. Atualmente, é possível



se fazer seleção direta no DNA. Nesse sentido, o emprego de marcadores moleculares apresenta grande potencial de utilização através da seleção assistida, a qual poderá representar um incremento no desenvolvimento de novos genótipos. Os marcadores moleculares permitem, entre outras aplicações, o desenvolvimento de mapas genéticos que proporcionam a cobertura e análise completa de genomas; a localização de regiões cromossômicas que controlam caracteres de importância; e a canalização de toda esta informação para uso em programas de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Sendo assim, fica evidente que o teosinto tem potencial para ser utilizado como fonte de importantes caracteres agronômicos em programas de melhoramento de milho comum e milho doce, com possibilidades de hibridização e introgressão de genes.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Descrição Geral**

Foram conduzidos experimentos a campo e nos laboratórios da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada em Porto Alegre – RS. O material experimental foi semeado na mesma Faculdade, no período de outubro a novembro de 2002 e, durante o período de inverno, o mesmo foi enviado para a Universidade Federal de Alagoas, em Maceió, com objetivo de assegurar uma maior probabilidade de obtenção de sementes. Os cruzamentos artificiais entre as populações de milho e de teosinto foram realizados durante o período agrícola (dezembro de 2002 a fevereiro de 2003).

Para realização dos estudos meióticos e moleculares, as atividades foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, respectivamente, no Departamento de Plantas de Lavoura. Foram analisadas as características citogenéticas e moleculares de populações de milho comum, milho doce e de teosinto, bem como, da progênie  $F_1$  oriunda de cruzamentos realizados entre as duas espécies.

#### **3.2 Germoplasma utilizado**

Foram utilizados genótipos de milho comum, milho doce, teosinto e da progênie  $F_1$  originária dos cruzamentos interespecíficos (milho comum x teosinto e milho doce x teosinto). Os genótipos de milho comum pertencem às populações Suwan e Pampa, os de milho doce pertencem as BR400, BR402 e DO1880. Foi também utilizada a

população de um cultivar de milho comum híbrido (AS3466). O teosinto consta de uma amostra comercial, identificado como pertencente à espécie botânica *Zea mexicana*. As populações são provenientes da EMBRAPA – Centro de Pesquisa de Milho e Sorgo, no município de Sete Lagoas, em Minas Gerais e Centro de Pesquisa de Clima Temperado, em Pelotas, Rio Grande do Sul.

A escolha dos genótipos foi baseada em resultados obtidos previamente pelo setor de melhoramento genético de milho (ano agrícola de 2001/ 2002), desta universidade.

### **3.3 Experimento a campo**

Esse experimento teve por objetivos principais a obtenção de híbridos  $F_1$  e  $F_2$ , além de material para a realização das análises meióticas de compatibilidade dos cruzamentos efetuados e para verificação da viabilidade dos grãos de pólen. Foram obtidas sementes de populações de milho comum, milho doce e de teosinto, bem como, de híbridos  $F_1$  e  $F_2$ , no ano agrícola de 2001/ 2002. O período de semeadura e coleta do material em fase de desenvolvimento vegetativo, para realização das análises citogenéticas, compreendeu os meses de outubro de 2002 a janeiro de 2003. Os cruzamentos e as autofecundações foram realizados na Faculdade de Agronomia em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, durante o período agrícola de reprodução. O teosinto foi utilizado como genitor masculino e o milho como genitor feminino (Tabela 1). O controle dos cruzamentos foi feito manualmente, com a proteção das espigas, através de sacos plásticos, antes da emissão dos estigmas, objetivando evitar a polinização das plantas com pólen indesejável. O pólen utilizado nos cruzamentos foi proveniente de uma mistura de pólenes de todas as plantas de cada população. Após os cruzamentos, as espigas foram protegidas com o auxílio de sacos de papel, visando evitar contaminações com pólen de outra população, assegurando assim, a confiabilidade do híbrido.

Tabela 1: Cruzamentos efetuados para obtenção dos híbridos.

<i>Híbrido</i>	<i>Macho</i>		<i>Fêmea</i>
<b>A</b>	Teosinto	<i>x</i>	milho doce (BR400)
<b>B</b>	Teosinto	<i>x</i>	milho doce (BR402)
<b>C</b>	Teosinto	<i>x</i>	milho comum (Suwan)
<b>D</b>	Teosinto	<i>x</i>	milho comum (Pampa)

### 3.4 Desenho experimental

As populações foram semeadas seguindo um delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, utilizando 16 linhas em cada bloco (quatro linhas por população), com espaçamento de 0,5m entre linhas e 0,3m entre plantas. A semeadura do material foi feita no mês de outubro de 2002, utilizando 3 sementes por cova. Após o período de germinação, foi efetuado um desbaste, visando à permanência de uma única planta por cova. Cada parcela foi constituída por duas linhas de 5m de comprimento, espaçadas 0,5m, em um total de 10m<sup>2</sup>.

### 3.5 Avaliações Citogenéticas

As análises para estudos da meiose e de viabilidade dos grãos de pólen foram realizadas no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS. Seguindo os seguintes passos:

#### 3.5.1 Coleta, fixação e estocagem do material

O material foi coletado no período de Dezembro de 2002 a Janeiro de 2003, na Faculdade de Agronomia dessa Universidade, em Porto Alegre – RS.

No período de florescimento, foram coletadas anteras do número máximo de inflorescências (pendões) disponíveis por parcela em fases diversas de desenvolvimento da microsporogênese. Para a análise meiótica, o material foi coletado durante o estágio de desenvolvimento vegetativo, ou seja, na fase anterior a emissão das inflorescências. Para análise da viabilidade dos grãos de pólen, foram utilizadas inflorescências próximas a fase de antese. O material foi fixado em solução Carnoy (3 partes de álcool etílico 99% : 1 parte de ácido acético glacial) e mantido pelo período de 24h, em temperatura ambiente para, posteriormente, ser transferido para álcool 70% e mantido a uma temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a confecção das lâminas para as análises.

### **3.5.2 Preparo das Lâminas**

As lâminas foram confeccionadas pelo método de esmagamento (Lewis & John, 1964), utilizando o corante carmim propiônico na concentração de 0,6% para visualização das células em divisão meiótica. As inflorescências foram transferidas para uma placa de Petri contendo álcool 70%, em cada ocasião de preparo das lâminas. Um botão floral (espiguetas) foi retirado e colocado sobre uma lâmina para que, com auxílio de lupa e agulha histológica, as três anteras fossem separadas. Com um conta-gotas foi colocado o corante carmim propiônico sobre as anteras que, posteriormente, foram esmagadas com uma lanceta, sendo retirados e eliminados os fragmentos maiores das mesmas com o auxílio de pinças, mantendo apenas o corante e os meiócitos. As anteras foram cobertas com uma lamínula e a lâmina foi suavemente aquecida sobre a chama de uma lamparina. Para observar as fases da meiose, as lâminas foram colocadas entre um pedaço de papel filtro e as lamínulas foram pressionadas fortemente contra as mesmas, para obter um melhor espalhamento das células e dos cromossomos. Cabe salientar que,

para análise de tétrades e de grãos de pólen, deve se evitar esse procedimento, pois o esmagamento danifica o material.

As lâminas foram seladas com luto (breu e cera de abelha na proporção de 1:1), identificadas e, posteriormente, observadas ao microscópio óptico. Para identificação da meiose e grãos de pólen imaturos, a avaliação foi realizada no dia seguinte ou no máximo sete dias após o preparo das lâminas, enquanto que as lâminas preparadas para análise de grãos de pólen maduros foram analisadas no mesmo dia.

### **3.5.3 Análises do comportamento meiótico**

Os estudos foram realizados em células mãe de pólen que se encontravam em fases diferenciadas de divisão. Cada parcela foi representada com duas lâminas por inflorescência e, para cada genótipo, foi analisado o maior número de células possíveis. Durante a meiose, foi reservada especial atenção às fases de Diacinese e Metáfase I, objetivando a análise do pareamento cromossômico. Foram registradas como células com comportamento irregular àquelas que não apresentavam todos os seus cromossomos em associações bivalentes. Foi analisada também a frequência de quiasmas obtidos por célula. Nas fases de Anáfase I, foram observadas a disjunção dos cromossomos e sua migração para os pólos da célula, registrando células que apresentavam cromossomos retardatários, pontes e disjunção irregular. O maior número de células encontradas por lâmina em Diacinese, Metáfase I e Anáfase I foi analisado.

As análises foram realizadas com auxílio de um microscópio óptico. O aumento de 40X foi utilizado para varredura das lâminas, enquanto o aumento de 100X foi utilizado para análise mais detalhada das células e contagem dos cromossomos. As imagens dos cromossomos foram capturadas com o auxílio de um programa de captação de

imagens (Sistema Digital de Imagens – SDI), o qual permitia uma observação detalhada das células.

#### **3.5.4 Estudos das tétrades**

Visando a complementação das análises meióticas, Love (1949) sugeriu a utilização do Índice Meiótico - o qual representa a porcentagem de quartetos de pólen normais – como indicador de regularidade meiótica. Foi calculado o Índice Meiótico, através da divisão do número de tétrades normais pelo número total de tétrades observadas por lâmina e multiplicadas por 100, conforme descrito pelo mesmo autor.

Foram consideradas como tétrades normais às células que apresentavam quatro micrósporos de tamanho iguais e anormais as que apresentavam número diferente de quatro e/ou tamanhos desiguais e presença de micronúcleos. Foram analisados, pelo menos 100 quartetos de cada população, bem como, das hibridizações realizadas.

#### **3.5.5 Análises dos grãos de pólen**

A viabilidade dos grãos de pólen foi estimada de acordo com a capacidade de coloração dos mesmos com o corante carmim propiônico. Foram considerados viáveis os grãos que apresentaram a coloração vermelha, de tamanho normal, enquanto que os inviáveis apresentaram ausência de coloração. Foram preparadas duas lâminas de cada inflorescência, sendo que 200 grãos de pólen foram analisados por lâmina, em um total de 400 grãos por tratamento, em cada repetição. O percentual de grãos de pólen viáveis foi estimado, através da divisão do número de grãos corados pelos observados por lâmina e multiplicados por 100.

### 3.5.6 Análise estatística dos dados obtidos

Os resultados foram submetidos ao teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as fases observadas e à análise de variância (ANOVA) e, em caso de significância nas médias de *crossing-over* obtidos, as mesmas foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

### 3.6 Análises Moleculares

Foram estudadas nesse experimento, duas populações de milho comum (Pampa e Suwan), duas de milho doce (BR400, BR402) e uma de teosinto. Foram utilizados marcadores moleculares do tipo microsátélites (SSR) para avaliar a distância genética entre as populações. Foram utilizados pares de *primers* diferentes daqueles utilizados em estudos realizados anteriormente no Departamento de Plantas de Lavoura, dessa Universidade, o que possibilitará uma maior cobertura do genoma das mesmas.

#### 3.6.1 Extração do DNA total

As extrações de DNA foram feitas, individualmente, em folhas jovens de 20 plantas de cada população (30 dias após a emergência), segundo metodologia descrita por Anderson *et al.* (1992). A extração do DNA de cada planta foi efetuada previamente, conforme protocolo descrito por Saghai-Marrof *et al.* (1984), durante o período de desenvolvimento da dissertação de mestrado do engenheiro agrônomo MSc. Cícero Carlos de Souza Almeida. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™), em que a concentração do DNA total foi determinada pela fórmula:

$$A_{260} \times 100 \times 50 / 1000 = \mu\text{g de DNA} / \mu\text{l de solução}$$



Onde:

A = absorvância a 260 nm;

50 = fator de conversão para solução de 50 µg/ ml para dupla fita de DNA;

100 = fator de diluição

**A qualidade do DNA foi determinada pela relação  $A_{260}/A_{280}$  nm.**

### **3.6.2 Condições de PCR e Amplificação do DNA**

Foram utilizados conjuntos de *primers* específicos para amplificação das regiões de microssatélites (SSR) já mapeadas em milho. As reações foram preparadas em um volume total de 20 µl cada, contendo tampão para PCR 10 x (Tris HCl 20mM, KCl 50mM), magnésio-MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), nucleotídeos-dNTPmix (0,2 mM), *primer* direto (0,3 mM), *primer* reverso (0,3 mM), enzima *Taq* polimerase (1U), DNA genômico (60 ng) e água ultrapura até completar o volume total da reação. Foram utilizados treze (13) pares *primers* escolhidos a partir do Banco de dados genéticos de milho (Maize Genome Database – [www.agron.missouri.edu](http://www.agron.missouri.edu)) procurando avaliar locos em todos os cromossomos. O DNA foi amplificado em termociclador PTC – 100<sup>tm</sup> (MJ Research, Inc) com um programa do tipo *touchdown*, constituído de 18 ciclos de 1 minuto com temperatura de 94 °C seguidos de um decréscimo de 1 °C a cada 2 ciclos (de 69 °C a 60 °C) e 1 ciclo de 1 minuto a 72 °C. Após, foram realizados 20 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 60 C por 1 minuto e 72 °C por mais um minuto. No final, as amostras foram submetidas a 72 °C por 5 minutos.

### 3.6.3 Eletroforese e identificação genética

O material amplificado foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6% (19:1 – acrilamida:bisacrilamida) com sistema de tampão Tri-Borato pH 8,3 (TBE) e potência constante de 85 Watts, durante 2 ou 3 horas. O tamanho de cada fragmento revelado foi estimado por comparação com DNA padrão de peso molecular conhecido (DNA Ladder de 100pb – Invitrogen). As placas utilizadas para o suporte do gel foram tratadas com solução aderente (Bind Silane) e repulsora (Repel Silane) da Amershan. Após a eletroforese, foram feitas a fixação, coloração e revelação dos fragmentos presentes no gel, segundo o protocolo Silver Sequence™ da Promega Corporation (1996), no qual soluções de nitrato de prata e de carbonato de sódio são utilizadas para coloração e revelação, respectivamente. A análise dos fragmentos revelados foi realizada sob lâmpada fluorescente e as imagens foram capturadas através do uso do programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

### 3.6.4 Análise dos resultados obtidos

Foram analisados os números de alelos por loco, frequência dos alelos nas populações, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) – obtido através da expressão:

$$\text{PIC} = 1 - \sum p u^2$$

Onde:

$\sum p u^2$  é o somatório da frequência do alelo  $u$  elevado a segunda potência.

A diversidade genética dentro de cada população foi calculada utilizando dados de uma matriz binária baseada no coeficiente de Jaccard, obtido pela expressão de Dias (1998):

$$D = 1 - (a/n - d)$$

Onde:

$a$  é o número de coincidências positivas;

$n$  é o tamanho da amostra;

$d$  é o número de coincidências negativas.

A matriz de distância genética de NEI78 foi utilizada para gerar o dendograma através do procedimento SAHN do aplicativo NTSYS (Rohlf, 2000). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada com o software WinAmova (Excoffier *et al.*, 1992).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica do germoplasma

A caracterização morfológica do germoplasma ficou dificultada devido a efeitos ambientais nos anos de 2002 e 2003. No período de desenvolvimento vegetativo das plantas, houve temperatura elevada e baixos níveis pluviométricos, fatores esses que impossibilitaram as hibridizações em algumas populações de milho e teosinto. Também foi observada uma assincronia no desenvolvimento entre os genótipos em estágio de reprodução, embora os mesmos tenham sido semeados em épocas diferenciadas, a fim de viabilizar a hibridização artificial. O estresse ambiental, provocado pelo calor e seca anormais, alterou o desenvolvimento vegetativo do milho e do teosinto. Foi constatada ausência de gametas masculinos, provavelmente, devido às altas temperaturas registradas no período. Bodanese – Zanettini *et al.* (1979) observaram que, em cultivares de trigo, choques de temperatura elevada durante o período meiótico de desenvolvimento podem inviabilizar a formação de gametas, bem como, ocasionar em uma completa supressão do processo meiótico. A Figura 1(A, B, C e D) exemplifica o baixo índice de formação de grãos encontrados nas progênies F<sub>1</sub> formadas entre milho e teosinto, e semeadas nesta Universidade.

As autofecundações foram efetuadas nesta Universidade durante o período agrícola de 2002/ 2003, com o objetivo de obtenção de uma geração F<sub>2</sub> e, nos meses de inverno, as sementes foram enviadas para o Centro de Ciências Agrárias da Universidade

Federal de Alagoas. A germinação da geração F<sub>2</sub> foi extremamente baixa nos dois locais, impossibilitando o desenvolvimento das plantas até o estágio adulto. Os resultados indicam barreiras em nível genético, molecular entre milho e teosinto, além de uma situação de estresse ambiental. De acordo com Evans & Kermicle (2001) o gene ou o grupo de genes denominados *teosinte crossing barrier 1 (Tcb1)*, restringe a compatibilidade de cruzamentos entre milho e teosinto. O gene foi mapeado a uma distância de 6 cM do gene *sugary-1* no cromossomo 4 e pode ser expresso de diversas maneiras, dependendo dos genótipos parentais e da forma de polinização. Entretanto, ambas as manifestações possibilitam o reconhecimento fisiológico entre pólen e pistilo que carregam o gene e, assim, a produção de uma resposta de incompatibilidade.

Foram obtidos números superiores na formação de grãos das progênes oriundas de retrocruzamento (RC<sub>1</sub> e RC<sub>2</sub>) utilizando pólen da geração F<sub>1</sub> de algumas populações e um *pool* de pólen de populações de milho doce como progenitores masculinos (Figuras 1E e F), entretanto, as mesmas não foram utilizadas nas análises devido ao baixo número de progênes adquiridas. Almeida (2003) também obteve resultados positivos para o milho na formação de gerações de retrocruzamento, demonstrando que essas barreiras são quebradas (pelo retrocruzamento para o milho) e as populações são recuperadas, tornando possível à obtenção de indivíduos adultos.

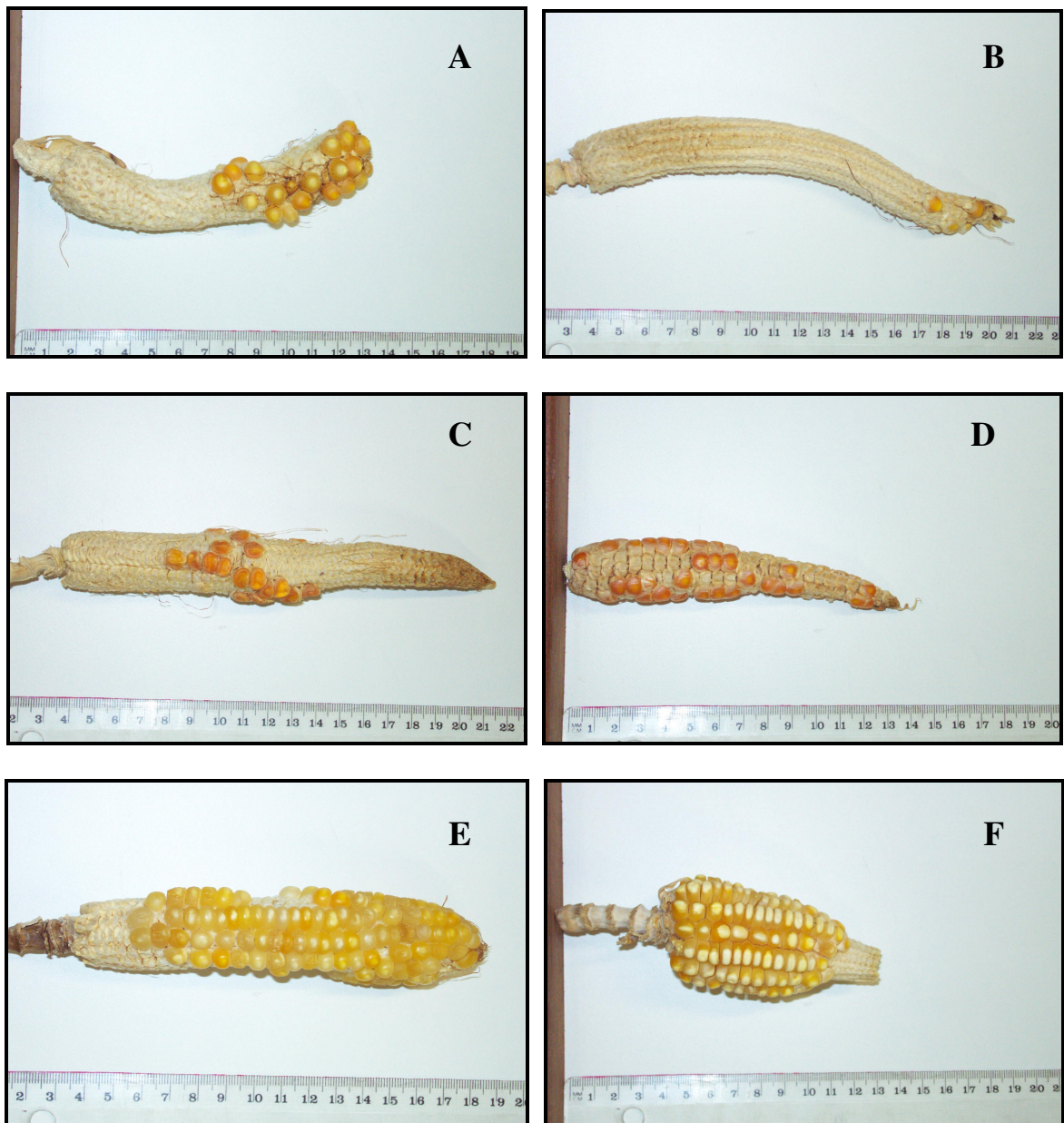


Figura 1 – Caracterização morfológica das hibridações entre milho e teosinto. Geração  $F_1$  de suwan x teosinto (A), de pampa x teosinto (B), BR400 x teosinto (C e D) e gerações de retrocruzamento  $RC_1$  com BR402 (E) e  $RC_2$  com *pool* gênico (F). Faculdade de Agronomia –UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

## 4.2 Análises Meióticas

### 4.2.1 Comportamento Meiótico

A análise do pareamento cromossômico das populações de milho comum, milho doce e teosinto e da geração  $F_1$  – formada a partir de cruzamentos realizados entre milho e teosinto – foi realizada nas seguintes fases da meiose: diacinese, metáfase I (Tabelas 2 e 3). A escolha dessas fases foi realizada devido à facilidade de visualização dos cromossomos e das associações que os mesmos apresentam, além de possibilitar o registro dos quiasmas e de algumas anomalias. Foram observados 10 bivalentes associados (Figuras 2A e C), concordando com o número de bivalentes encontrados por Chang & Neuffer (1988) na análise detalhada da microsporogênese do milho e por Poggio *et al* (2000) nas análises de seqüências repetitivas usadas como marcadores citológicos do relacionamento evolutivo no gênero *Zea*. Em anáfase I (Tabela 4) foram observadas a disjunção dos cromossomos e sua migração para os pólos das células, registrando as células que apresentavam irregularidades. As fases de formação das tétrades e grãos de pólen também foram analisadas (Tabelas 5 e 6).

As populações de milho comum, de milho doce e de teosinto demonstraram alta regularidade meiótica, com baixa frequência de univalentes. Por outro lado, nos cruzamentos efetuados entre milho e teosinto (geração  $F_1$ ) foi observado o registro de univalentes (I) nas três primeiras fases citadas (Figuras 2B e D), o que pode ser atribuído às diferenças existentes entre os genomas dos mesmos ou a ausência de genes de reconhecimento entre os genomas. Segundo Stebbins (1993), as diferenças cromossômicas refletem diferenças na origem da variação genética e, muitas vezes, no conteúdo gênico dos indivíduos.

De acordo com análises realizadas por Defani-Scoarize *et al.* (1996), a presença de cromossomos univalentes na meiose de linhagens de milho, ocorre devido a

eventos que estão sob controle de mais de vinte genes diferentes. Esses genes estariam suscetíveis a mutações que influenciariam desde a pré-meiose até a formação dos grãos de pólen. Dessa forma, a presença de cromossomos univalentes em fases específicas da meiose de linhagens de milho pode ser devido à segregação desses mesmos genes, além da ausência de homólogos.

A Tabela 2 demonstra o comportamento cromossômico em diacinese das hibridizações efetuadas entre as duas subespécies e as populações que as originaram.

Tabela 2 – Comportamento cromossômico em diacinese em genótipos de milho, teosinto e na geração F<sub>1</sub>. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Genótipos	Plantas analisadas	Células analisadas	Diacinese			$\chi^2$
			10(II) <sup>1</sup>	2(I)9(II) <sup>2</sup>	4(I)8(II) <sup>3</sup>	
AS3466 x Teosinto	4	73	69	03	01	4,11
BR400 x Teosinto	3	63	55	05	03	8,54*
BR402 x Teosinto	3	95	76	19	00	21,11*
DO1880 x Teosinto	3	93	86	07	00	7,27
Suwan	3	90	89	00	01	1,01
Pampa	3	83	83	00	00	-
BR400	3	86	79	07	00	7,30
BR402	1	30	30	00	00	-
DO1880	3	73	71	02	00	2,03
Teosinto	3	82	82	00	00	-
Geração (F <sub>1</sub> )	13	324	286	34	04	40,37*
Milho	13	362	352	09	01	10,14*
Teosinto	3	82	82	00	00	-

<sup>1</sup> células normais com dez bivalentes

<sup>2</sup> células com dois univalentes e nove bivalentes

<sup>3</sup> células com quatro univalentes e oito bivalentes

\* diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste do qui-quadrado.

Na análise individual do pareamento cromossômico em diacinese foram identificados cruzamentos envolvendo duas populações de milho doce (BR400 e BR402) e teosinto com diferença significativa nas frequências de univalentes (Tabela 2). Essa



diferença também foi encontrada na análise geral entre as hibridizações formadoras da geração F<sub>1</sub> e as populações de milho originais.

A Tabela 3 apresenta a análise da metáfase I efetuada nos mesmos genótipos anteriormente citados.

Tabela 3 – Comportamento cromossômico em metáfase I em genótipos de milho, teosinto e na geração F<sub>1</sub>. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Genótipos	Plantas analisadas	Células analisadas	Metáfase					$\chi^2$
			10(II) <sup>1</sup>	2(I)9(II) <sup>2</sup>	4(I)8(II) <sup>3</sup>	6(I)7(II) <sup>4</sup>	7(I)6(II) <sup>5</sup>	
AS3466 x Teosinto	4	74	58	15	1	0	0	17,94*
BR400 x Teosinto	3	60	43	11	4	1	1	19,81*
BR402 x Teosinto	3	62	46	12	4	0	0	18,37*
DO1880 x Teosinto	3	61	47	14	0	0	0	15,81*
Suwan	3	66	66	0	0	0	0	-
Pampa	3	60	59	1	0	0	0	1,01
BR400	3	62	61	1	0	0	0	1,01
BR402	1	20	20	0	0	0	0	-
DO1880	3	51	47	3	1	0	0	4,16
Teosinto	3	14	14	0	0	0	0	-
Geração (F <sub>1</sub> )	13	257	194	52	9	1	1	71,80*
Milho	10	259	253	5	1	0	0	6,07
Teosinto	3	14	14	0	0	0	0	-

<sup>1</sup> células normais com dez bivalentes

<sup>2</sup> células com dois univalentes e nove bivalentes

<sup>3</sup> células com quatro univalentes e oito bivalentes

<sup>4</sup> células com seis univalentes e sete bivalentes

<sup>5</sup> células com sete univalentes e seis bivalentes

\* diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste do qui-quadrado.

Nas observações realizadas em metáfase I foi registrado um aumento significativo nas freqüências de univalentes (Figura 2D) dos cruzamentos realizados entre milho e teosinto (Tabela 3), provavelmente, devido a uma melhor orientação cromossômica nessa fase, tornando a identificação dos cromossomos mais segura e/ ou a

existência de dessinápse posterior (separação precoce dos cromossomos). Nessa fase, todos os cruzamentos originários da geração F<sub>1</sub> apresentaram diferença significativa em relação aos univalentes registrados, quando comparados com as populações dos quais derivaram.

Na Tabela 4 estão representadas as observações realizadas na anáfase I, com a identificação das células normais e anormais. As células consideradas normais apresentam 10 cromossomos em cada pólo (Figura 2D).

Tabela 4 – Comportamento cromossômico em anáfase I em genótipos de milho, teosinto e na geração F<sub>1</sub>. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Genótipos	Plantas analisadas	Células analisadas	Anáfase		$\chi^2$
			Normais	Anormais	
AS3466 x Teosinto	3	34	14	20	28,33*
BR400 x Teosinto	2	3	1	2	3,00
BR402 x Teosinto	2	42	26	16	19,76*
DO1880 x Teosinto	2	15	6	9	12,86*
Suwan	1	9	6	3	3,60
Pampa	2	9	7	2	4,36
BR400	2	24	20	4	7,06
BR402	1	20	14	6	2,10
DO1880	3	22	20	2	2,25
Teosinto	2	2	2	0	-
Geração (F <sub>1</sub> )	9	94	47	47	62,67*
Milho	9	84	67	17	18,91*
Teosinto	2	2	2	0	-

Foram observadas maior frequência e diversidade de anomalias nos cruzamentos da geração F<sub>1</sub> (Tabela 4), como por exemplo: pontes (Figura 2E), cromossomos retardatários (Figuras 2F) e fragmentos cromossômicos onde, com exceção do cruzamento de BR400 x teosinto, as hibridizações apresentaram diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). O registro dessa não significância proveniente do cruzamento envolvendo a população BR400 e teosinto ocorreu, provavelmente, devido ao baixo número de células analisadas.

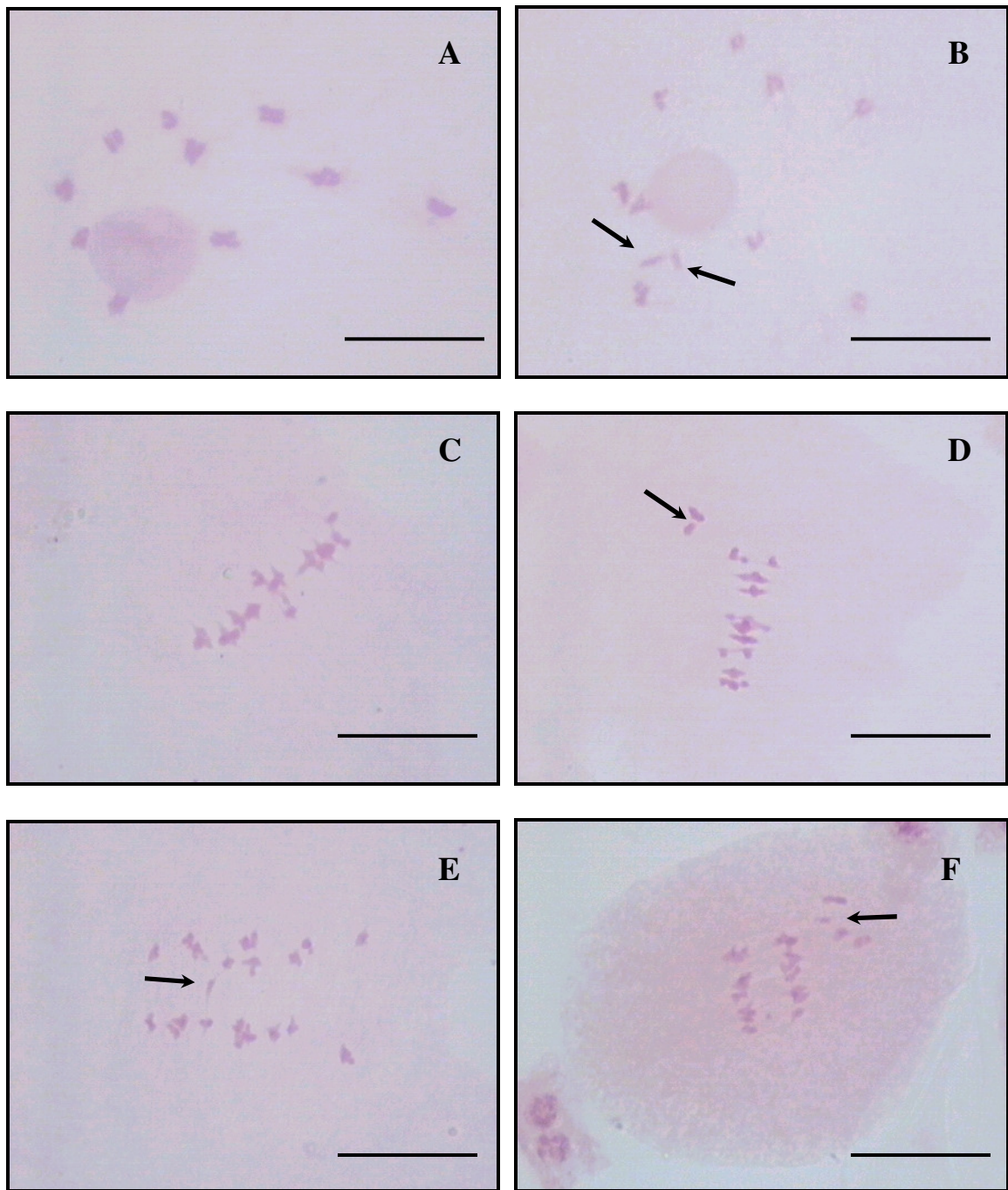


Figura 2 – Comportamento meiótico em populações de milho e em híbridos entre milho e teosinto. Diacinese normal em BR402 (A), diacinese com univalentes em híbrido de BR400 x teosinto (B), metáfase I normal em AS3466 x teosinto (C), univalentes em metáfase de BR402 x teosinto (D), presença de ponte em anáfase I de AS3466 x teosinto (E) e cromossomos retardatérios em anáfase I de BR400 x teosinto (F). Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004. (Escala: 10 $\mu$ m).

Avaliando a meiose nas fases citadas e transformando os dados significativos em resultados percentuais, foi observada menor porcentagem de univalentes em diacinese para o cruzamento envolvendo a população BR400 x teosinto, quando comparado ao cruzamento com significativa frequência de univalentes (Tabela 2). Na metáfase I, todas as hibridizações mostraram frequências significativas de univalentes e os resultados percentuais se mantiveram similares (Tabela 3), diferente da anáfase I, onde a geração  $F_1$  – oriunda do cruzamento de BR402 x teosinto – menor valor percentual (Tabela 4). Sendo assim, pode ser sugerido que a melhor fase para observação do comportamento cromossômico é a metáfase I, onde os cromossomos estão mais bem orientados na placa metafásica, evitando possíveis erros na análise.

As frequências de univalentes em cruzamentos realizados entre populações de milho e de teosinto implicam em diferenças genéticas entre as duas espécies, que, em alta frequência, poderiam interferir no processo de recombinação e na perda ou ganho de cromossomos na geração seguinte (Defani-Scoarize *et al.*, 1996). Além disso, poderia ocasionar em redução da produtividade em consequência de um alto índice de aborto de pólen e óvulo, acarretando em perdas significativas para a utilização do teosinto como espécie doadora de características desejáveis em programas de melhoramento genético de milho comum e milho doce.

No presente trabalho, apesar da frequência de univalentes registrada, a maior parte das células observadas foi considerada normal, demonstrando a alta regularidade de pareamento cromossômico entre o milho e o teosinto e concordando com os resultados apresentados por Almeida (2003), que obteve índices de anormalidades superiores para os híbridos. Os híbridos apresentaram presença de univalentes, aderência de cromossomos, dessinápse na metáfase I e pontes em anáfase I.

A tabela abaixo (Tabela 5) apresenta o número de quiasmas (Figuras 3A e B) encontrado para os diferentes genótipos de milho e de teosinto observados. A diferença entre o número de quiasmas foi significativa entre milho, teosinto e geração F<sub>1</sub>, demonstrando uma variação entre as médias. Foram observados quatro grupos significativamente diferenciados, sendo que na geração F<sub>1</sub> proveniente do cruzamento de DO1880 e teosinto obteve número médio superior de quiasmas e a população original de milho doce DO1880, número inferior. Os outros cruzamentos e populações se apresentam valores médios intermediários.

Tabela 5 – Número médio de quiasmas em diferentes genótipos de milho, teosinto e na geração F<sub>1</sub>. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Genótipos	Células analisadas	Mínimo	Máximo	Média	
DO1880 x Teosinto	62	21	34	26,2	a
AS3466 x Teosinto	74	18	30	24,7	b
BR402	20	22	27	24,4	b c
Teosinto	34	20	29	24,2	b c
BR402 x Teosinto	63	16	30	23,7	b c
Pampa	59	19	28	23,3	c
Suwan	60	19	28	23,2	c
BR400	60	15	29	22,8	c d
BR400 x Teosinto	54	17	28	22,8	c d
DO1880	57	17	26	21,6	d
Geração (F <sub>1</sub> )	253	16	34		
Milho	256	15	29		
Teosinto	34	20	29		

\* médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas compara as fontes (milho, teosinto e geração F<sub>1</sub>).

De maneira geral, os dados apresentados nesse trabalho indicam que os genótipos observados apresentam comportamento meiótico regular, conforme encontrado por Almeida (2003). Também, em relação à frequência de quiasmas, o mesmo autor

observou que o genótipo DO1880 apresentou valor superior de número de quiasmas, indicando maior similaridade com o teosinto e obtendo menor número de células com anormalidades para esse genótipo.

#### 4.2.2 Índice Meiótico

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos nas análises da formação das tétrades e na viabilidade dos grãos de pólen dos genótipos observados.

Tabela 6 – Índice meiótico e viabilidade de pólen em genótipos de milho, teosinto e na geração F<sub>1</sub>. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Genótipos	Tétrade			Pólen		
	Plantas analisadas	Células analisadas	Índice meiótico (%)	Plantas analisadas	Células analisadas	Viabilidade de pólen (%)
AS3466 x Teosinto	4	400	100	1	100	100
BR400 x Teosinto	3	300	100	1	100	100
BR402 x Teosinto	3	100	100	2	200	89,5
DO1880 x Teosinto	3	300	100	3	300	98,0
Suwan	3	300	100	3	300	100
Pampa	3	300	100	2	200	99
BR400	3	300	100	3	300	100
BR402	1	100	100	1	100	98,0
DO1880	3	300	100	3	300	100
Teosinto	3	300	100	1	100	100
Geração (F <sub>1</sub> )	13	1100	100	21	2200	96,8
Milho	13	1300	100	12	1200	99,4
Teosinto	3	300	100	1	100	100

O índice meiótico de formação de tétrades (Tabela 5) encontrado para o milho comum, milho doce, teosinto e para geração F<sub>1</sub>, proveniente das hibridações realizadas entre os mesmos, foi de 100%, revelando normalidade na formação das tétrades (Figuras 3C e E). Essa análise é considerada uma subestimativa do comportamento meiótico e pode fornecer uma importante informação sobre a regularidade do mesmo. Para viabilidade de grãos de pólen (Tabela 5), foi observada uma variação de 96,8% para a geração F<sub>1</sub>, 99,4%

para populações de milho a 100% na população de teosinto, demonstrando alta regularidade de formação dos gametas masculinos dessas populações (Figura 3D e F). Nos resultados observados por Almeida (2003), foram encontrados índices meióticos similares para as populações de milho e para as hibridizações efetuadas (99,5% e 99,8%, respectivamente).

Efetuando uma comparação entre os valores encontrados para o índice meiótico e a viabilidade dos grãos de pólen (Tabela 5), é correto afirmar que os dados são concisos. Em geral, populações e geração  $F_1$  que apresentaram índices meióticos satisfatórios obtiveram polens viáveis, indicando uma microsporogênese normal até a formação dos gametas masculinos.

Moraes Fernandes (1982) afirmou que o índice meiótico é um bom critério para selecionar plantas meioticamente estáveis. Fornecendo ao melhorista um indicador importante da estabilidade genética de um cultivar e evidencia que o comportamento meiótico é certamente um fator necessário para que a transmissão das características agrônomicas desejáveis de uma planta seja mantida. Tal relação foi verificada para os genótipos estudados no presente trabalho.

#### **4.2.3 Análise Conjunta das fases da meiose e implicações evolutivas**

A Tabela 7 apresenta uma análise comparativa entre as fases da meiose de milho e teosinto, evidenciando um aumento do número de células contendo anomalias nos híbridos (geração  $F_1$ ) em anáfase I, quando comparada às outras fases analisadas. Também, foi possível verificar que na formação das tétrades e dos grãos de pólen não ocorreu uma expressão das anomalias registradas nas fases anteriores. Isso pode ser devido a três fatores: uma seleção meiótica das anomalias antes da fase de tétrade, que as mesmas estejam contidas nas tétrades e nos grãos de pólen, mas serão detectadas somente na

geração seguinte ou, ainda, o número de plantas analisadas pode ter sido outro fator determinante.

Tabela 7 – Estabilidade citogenética em genótipos de milho, teosinto e na geração F<sub>1</sub>.  
Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Genótipos	Diacinese	Metáfase I	Anáfase I	Tétrade	Pólen
Teosinto	100%	100%	100%	100%	100%
Geração (F <sub>1</sub> )	88,3%	75,5%	50%	100%	96,8%
Milho	97,2%	97,6%	80%	100%	99,4%

Dados moleculares sugerem que após o evento de poliploidização, diversas mudanças rápidas ocorrem no genoma induzindo a diploidização gênica, incluindo a ação de transposons e silenciamento gênico, facilitando a evolução desses organismos (Soltis & Soltis, 1999). Os resultados encontrados para meiose dos genótipos analisados permitem extrapolar sobre a influência do processo de diploidização gênica na origem do milho e do teosinto, principalmente, pela regularização do pareamento apenas em bivalentes na metáfase I. Atualmente, muitas espécies consideradas diplóides são sugeridas, como poliplóides antigos, sendo o exemplo clássico do milho cultivado (Leitch & Bennett, 1997).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam coesão e coerência com a proposta de alta similaridade entre os genomas do milho e do teosinto (Doebley *et al.*, 1990; Poggio *et al.*, 2000; entre outros). O genótipo de milho doce DO1880 apresenta maior similaridade com o teosinto, visto que a progênie F<sub>1</sub> obtida da hibridização dessas populações apresentou média de quiasmas superior aos demais genótipos analisados. Embora a mesma progênie tenha apresentado significância nas análises de anormalidades em metáfase I e anáfase I. Na utilização do teosinto como fonte genética a ser introduzida no milho é fundamental uma alta frequência de recombinação. Dessa forma, a utilização do



genótipo DO1880 proporcionaria uma maior recombinação e estabilidade meiótica nas gerações de retrocruzamentos entre milho e teosinto, de acordo com os dados apresentados por Almeida (2003).

As análises realizadas demonstram alta regularidade meiótica na divisão das células-mãe de pólen (CMP), bem como, na viabilidade dos grãos de pólen. Dessa maneira, a baixa frequência de formação de grãos e germinação das plantas autofecundadas no período de 2002/ 2003, com o objetivo de obtenção de uma geração F<sub>2</sub>, não parece ser devida ao processo de divisão celular, mas a presença de barreiras ao nível molecular e genético entre as duas subespécies, além de uma situação de estresse ambiental identificada no período de desenvolvimento vegetativo dos genótipos. Esse fato foi demonstrado por Evans & Kermicle (2001) no mapeamento de um loco (*teosinte crossing barrier 1*), o qual governa o sucesso de hibridização entre milho e teosinto.

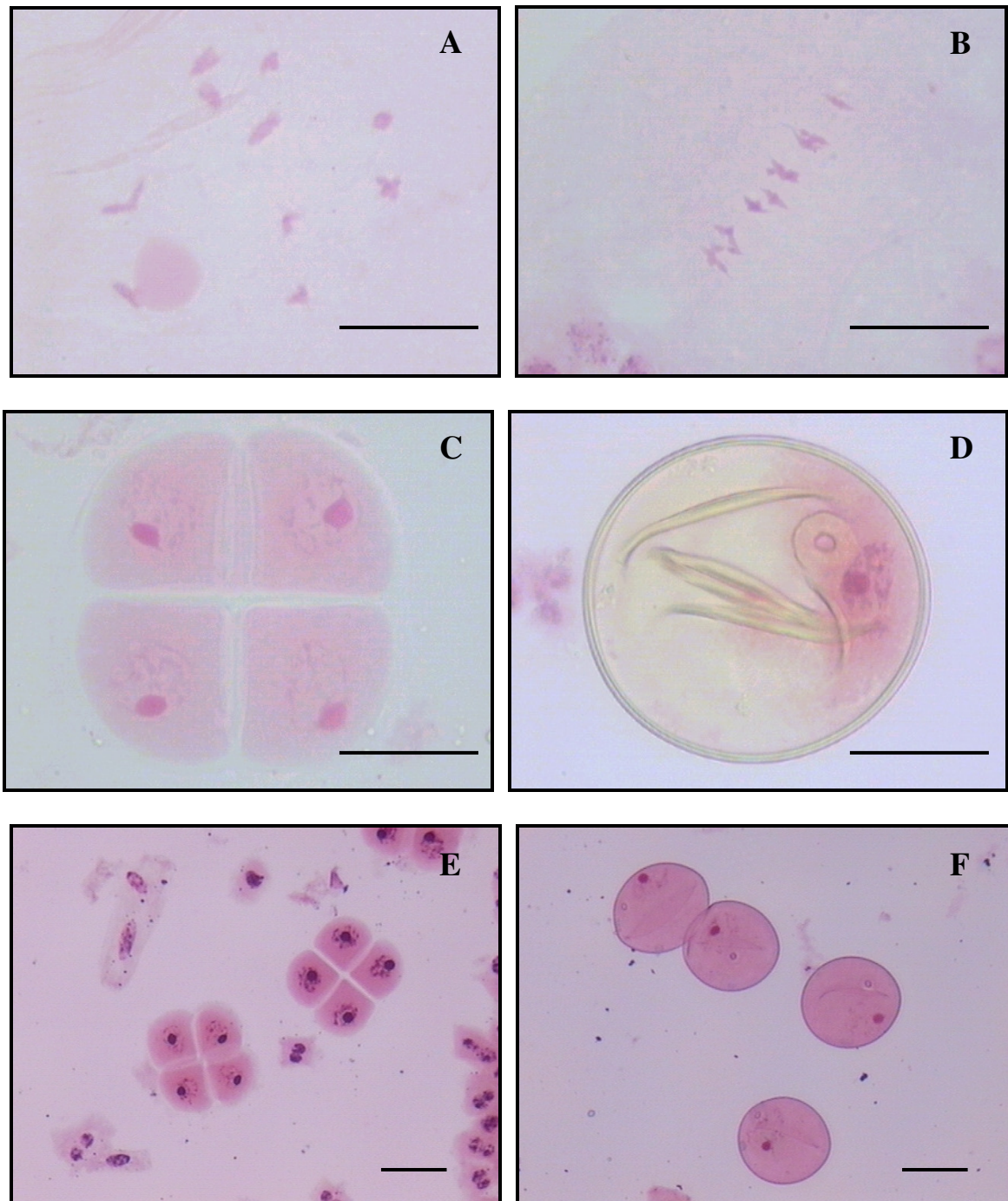


Figura 3 – Regularidade meiótica em populações de milho e em híbridos entre milho e teosinto. Quiasmas em diacinese normal de BR402 (A), quiasmas em metáfase I normal em DO1880 (B), tétrade de BR400 (C), pólen de AS3466 x teosinto (D), tétrades de teosinto (E) e grãos de pólen de teosinto (F). Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004. (Escala: 10 $\mu$ m).

### **4.3 Análises Moleculares**

#### **4.3.1 Padrão de distribuição dos SSR**

O polimorfismo presente em 13 locos microssatélites (Tabela 8) foi analisado em duas populações de milho comum, duas de milho doce e uma de teosinto. O tamanho dos alelos detectados variou de 81 a 200 pares de bases (pb), semelhante aos resultados obtidos por Almeida (2003), onde os tamanhos alélicos variaram de 40 a 244 pb para as mesmas populações. Em um estudo realizado por Pinto *et al.* (2003) em populações tropicais de milho, foi observada uma maior variação nos tamanhos alélicos dentro dos locos analisados (de 10pb a 288pb) e um alto número de alelos específicos para algumas populações. A presença de alelos específicos em populações tropicais foi demonstrada por Matsuoka *et al.* (2002) e Senior *et al.* (1998), indicando o uso desses alelos em programas de melhoramento da cultura por possibilitarem um diagnóstico específico. Os resultados apresentados aqui não identificaram a presença de alelos específicos para uma determinada população.

#### **4.3.2 Diversidade genética**

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi estimado para os locos analisados e variou de 0,37 (umc1648) a 0,80 (umc1696 e umc1594), com o valor médio de PIC de 0,50 (Tabela 8). Os valores de PIC demonstrados no presente trabalho estão de acordo com Almeida (2003) que apresenta uma variação de 0,26 a 0,76 para as mesmas populações de milho e de teosinto. Powell *et al.* (1996) também obtiveram resultados similares (de 0,40 a 0,89) com média de dois alelos por loco e Pinto *et al.* (2003) apresentam um valor de PIC médio de 0,58 (de 0,18 a 0,78). Esses resultados são mais baixos do que o valor médio apresentado por Smith *et al.* (1997) para linhagens melhoradas de milho (0,67), no entanto, são similares aos encontrados por Matsuoka *et al.* (2002) e

Warburton *et al.* (2002), os quais são 0,62 e 0,59, respectivamente. Matsuoka *et al.* (2002) analisaram sessenta populações de polinização aberta de teosinto e cento e uma linhagens de milho. Conforme os resultados desse trabalho, é possível sugerir que o aumento do número de genótipos participantes da análise em uma região microssatélite, permite detectar valores superiores de PIC. No presente trabalho, os locos umc1594 e umc1696 apresentaram maior poder discriminatório (9 alelos e 6 alelos, respectivamente) e valores superiores de PIC (0,80), quando comparados aos outros locos analisados, o que pode indicar uma fundamental relação entre os valores de conteúdo de polimorfismo e a quantidade de alelos presentes na região amplificada. Entretanto, Warburton *et al.* (2002) demonstraram em um estudo realizado com populações de polinização aberta e linhas melhoradas de milho que o poder discriminatório de uma região microssatélite, não está associado ao grau de polimorfismo encontrado para o mesmo *primer*.

A tabela 8 apresenta a descrição dos *primers* microssatélites utilizados para detecção de polimorfismo nas populações de milho e de teosinto.

Tabela 8 – Descrição dos locos microssatélites e conteúdo de polimorfismo (PIC).  
Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Loco	Cromossomo	Motivo	Seqüência dos <i>primers</i>	Tamanho (pb)	PIC
Umc1363	1	ACG(4)	TCTCCCTCCCCTGTACATGAATTA// TGTTTAAGTGTGGCAGAAAGCAA	111	0,72
Umc1683	3	CT(6)	CGTCCGAAACTGTCTCTCCTC// GCCTCTTCTATGGAGAGACTGGAG	81	0,38
Umc1620	4	TTC(4)	CCACCGAGTGACTAGTTGTGAGAG// CCTTCAATGTTCATGTTCTCTTCC	143	0,50
Umc1023	6	AT(11)	CTTGTGCCACCACATGCAGTA// CAGTTTGAACAGGGAAAAGTACG	180-200	0,58
Umc1433	7	AG(6)	TTGTCAGACAGAACCCACACATTT// TTTTGGCTTCTTTTGTGTGGAT	92	0,56
Umc1097	5	CA(8)	CTCGTCAACGTCAACCCAAGTAAG// CTGTTAGATGTGCGACAACAGAGC	100-140	0,71
Umc1594	3	TA(10)	GCCAGGGGAGAAATAAAATAAAGC// CACTGCAGGCCACACATACATA	128	0,80
Umc1034	8	GA(12)	GTGTTTCCGTTTCGCTGATTTTAC// TCATCCATGTGACAGAGACGACTT	100-150	0,74
Umc1696	2	GA(8)	CTAGGGTTTAAACCAACGGGGAG// TAAGGAGAGGGTTCGATGAACACAT	160	0,80
Umc1331	1	GGT(10)	TTATGAACGTGGTCGTGACTATGG// ATATCTGTCCCTCTCCACCATC	149	0,40
Umc1294	4	GAG(4)	GCCGTCAACGGGCTTAAACT // GCCTCCAGCTCTCTCGTCTCTT	141	0,56
Umc1648	10	TC(8)	CTGCAAGTACGTGAGCCTGTACG// GCTTGAGCTGTGAGGAAGTTTTG	137	0,37
Umc1225	5	AG(6)	CTAGCTCCGTGTGAGTGAGTGAGT// TTCCTTCTTCTTTCCTGTGCAAC	150	0,62
PIC Médio					0,50

Foram detectados 57 alelos no total de locos analisados e um número médio de 4,4 alelos por loco, apresentando uma variação de dois (2) alelos no loco umc1620 a nove (9) para o loco umc1594. A maioria dos estudos de diversidade realizados em milho, demonstra resultados semelhantes. Por exemplo, nos resultados encontrados por Lu & Bernardo (2001) para populações melhoradas de milho, 4,9 alelos por loco, em 83 *primers* de microssatélites analisados. Senior *et al.* (1998) encontraram uma média de 5,0 alelos por loco. Pinto *et al.* (2003) analisaram a diversidade genética apresentada por populações tropicais de milho, as quais foram submetidas à alta intensidade de seleção recorrente. Demonstrando uma média de 4,1 (2 a 7) alelos por loco. Entretanto, Pejic *et al.* (1998)

analisando a similaridade entre linhagens de milho, encontraram 183 alelos em 27 locos de microssatélites diferentes, com uma média de 6,8 alelos por loco.

A tabela 8 apresenta os dados obtidos nas análises realizadas nas populações de milho e de teosinto.

A avaliação da heterozigosidade (Tabela 9) no conjunto de locos analisados revelou uma média de 0,62 de heterozigose e 100% de polimorfismo. Foi realizada uma análise individual dos resultados encontrados para cada população. Os genótipos de milho comum Pampa apresentaram menor valor médio de heterozigosidade (0,32) e, a população de teosinto, o valor mais alto (0,47), sendo que para o primeiro foram encontrados 61, 5% dos locos polimórficos e a última 92,3 % (Tabela 9), conforme o esperado para populações silvestres que conservam sua variação original. Lu & Bernardo, 2001 confirmam uma redução de 35% na diversidade média apresentada por populações melhoradas de milho em comparação ao número médio de alelos presentes em populações de polinização aberta, formadas por cruzamentos naturais.

Tabela 9 – Medidas de variação genética nas populações de milho e de teosinto. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

Populações	% locos polimórficos	Heterozigosidade observada ( <i>Ho</i> )	Heterozigosidade esperada ( <i>He</i> )	Total de alelos	Média de alelos/ loco
Suwan	76,9	0,36	0,37	28	2,15
Pampa	61,5	0,32	0,34	29	2,23
BR400	92,3	0,39	0,41	37	2,84
BR402	76,9	0,36	0,37	31	2,38
Teosinto	92,3	0,47	0,49	40	3,07

### 4.3.3 Relacionamento Genético entre as populações

A distância genética entre as populações de milho e de teosinto foi estimada e apresentou diferentes magnitudes (Nei, 1978), obtendo uma distância média de 0,68. Foi observado que a população de teosinto apresentou um valor de distância superior (1,09),

quando comparada às outras populações de milho comum e de milho doce. Esse resultado já era esperado, uma vez que a população de teosinto mantém sua variabilidade genética similar a original encontrada em uma espécie silvestre. Dessa forma, a diferença encontrada entre o teosinto e as demais populações utilizadas nesse estudo, reflete a presença de um *pool* gênico específico de sua condição silvestre ancestral. A partir da estimativa da distância genética entre as cinco populações, foi construído um dendograma (Figura 4) representativo da diversidade alélica presente e do relacionamento entre elas, após o tempo de diferenciação das mesmas. O dendograma baseado nas análises dos locos microsatélites mostrou a formação de dois grandes grupos, onde um subgrupo foi formado com as populações de milho comum (Suwan e Pampa) e outro formado por uma população de milho doce (BR402). O teosinto compôs um grupo separado das demais populações, entretanto, foi observado um relacionamento mais próximo com a população BR400. A identificação do ponto de corte e separação dos grupos no dendograma foi realizada através do valor de distância média obtida (0,68) pelo coeficiente de NEI78. Almeida (2003) obteve resultados diferentes para as mesmas populações, demonstrando três grupos distintos (um grupo com o teosinto, outro com as populações de milho doce e um terceiro com as populações de milho comum). Isso pode ter ocorrido devido ao número limitado de locos de microsatélites utilizados, bem como, a utilização de métodos de análise diferenciados. Os resultados apresentados aqui demonstram a semelhança genômica entre milho e teosinto e a baixa variação nas frequências alélicas das populações utilizadas nesse estudo.

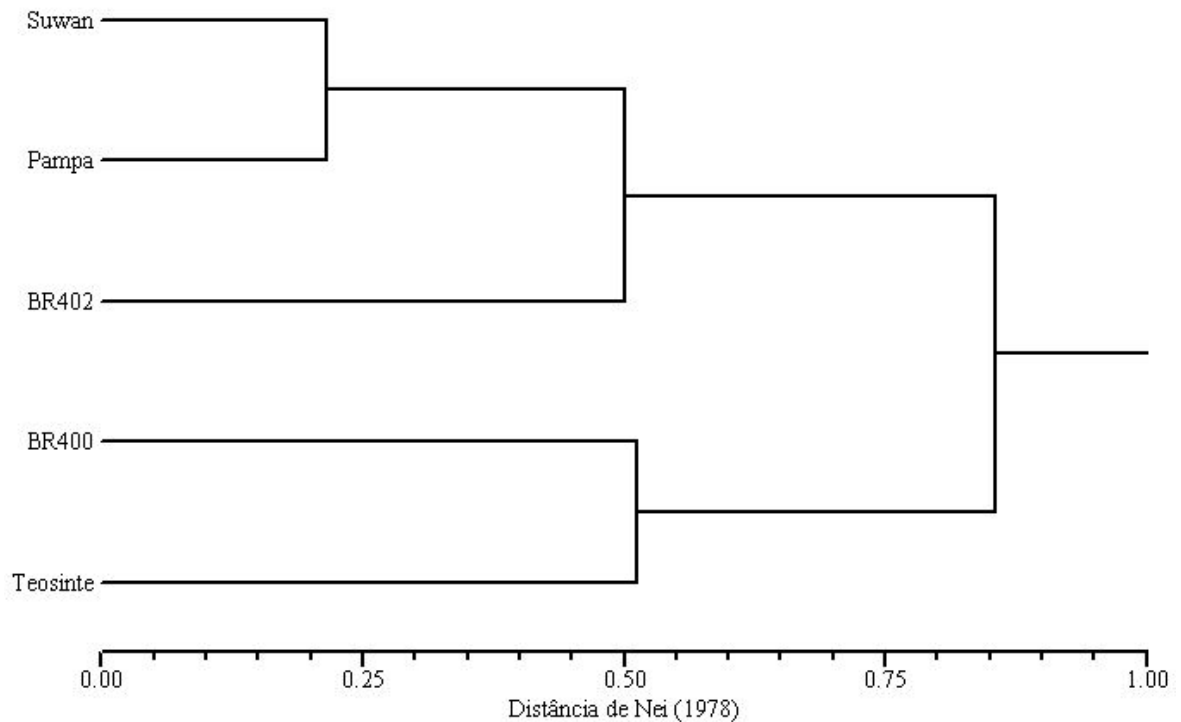


Figura 4 – Agrupamento obtido pela matriz de distância genética, baseado no coeficiente de NEI78 (SAHN – NTSYS). Considerando 13 locos microssatélites. Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2004.

A tabela 10 representa a análise da variância molecular (Amova) obtida das frequências alélicas de cinco populações de milho e de teosinto para treze locos microssatélites.

Para entender a distribuição da variação observada nos locos microssatélites analisados, uma análise da variância molecular (Amova) foi realizada (Tabela 10). A variância total derivada dos dados de microssatélites pode ser classificada como altamente significativa e foi observado que 54,76% da variação alélica foi detectada entre as populações, sendo que, dentro das populações foram detectadas 45,24% da variação. Os valores encontrados são diferentes do esperado para populações de polinização aberta, no entanto, esses resultados sugerem que os cruzamentos realizados entre as populações



poderão obter maior progresso genético, devido à alta variação detectada entre as populações e, portanto a maior chance de encontrarmos alelos distintos entre as mesmas. Esses resultados concordam com os apresentados por Almeida (2003), os quais demonstram uma variação superior entre as populações (55,62%) quando comparada à observada dentro das populações (11,56%).

Tabela 10 – Análise da Variância Molecular (Amova) das frequências alélicas de treze locos microssatélites nas populações de milho comum, milho doce e teosinto. Faculdade de Agronomia – UFRGS, 2004.

Causa da Variação	<sup>1</sup> GL	<sup>2</sup> SQ	Componentes da Variância	% de Variação
Entre Populações	4	6,9804	0,087172	54,76
Dentro Populações	91	6,5536	0,072017	45,24
Total	95	13,5340	0,159189	100

<sup>1</sup> graus de liberdade

<sup>2</sup> soma dos quadrados

De acordo com Pinto *et al.* (2003), as diferentes frequências gênicas observadas entre populações são fatores fundamentais na expressão da heterose e tem implicações práticas. No presente trabalho, a diversidade genética mostra que ciclos de seleção são eficientes para o aumento da distância genética entre o milho e o teosinto, que mantém sua variabilidade genética original. Dessa forma, as implicações práticas para o melhoramento do milho comum e do milho doce residem nas inúmeras características de interesse agrônômico que podem ser selecionadas da diversidade alélica presente e inexplorada no teosinto.

Os padrões complexos das mutações ocorridas nos diversos tipos de milho (pipoca, doce, comum, etc.) têm sido analisados através do uso de regiões microssatélites com resultados satisfatórios em análises inter e intrapopulacionais do gênero *Zea*. Os dados

obtidos no presente trabalho indicam que a variação genética é reduzida no milho quando comparada ao teosinto (*Zea mays ssp. mexicana*), seu ancestral relacionado. Conforme Matsuoka *et al.* (2002), isso reflete o evento (“*bottle neck*”) ocorrido na domesticação do milho cultivado. Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a variação inferior encontrada no milho, quando comparado com teosinto, seja devida a alta pressão seletiva humana exercida desde sua domesticação.

## 5. CONCLUSÕES

As populações originais de milho comum, milho doce e de teosinto, de maneira geral, apresentaram comportamento meiótico regular, o que pode ser demonstrado no índice meiótico (100%) e viabilidade dos grãos de pólen (acima de 99%). Ao contrário dos híbridos (geração F<sub>1</sub>) entre milho e teosinto, que apresentaram algumas anomalias, entretanto, sem reduzir a formação de tétrades e a viabilidade dos gametas masculinos, demonstrando ausência de barreiras citológicas que impeçam o desenvolvimento de indivíduos férteis formados pelas hibridações.

Os locos microssatélites analisados demonstraram que a maior variação genética se distribui entre as populações, bem como, a população de teosinto apresenta maior variação genética, quando comparada com as populações de milho comum e milho doce, conforme esperado para um germoplasma silvestre.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Estrutura dos cromossomos do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Coords.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 81-102.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 3. ed. New York: J. Wiley, 1960. 485p.

ALMEIDA, C. C. de S. **Análise citogenética e molecular em milho (*Zea mays* subsp. *mays*), teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana*) e em seus híbridos**. 2003. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

AMORIN, E. **Variabilidade genética em milho doce estimada através de caracteres morfológicos, RAPD e microssatélites**. 2002. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ANDERSON, E.; CUTLER, H. C. Races of *Zea mays* L. their recognition and classification. **Annual Botanic Gardens**, Missouri, v. 29, p. 69-89, 1942.

ANDERSON, J. A. et al. Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 1035-1043, 1992.

ANDRADE, R. V. et al. Avaliação de acessos de milho crioulo coletados na região central do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 67-74, 2002.

AZANZA, F. et al. Quantitative trait loci influencing chemical and sensory characteristics of eating quality in sweet corn. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 40-50, 1996.

BANDEL, G. Genética. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Coords.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 111-131.

BEAVIS, W. D. et al. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their association with qualitative genetic loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 141-145, 1991.

- BEAVIS, W. D. et al. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F<sub>4</sub> progeny from maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 882-896, 1994.
- BODANESE-ZANETTINI, M. H. et al. Cytogenetic studies in two brazilian wheat cultivars under natural and controlled temperature conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 551-557, 1979.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.
- BOYER, C. D.; SHANNON, J. The use of endosperm genes for sweet corn improvement. **Plant Breeding Reviews**, Hoboken, v. 1, p. 139-161, 1984.
- BROWN, W. L.; GOODMAN, M. M. Races of corn. In: SPRAGUE, G. F. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: America Society of Agronomy, 1977. p. 49-88.
- CHANG, M. T.; NEUFFER, M. G. Maize microsporogenesis. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 232-244, 1989.
- DEFANI-SOARIZE, M. A.; PAGLIARINI, M. S.; AGUIAR, C. G. Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). **The Nucleus**, Calcutta, v. 39, p. 10-18, 1996.
- DOEBLEY, J. The taxonomy and evolution of tripsacum and teosinte, the closest relatives of maize. In: INSTITUTE MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1983, Ohio. **Proceedings...** Ohio: Ohio Agriculture Research Development Center, 1983. p. 15-28.
- DOEBLEY, J. Genetics, development and the evolution of maize. **Maize Genetics Conference Abstracts**, [s. l], v. 35, p. 1, 1993.
- DOEBLEY, J. et al. Genetic and morphological analysis of maize-teosinte F<sub>2</sub> population: implications for the origin of maize. **Proceedings National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 87, p. 9888-9892, 1990.
- DOEBLEY, J.; BACIGALUPO, A.; STEC, A. Inheritance of kernel weight in two maize – teosinte hybrid populations: implications for crop evolution. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 85, p. 191-195, 1994.
- DOEBLEY, J.; STEC, A. Inheritance of the morphological differences between maize-teosinte comparison of results for F<sub>2</sub> populations. **Genetics**, Baltimore, v. 134, n. 2, p. 559-570, 1997.
- EDWARDS, J. W.; ALLEN, J. O.; COORS, J. G. Teosinte cytoplasmic genomes: I. performance of maize inbreds with teosinte cytoplasm. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1088-1091, 1996.
- EDWARDS, J. W.; COORS, J. G. Teosinte cytoplasmic genomes: II. performance of maize hybrids with teosinte cytoplasm. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1092-1098, 1996.
- EDWARDS, M. D. et al. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait

loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 765-774, 1992.

EUBANKS, M. W. Comparative analysis of the genomes of *Zea* and *Tripsacum*. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, v. 73, p. 30-32, 1999.

EVANS, M. M. S.; KERMICLE, J. L. *Teosinte crossing barrier1*, a locus governing hybridization of teosinte with maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 259-265, 2001.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. **Genetics**, Baltimore, v. 131, p. 479-491, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1995. 220 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargem, 1998. 220 p.

GALINAT, W. C. Intergenomic mapping of maize, teosinte and tripsacum. **Evolution**, Lawrence, v. 27, p. 644-655, 1973.

GALINAT, W. C. The origin of corn. In: SPRAGUE, G. F. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society Agronomic, 1977. p. 1-47.

GALINAT, W. C. The origin of maize shown by key morphological traits of its ancestor, teosinte. **Maydica**, Bergamo, v. 28, p. 121-138, 1983.

GALINAT, W. C. The missing links between teosinte and maize: a review. **Maydica**, Bergamo, v. 30, p. 137-160, 1985.

GAUT, B. S. et al. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings National Academy of Science of The United States of America**, Washington, v. 97, n. 13, p. 7008-7015, 2000.

GETHI, G. J. et al. SSR variation in important U. S. maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 3, p. 951-957, 2002.

GEVERS, H. O.; LAKE, J. K. *GLS1-a* major gene for resistance to grey leaf spot in maize. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 90, n. 7, p. 377-379, 1994.

GILL, B. S.; FRIEBE, B. Plant cytogenetics at the dawn of the 21<sup>st</sup> century. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 109-115, 1998.

GOLDMAN, I. L.; ROCHEFORD, T. R.; DUDLEY, J. W. Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois long term selection maize strains. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, p. 217-224, 1993.

GOLUBOVSKAYA, I. N. Genetic control of meiosis. **International Review Cytology**, New York, v. 58, p. 247, 1979.

GOLUBOVSKAYA, I. N. Meiosis in maize: mei genes and conception of genetic control of meiosis. **Advances in Genetics**, London, v. 26, p. 149, 1989.

GOODMAN, M. M. A brief survey of the races of maize and current attempts to infer racial relationships. In: WALDEN, D. B. (Ed.). **Maize breeding and genetics**. New York: J. Wiley, 1978. p. 143-158.

GOODMAN, M. M. História e origem do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Coords.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 3-24.

GOODMAN, M. M. Maize. In: SMART, J.; SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. New York: Longman Scientific, 1995. 531 p.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 42p.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1988.

HEISER, C. B. Aspects of unconscious selection and the evolution of domesticated plants. **Euphytica**, Dordrecht Netherlands, v. 37, p.71-77, 1988.

HELM, J. L.; ZUBER, M. S. Pericarp thickness of dent corn inbred line. **Crop Science**, Madison, v. 9, p. 803-804, 1969.

HELM, J. L.; ZUBER, M. S. Effect of harvested date on pericarp thickness in dent corn. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 50, p. 411-415, 1970.

HO, L. C.; KRANNENBERG, L. W.; HUNTER, R. B. Inheritance of pericarp thickness in short season maize inbreds. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 17, p. 621-629, 1975.

ITO, G. M.; BREWBAKER, J. L. Genetic advance through mass selection for tenderness in sweet corn. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, p. 496-499, 1981.

JOHNSON, J. J.; HAYES, H. K. The inheritance of pericarp tenderness in sweet corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, Washington, v. 30, p. 220-231, 1938.

KATIYAR, S. K.; SACHAN, J. K. S. Pachytene chromosome morphology of *Coix aquatica* and its comparison with *Zea* chromosomes. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, v. 66, p. 91, 1992.

KATZIR, N. et al. RAPD analysis of two pairs of *su1se/su1Se* near-isogenic lines for the identification of chromosomal regions affecting the sugary enhancer phenotype. **Maydica**, Bergamo, v.44, n. 2, p.149-153, 1999.

KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, Langford Lane, v. 5, n. 6, p. 246-251, 2000.

KENT, B.; STEC, A.; DOEBLEY, J. The dominant suppressor of sessile spikelets1 (*Sos1*) affects inflorescence development in maize. **Maize Genetics Conference Abstracts**, [s.l.], v. 36, p. 61, 1994.

LABORDA, P. R. et al. Análise da diversidade genética entre linhagens de milho do banco de germoplasma do IAC utilizando marcadores microssatélites. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2001, Goiânia. **Resumos...** Goiânia, 2001.

LEITCH, I.; BENNET, M. D. Polyploid in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997.

LEWIS, K. R.; JOHN, B. **The matter of mendelian heredity**. London: Churchill, 1964. 269 p.

LI, YOU-CHUM et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Israel, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LLUGANY, M. et al. Aluminium tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. **Plant Breeding**, Berlin, v. 157, n. 6, p. 447-451, 1994.

LOVE, R. M. **Estudos citológicos preliminares de trigos Rio-Grandenses**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 23 p. (Circular, 74).

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

LÜBBERSTEDT, T.; DUSSLE, C.; MELCHINGER, A. E. Application of microsatellites from maize to teosinte and other relatives of maize. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, p. 447-450, 1998.

MACHADO, C. T. T.; PATERNIANI, M. L. S. Origem, domesticação e difusão do milho. In: SOARES, A. C. et al. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. 185p.

MANGELSDORF, P. C. **Corn its origin, evolution and improvement**. Cambridge: Harvard University Press, 1974. 262 p.

MANGELSDORF, P. C. The mystery of corn: new perspectives. **Proceedings American Philosophical Society**, Philadelphia, v. 127, p. 215-247, 1983.

MATSUOKA, Y. et al. Microsatellites in *Zea* – variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 104, p. 436-450, 2002.



MELO, W. M. C. et al. Utilização de caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares para a avaliação da divergência genética entre híbridos de milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 276, p. 195-207, 2001.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA), versão 1.3:** a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Arizona: Microsoft Corporation, 1997. Disponível em: <http://www.public.asu.edu>. Acesso em: 05 out. 2004. 16h.

MIRANDA FILHO, J. B.; VIÉGAS, G. P. Milho híbrido. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Coords.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 275-340.

MOLINA, M. C.; POGGIO, L.; NARANGO, C. A. Cytogenetic analysis of the hybrids *Zea mays* ssp. *mays* x *Z. mays* ssp. *parviglumis* and *Z. mays* ssp. *mays* x *Z. mays* ssp. *mexicana*. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, v. 66, n. 107, p. 60, 1991.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Baltimore, v. 89, p. 583-590, 1978.

NETTO, D. A. M.; OLIVEIRA, A. C.; ANDRADE, R. V. Análise da variabilidade genética da coleção nuclear de milho tipo duro. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 2002.

PAABO, S. Neolithic genetic engineering. **Nature**, London, v. 398, n. 6724, p.194-195, 1999.

PADILHA, L. et al. Microsatélites fluorescentes na diferenciação de linhagens de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 2002.

PASZTOR, K.; BORSOS, O. Inheritance and chemical composition in inbred maize (*Zea mays* L.) x teosinte (*Zea mays* subsp. *mexicana* Schrader) hybrids. (Preliminary communication). **Novenytermeles**, Budapest, v. 39, n. 3, p. 193-213, 1990.

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

PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Coords.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 795 p.

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J. B. Melhoramento de populações. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. (Coords.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 217-265.

PINTO, L. R. et al. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica**, Dordrecht Netherlands, v. 134, p. 277-286, 2003.

POGGIO, L. et al. Cytological studies in alloplasmic lines of maize. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n. 68, p. 52, 1994.

POGGIO, L.; ROSATO, C. L. M.; NARANGO, C. A. Meiotic behavior among plants of an alloplasmic lines of maize. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 5, p. 723-729, 1997.

RAMESHA, M. S.; SACHAN, J. K. S. Cytolplasmic effect on chromosome pairing in maize-teosinte hybrids. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n. 67, p. 85, 1993.

RANDOLPH, L. F. History and origin of corn. II. cytogenetic aspects of the origin and evolutionary history of corn. In: SPRAGUE, G. F. (Ed). **Corn and corn improvement**, New York: Academic Press, 1955. p. 16-61.

RANDOLPH, L. F. The origin of maize. **Indian Journal Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 19, p. 1-12, 1959.

RANDOLPH, L. F. Contributions of wild relatives of maize to the evolutionary history of domesticated maize: a synthesis of divergent hypotheses I. **Economic Botany**, New York, v. 30, p. 321-344, 1976.

REEVES, R. G.; MANGELSDORF, P. C. A proposed taxonomic change in the tribe Maydeae. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 29, p. 815-817, 1942.

REVILLA, P.; TRACY, W. F. Heterotic patterns among open pollinated sweet corn cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 122, n. 3, p. 319-324, 1997.

RICHARDSON, D. C. Pericarp thickness in popcorn. **Agronomy Journal**, Madison, v. 52, p. 77-80, 1960.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software, 2000. 38 p.

RUNNING, M.; SCANLON, M.; SINHA, N. Maize Genetics 2000 – and beyond. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 829-835, 2000.

SACHAN, J.K.S.; NATH, Y. Interracial differences in mechanical properties of the cob in relation to knob composition. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Missouri, n. 68, p. 68-69, 1994.

SAGHAI-MARROF, M. A. et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and populations dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SHAROPOVA, N. et al. Microsatellites in maize – development and mapping. **Maize Genetics Conference Abstracts**, [s.l], v. 42, n. 87, p. 90, 2000.

SMITH, J. S. C.; SMITH, O. S. Associations among inbred lines of maize using

electrophoretic, chromatographic, and pedigree data. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 39-44, 1988.

SMITH, L. G.; HAKE, S.; SYLVESTER, A. W. The *tangled-1* mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. **Development**, [Amman], v. 122, p. 481-489, 1996.

SMITH, O. S. et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F<sub>1</sub> grain yield, heterosis, and RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, p. 833-840, 1990.

SPRAGUE, G. F. (Ed.). **Corn and corn improvement**. New York: Academic Press, 1955. 699 p.

SRINIVASAN, G.; BREWBAKER, J. L. Genetic analysis of hybrids between maize and perennial teosinte. II ear traits. **Maydica**, Bergamo, v. 44, n. 4, p. 371-384, 1999.

ST. MARTIN, S.; LOESCH, P. J.; WISER, W. J. A simplified technique for measuring pericarp thickness in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 25, p. 9-16, 1980.

STORCK, L.; LOVATO, C. Milho doce. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 283-292, 1991.

STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its components traits. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 639-648, 1987.

SWARUP, S. et al. Determinants of the high-methionine trait in wild and exotic germplasm may have escaped selection during early cultivation of maize. **Plant Journal**, London, v. 8, n. 3, p. 359-368, 1995.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: SpringerVerlang, 1993. 469 p.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed.). **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: Wien Universitätsverlag, 1998. p. 222-232.

SZABÓ, V. M.; BURR, B. Simple inheritance of key traits distinguishing maize and teosinte. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 252, p. 33-41, 1996.

TABOSA, J. N.; OLIVEIRA, J. P.; REIS, O. V. Avaliação preliminar de cultivares para a produção de milho verde na Zona da Mata Norte de Pernambuco. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. **Resumos...** Sete Lagoas: ABMS/Embrapa, 2000. 1 CD-ROM.

TADMOR, Y. et al. Mapping of the sugary enhancer 1 gene in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, p.489-494, 1995.

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

TEIXEIRA, F. F. et al. Diversidade no germoplasma de milho coletado na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 59-67, 2002.

TOSELLO, G. A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (Coords.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 375-409.

TRACY, W. F. History, genetics and breeding of supersweet (*shrunken 2*) sweet corn. **Plant Breeding Reviews**, Hoboken, v. 14, n. 7, p. 189-236, 1997.

TRACY, W. F.; GALINAT, W. C. Thickness and cell layer number of the pericarp of sweet corn and some of its relatives. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 4, p. 645-647, 1987.

TRACY, W. F.; JUVIK, J. A. Pericarp thickness of a shrunken-2 population of maize selected for improved field emergence. **Crop Science**, Madison, v. 29, p. 72-74, 1989.

VELDBOOM, L.R.; LEE, M.; WOODMAN, W.L. Molecular-marker-facilitated studies in an elite maize population: I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 7-16, 1994.

WANG, J. et al. Identification of parents of F<sub>1</sub> hybrids through SSR profiling of maternal and hybrid tissue. **Euphytica**, Dordrecht Netherlands, v. 124, p. 29-34, 2002.

WANG, R. et al. The limits of selection during maize domestication. **Nature**, London, v. 398, n. 6724, p. 236-239, 1999.

WARBURTON, M. L. et al. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 1832-1840, 2002.

WEATHERWAX, P. **Indian corn in old America**. New York: Macmillan, 1954.

WEATHERWAX, P. History and origin of corn. I. early history of corn and theories as to its origin. In: SPRAGUE, G. F. (Ed.). **Corn and corn improvement**. New York: Academic Press, 1955. p. 1-16.

WELLHAUSEN, E. J. et al. **Races of maize in Mexico**. Cambridge: Harvard University Press, 1952. 223 p.

ZHOU, H. S.; DENG, Y. H.; LI, J. X. Inbred selection from distant hybridization of maize (*Zea mays* L.) x teosinte (*Zea diploperennis* L.). **Acta Agronomica Sinica**, Beijing, v. 23, n. 3, p. 333-337, 1997.